

Aus der Klinik für Gynäkologie  
mit Schwerpunkt gynäkologische Onkologie

der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

# **Prävalenz multipler Infektionen mit humanen Papillomviren bei jungen Frauen in Deutschland**

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Josefine Leuschner  
geb. Haußig

aus Berlin, Deutschland

Datum der Promotion: 08.12.2017

*Meinen Eltern*



# Inhalt

<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>10</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>11</b>
<b>1 Einführung .....</b>	<b>13</b>
1.1 Das humane Papillomvirus.....	13
1.2 Infektionsverlauf und molekulare Mechanismen der Karzinogenese .....	14
1.2.1 Epidemiologie der anogenitalen HPV-Infektion .....	16
1.3 HPV und Krebs.....	17
1.4 Das Zervixkarzinom.....	19
1.4.1 Epidemiologie .....	19
1.4.2 Pathogenese.....	20
1.4.3 Histopathologie .....	20
1.4.4 Klassifikation .....	21
1.5 Primärprävention: Impfung gegen HPV.....	24
1.6 Sekundärprävention: Screening in Deutschland .....	24
1.7 Multiple HPV Infektionen .....	25
1.8 Aktuelle Studienlage zu multiplen Infektionen .....	26
1.9 Erfassung der HPV-Prävalenz in Deutschland.....	30
1.10 Ziele und Fragestellung.....	30
<b>2 Methodik.....</b>	<b>32</b>
2.1 Studiendesign.....	32
2.2 Ablauf der Rekrutierung .....	32
2.3 Repräsentativität der Stichprobe .....	32
2.4 Ein- und Ausschlusskriterien .....	34
2.5 Fragebogen und Definition der Variablen.....	34
2.6 Selbstabnahme der Vaginallavage.....	35
2.7 Aufarbeitung der Vaginallavagen .....	36
2.8 HPV-Nachweis .....	37
2.8.1 PCR .....	37
2.8.2 HPV-Genotypisierung mit der Luminex-Technologie.....	39
2.9 Datenerfassung und Auswertung .....	40
2.9.1 Berechnung der Stichprobengröße.....	40
2.9.2 Statistische Auswertung.....	41

<b>3 Ergebnisse</b>	<b>42</b>
3.1 Beschreibung der Stichprobe	42
3.1.1 Zusammensetzung der Stichprobe	42
3.1.2 Soziodemografische Daten	44
3.1.3 HPV-Genotyp-Prävalenzen in der Stichprobe HPV-positiver Frauen	46
3.2 Multiple HPV-Infektionen in ungeimpften Frauen	47
3.2.1 Prävalenzen der HPV-Typen	47
3.2.2 Prävalenzen der HPV-Typen bei ungeimpften und geimpften Frauen bei multiplen Infektionen	49
3.2.3 Untersuchung auf Assoziationen von Genotypen	50
3.2.4 Prävalenzen der HPV-Typen bei singulären und multiplen Infektionen	50
3.3 Risikofaktoren für multiple Infektionen in ungeimpften Frauen	53
<b>4 Diskussion</b>	<b>56</b>
4.1 Multiple Infektionen	56
4.1.1 HPV-Prävalenzen und Anzahl multipler Infektionen unter den HPV-positiven Frauen	56
4.1.2 Genotypenverteilung in multiplen Infektionen	58
4.1.3 Assoziationen (Patterns) zwischen Genotypen	61
4.2 Risikofaktoren für multiple Infektionen	62
4.2.1 Präservativgebrauch	64
4.2.2 Anzahl der Sexualpartner	64
4.2.3 Nikotinabusus	65
4.3 Klinische Bedeutung	65
4.4 Stärken und Schwächen der Untersuchung	66
<b>5 Literaturverzeichnis</b>	<b>68</b>
<b>6 Eidesstattliche Versicherung</b>	<b>79</b>
<b>Publikationsliste</b>	<b>82</b>
<b>Danksagung</b>	<b>83</b>

## Abkürzungsverzeichnis

$\alpha$	Alpha
ASC-H	atypical squamous cells – cannot exclude HSIL
ASC-US	atypical squamous cytology of undetermined significance
$\beta$	Beta
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
BIK-Regionen	bundesweite räumliche Gliederungssystematik
°C	Grad Celsius
Ca	Kalzium
ca.	circa
CBF	Charité Campus Benjamin Franklin
CCM	Charité Campus Mitte
CIN	zervikale intraepitheliale Neoplasie
CIS	Carcinoma in situ
d. h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Dr. med.	Doctor medicinae
E	early
E1, E2, E4, E5, E6, E7	virale Onkoproteine
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
etc.	et cetera
evtl.	eventuell
FIGO-Klassifikation	von der Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique vorgeschlagenes System zur Einteilung gynäkologischer Tumoren
FUTURE	Studie zur Wirksamkeit und Sicherheit von Gardasil
GP	general primer
GP5+/6+	Generisches Primerset für PCR
GP6+bio	GP6+ mit Biotin gekoppelt
GSK	GlaxoSmithKline
GTI-Labor	Labor für gynäkologische Tumorummunologie
HC2	Hybrid Capture II
HPV	humane Papillomviren
HR	high-risk
HSIL	high-grade squamous intraepithelial lesion
ICTV	International Committee of the Taxonomy of Viruses
KI	Konfidenzintervall
l	Liter
L	late
L1	major capsid protein, virales Strukturprotein, "Late 1"
L2	minor capsid protein, virales Strukturprotein, "Late 2"
LCR	long control region

LR	low-risk
LSIL	low-grade squamous intraepithelial lesion
M	Molar, Mol/Liter
max.	maximal
MFI	Median der Fluoreszenz-Intensität
min	Minute
mind.	mindestens
Mg	Magnesium
µm	Mikrometer
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
ml	Milliliter
mM	Millimolar, Millimol/Liter
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
MY09/11	generisches Primerset für PCR
n	Fallzahl in einer statistischen Gruppe
neg.	negativ
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
Nr.	Nummer
NTP	Nukleosidtriphosphat
OR	Odds Ratio
ORF	open reading frame
Pap-Abstrich	Zervixabstrich nach Papanicolaou
PBS	phosphate buffered saline
p chi <sup>2</sup>	Pearson Chi-Quadrat-Test
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PCR-EIA	PCR-Enzymimmunoassay
PD	Privatdozent
pH	potentia hydrogenii
PLZ	Postleitzahl
pos.	positiv
%	Prozent
PV	Papillomviren
®	registered trademark
RKI	Robert Koch-Institut
RLB	reverse line blotting
RLU	relative light units
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	revolutions per minute
s	Sekunde
SOP	standard operating procedure
SPF10	generisches Primerset für PCR
Standardabw.	Standardabweichung

Streptavidin-PE	Streptavidin-Phycoerythrin
s. u.	siehe unten
TE-Puffer	in der molekularen Biologie häufig verwendete Pufferlösung bestehend aus Tris und EDTA
TNM-Klassifikation	Facettenklassifikation zum Staging von Tumorerkrankungen
UV	ultraviolett
V	Volt
VIN	vulväre intraepitheliale Neoplasie
VLP	virus-like particle
WHO	World Health Organization
xMAP	Multianalyt Profiling
z. B.	zum Beispiel



## **Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: HPV-assoziierte Krankheiten	18
Tabelle 2: Klassifikation der Zervixzytologie im Überblick	21
Tabelle 3: Vergleich TNM- und FIGO-Klassifikation	23
Tabelle 4: Literaturübersicht multiple Infektionen	28
Tabelle 5: Vergleich von Stichprobe und Allgemeinbevölkerung	44
Tabelle 6: Anzahl der Infektionen in HPV-positiven Frauen	46
Tabelle 7: Präsenz der Genotypen bei multiplen Infektionen in ungeimpften Frauen	48
Tabelle 8: Vergleich HPV-Prävalenzen in ungeimpften und geimpften Frauen mit multipler Infektion	49
Tabelle 9: Risikofaktoren für multiple Infektionen in ungeimpften Frauen	54
Tabelle 10: Risikofaktoren für multiple HPV Infektionen in ungeimpften Frauen, multivariate Analyse	55

## **Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1: Elektronenmikroskopisches Bild eines Papillomvirus	13
Abbildung 2: Phylogenetischer Baum mit 118 Papillomavirustypen	14
Abbildung 3: Schematische Darstellung des Aufbaus eines HR-HPV-Genoms	16
Abbildung 4: BIK-Regionen im Überblick	33
Abbildung 5: Delphi Bioscience B.V. Selbstabnahmeggerät	36
Abbildung 6: Zusammensetzung der Stichprobe	43
Abbildung 7: Vergleich Merkmale HPV-positiver ungeimpfter und geimpfter Frauen	45
Abbildung 8: Verteilung Genotypen bei multiplen Infektionen in ungeimpften Frauen	47
Abbildung 9: Vergleich Genotypenverteilung in ungeimpften Frauen bei singulären und multiplen Infektionen	52

## Zusammenfassung

**Hintergrund:** HPV-Infektionen sind die am häufigsten sexuell übertragenen Infektionen weltweit. 14 HPV-Typen der über 206 bekannten HPV-Genotypen werden nach der WHO zur High-risk-Gruppe gezählt und sind eng ätiologisch mit dem Zervixkarzinom verknüpft. Fast 70% aller Zervixkarzinomfälle liegt eine persistierende Infektion mit HPV-Typ 16 und 18 zu Grunde. Ziel dieser Untersuchung war eine Prävalenzerhebung der multiplen Infektionen sowie die Identifikation von Risikofaktoren für multiple Infektionen.

**Methoden:** Im Rahmen einer HPV-Prävalenzstudie erfolgte eine bevölkerungsbasierte Untersuchung der multiplen HPV-Infektionen mittels eines Selbstabnahme-Sets bei Frauen zwischen 20 und 25 Jahren. Eingeschlossen wurden Frauen im Alter von 20 bis 25 Jahren mit Hauptwohnsitz in Deutschland. Die Teilnehmerinnen erhielten ein Selbstabnahme-Set zur vaginalen Spülung sowie einen Fragebogen zu demografischen Angaben und zur Krankengeschichte zugeschickt. Die HPV-DNA aus der Vaginallavage wurde mittels GP5+/6+ PCR amplifiziert. Die HPV-Typisierung erfolgte mittels Luminex-Technologie mit Bestimmung von 14 high-risk-, 4 potentiellen high-risk- und 6 low-risk-HPV-Genotypen. Die Ergebnisse wurden in einer deskriptiven Analyse in Prozentangaben mit einem 95% Konfidenzintervall (95% KI) analysiert. Die Risikofaktoren für eine multiple Infektion wurden mithilfe einer Multivarianzanalyse bewertet. Das Signifikanzniveau wurde bei  $p < 0,05$  festgelegt.

**Ergebnisse:** Zwischen Oktober 2010 und Dezember 2012 wurden insgesamt 787 Proben untersucht. Davon wurden 298 HPV-positive Frauen eingeschlossen. Das Durchschnittsalter der Teilnehmerinnen lag bei 22,6 Jahren. Bei 45,9% der HPV-positiven Frauen lag eine multiple Infektion mit mehreren Genotypen vor. Bei fast allen Frauen (99%) mit multipler Infektion konnte ein HR-Typ nachgewiesen werden. Dabei konnte keine signifikante Assoziation zwischen den Genotypen beobachtet werden, eine Patternbildung fand nicht statt. Als Risikofaktoren für multiple HPV-Infektionen konnte „Leben in einer Großstadt“ (OR 2,37 mit 95% KI 1,11–5,06,  $p=0,03$ ), eine „erlebte Schwangerschaft“ (OR 2,97 mit 95% KI 1,10–7,10,  $p=0,03$ ) sowie eine „höhere

Schulbildung“ (OR 5,15 mit 95% KI 1,48–17,88,  $p=0,01$  und OR 3,45 mit 95% KI 1,05–11,35,  $p=0,04$ ) identifiziert werden.

**Schlussfolgerung:** In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass multiple Infektionen in der Studienpopulation häufig sind. Dies ist die erste bevölkerungsbasierte Untersuchung über multiple Infektionen und ihre Risikofaktoren in Deutschland. Es wurde ein Basisdatensatz für weitere Untersuchungen in der Postvakzin-Ära (HPV-Impfung) und weitere Daten zur Überarbeitung des Gebärmutterhals-Screeningalgorithmus geschaffen.

## **Abstract**

**Background:** HPV-infections are the most common sexually-transmitted infections worldwide. 14 of over 206 known HPV-genotypes are classified according to the WHO as high-risk and they are linked to the development of cervical cancers. Almost 70% of cervical cancer is caused by persistent infection with HPV-types 16 and 18. We conducted a nationwide population-based study investigating multiple HPV-infections in young women (20 to 25 years) in Germany using a self-sampling set. The aim was to describe the prevalence of multiple infections in young women in Germany and to find risk factors for multiple infections.

**Methods:** Between October 2010 and December 2012 we conducted a population-based cross-sectional study in Germany to determine multiple HPV prevalence, genotype distribution and risk factors for multiple HPV-infection in women aged 20 to 25 years with principal residence in Germany. Women were recruited by a two-step cluster sampling approach. Using home-based self-collection of cervicovaginal lavages, the specimens were analysed via a general primer GP5+/GP6+-based polymerase chain reaction and genotyped for 14 high-risk, 4 potential high-risk and 6 low-risk HPV-strains and tested by Luminex-based multiplexed genotyping. The results are demonstrated as descriptive analyses with a 95% confidence intervall. The risk factors are analysed via analysis of variance (ANOVA) and the level of significance was determined as  $p<0,05$

**Results:** Among 787 included women, 298 were HPV-positive. In 45.9% of this subsample, a multiple infection was detected. Almost all women (99%) were infected with a HR-type. There were no significant associations for coinfections found. „Living in a major city“ (OR 2.37 95% CI 1.11–5.06, p=0.03), „undergone pregnancy“ (OR 2.97 95% CI 1.10–7.10, p=0.03) and a „high educational status“ (OR 5.15 95% CI 1.48–17.88, p=0.01 and OR 3.45 95% CI 1.05–11.35, p=0.04) were independently associated with multiple HPV-infection.

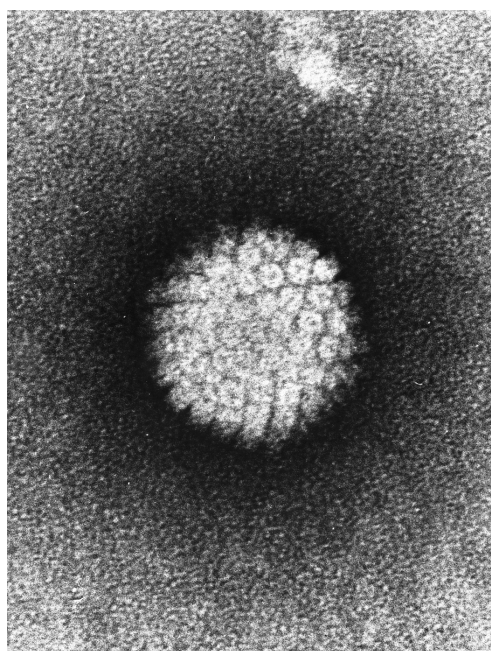
**Conclusion:** We demonstrate a high prevalence of multiple HPV-infections in young women in Germany. This is the first population-based cross-sectional study about multiple infections in Germany. The results provide important data for future studies and the prevalence of HPV in the postvaccine-era. Furthermore, provided data can be used for the improvement of the cervical cancer screening.

# 1 Einführung

## 1.1 Das humane Papillomvirus

Der Name humanes Papillomvirus (HPV) setzt sich aus dem lateinischen Wort „papilla“ („Warze“) in Verbindung mit dem griechischen Suffix „-oma“ zusammen und bedeutet so viel wie „warzenartige Schwellung“ (1).

Das hüllenlose Papillomvirus besitzt doppelsträngige, zirkuläre DNA (6800–8400 bp) und ein Kapsid mit Ikosaeder-Symmetrie (45–55nm) (2).



**Abbildung 1:**  
Elektronenmikroskopisches Bild eines Papillomvirus (3)

Die humanen Papillomviren werden zur stetig wachsenden Familie der Papillomaviridae gezählt. In dieser Familie sind über 206 Genotypen beschrieben (4, 5) die in 16 Genera (Gattungen) unterteilt werden (6).

Unter den HPV werden mehr als 206 HPV-Typen, die anhand ihrer DNS in fünf Genera unterteilt werden, beschrieben: alpha-papillomavirus, beta-papillomavirus, gamma-papillomavirus, mu-papillomavirus and nu-papillomavirus (7). Die HP-Viren sind stark gewebespezifisch und infizieren die Epithelien der genitalen und oralen Schleimhaut sowie der Haut (8). Speziell die Viren der Gattung

alpha werden auch als genital-mukosale Typen bezeichnet, weil sie vor allem die menschliche Genitalschleimhaut infizieren. Basierend auf dem onkogenen Potential werden bei diesen Typen sogenannte low-risk (LR) und high-risk (HR) Typen unterschieden. Die low-risk-Typen verursachen gutartige kutane Läsionen (z.B. Condylome) und die high-risk-Typen sind mit Dysplasien und maligner Entartung von epithelialen Zellen im Anogenital- und Oropharyngealraum assoziiert. Aktuell werden nach WHO 14 HPV-Typen zur Hochrisikogruppe gezählt (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73) und 12 zur Niedrigrisikogruppe (6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81, und CP6108). Bei vier Genotypen (26, 53, 66 und 82) ist das Risikoprofil noch nicht abschließend geklärt (9).

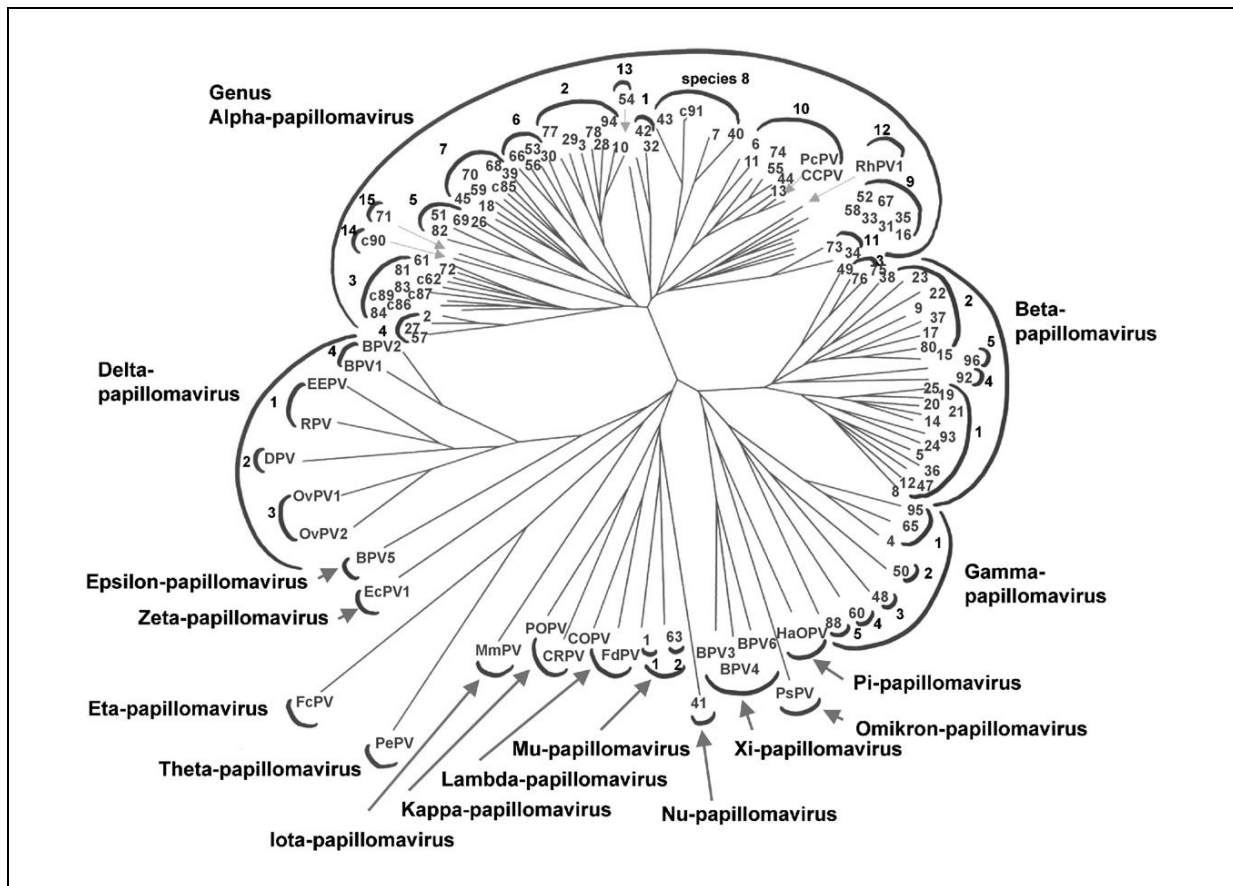


Abbildung 2: Phylogenetischer Baum mit 118 Papillomavirustypen (4)

## 1.2 Infektionsverlauf und molekulare Mechanismen der Karzinogenese

Bei den HP-Viren handelt es sich um den am häufigsten sexuell übertragenen Erkrankungserreger weltweit (10, 11). Die Übertragung erfolgt durch engen Kontakt oder über Schmierinfektionen sowie vertikal von Mutter zu Kind (12).

HP-Viren sind sehr wirts- als auch gewebespezifisch. Es sind epitheliotrope Viren, da die Zielzellen die Basalzellen (Keratinocyten) der Epithelien (z. B. Vulva-, Vagina-, Cervix-, Anal-, Oropharyngeal-, Epidermal-, Penis-Epithel) sind. Mehr als 40 Subtypen infizieren die anogenitale Mukosa. Die Prädilektionsstelle bildet die Transformationszone am Gebärmutterhals der Frau, an der das nicht-verhornende Plattenepithel der Ektozervix (Portio vaginalis) in das endozervikale Zylinderepithel übergeht. Eine Infektion erfolgt durch Mikroläsionen im Epithel, was den Zugang zu den proliferierenden Zellen der Schleimhäute ermöglicht. Nach Bindung an

Rezeptoren der Basalzellen werden die Viruspartikel per Endozytose in die Zelle geschleust und dann zum Zellkern transportiert. Infizierte virusproduzierende Zellen zeigen ein besonderes morphologisches Bild und werden als Koilozyten bezeichnet (13).

### *Molekulare Mechanismen*

Die Virus-DNA liegt zunächst episomal vor und kodiert acht bis zehn Proteine in einer Größe von 7 bis 73 kDa. Die Transkription wird in eine frühe und eine späte Phase unterteilt. Die frühe Phase wird durch einen bestimmten Bereich des Genoms kodiert, der deswegen als „Early Region“ bezeichnet wird. Dieser verfügt über neun bis zehn „open reading frames“ (ORF) und kodiert die viralen Proteine E1 und E2 als regulatorische Proteine sowie E5, E6 und E7, welche die DNA-Replikation induzieren. Desweiteren E4, welches die Reifung und Freisetzung der Viren bewirkt.

Eine weitere Region, welche die späte Phase kodiert, besteht aus zwei ORF und enthält Informationen für die Strukturproteine L1 major- (L1) und L2 minor-Protein (L2). Diese werden erst exprimiert, wenn sich die Zelle im Stratum spinosum oder granulosum befindet. Zudem enthält sie noch eine Region mit ca. 1000 bp, die Informationen für die Kontrolle der Transkription und für die virale Amplifikation enthält (Upstream Regulatory Region: URR) (14, 15). Die Virusreplikation und der Viruslebenszyklus sind stark mit der Zelldifferenzierung im Plattenepithel synchronisiert.

Eine besondere Rolle bei der Krebsentstehung spielen die Onkoproteine E6 und E7 (16). Durch diese wird der Proliferationszyklus der differenzierenden Epithelzellen aufrechterhalten. Hierbei bindet E6 (anti-apoptotisch) das Tumorsuppressorprotein p53 und E7 (mitogen) interagiert mit dem Tumorsuppressorprotein pRB. Dadurch wird die Apoptose gestoppt, welche durch die typischen Tumorsuppressorgene initiiert worden wäre. Folglich kommt es zur Immortalisation der entarteten Zellen. Abschließend erfolgt die Viruspartikelfreisetzung durch die oberen Zellen des Epithels.

## Karzinogenese

Schwere Dysplasien entstehen nach einer Störung des Zellzyklus durch eine persistierende Infektion über mehrere Jahre. Durch Inhibition der Apoptose kommt es zur Akkumulation von genetischen Veränderungen, die letztlich zur malignen Transformation der Zelle führen. Es besteht weiterhin großer Forschungsbedarf hinsichtlich der Immunantwort des Körpers und die Möglichkeiten der Elimination der Viren durch das Immunsystem. Bekannt ist, dass eine Immunsuppression wie beispielsweise eine HIV-Infektion einen Risikofaktor darstellt (17).

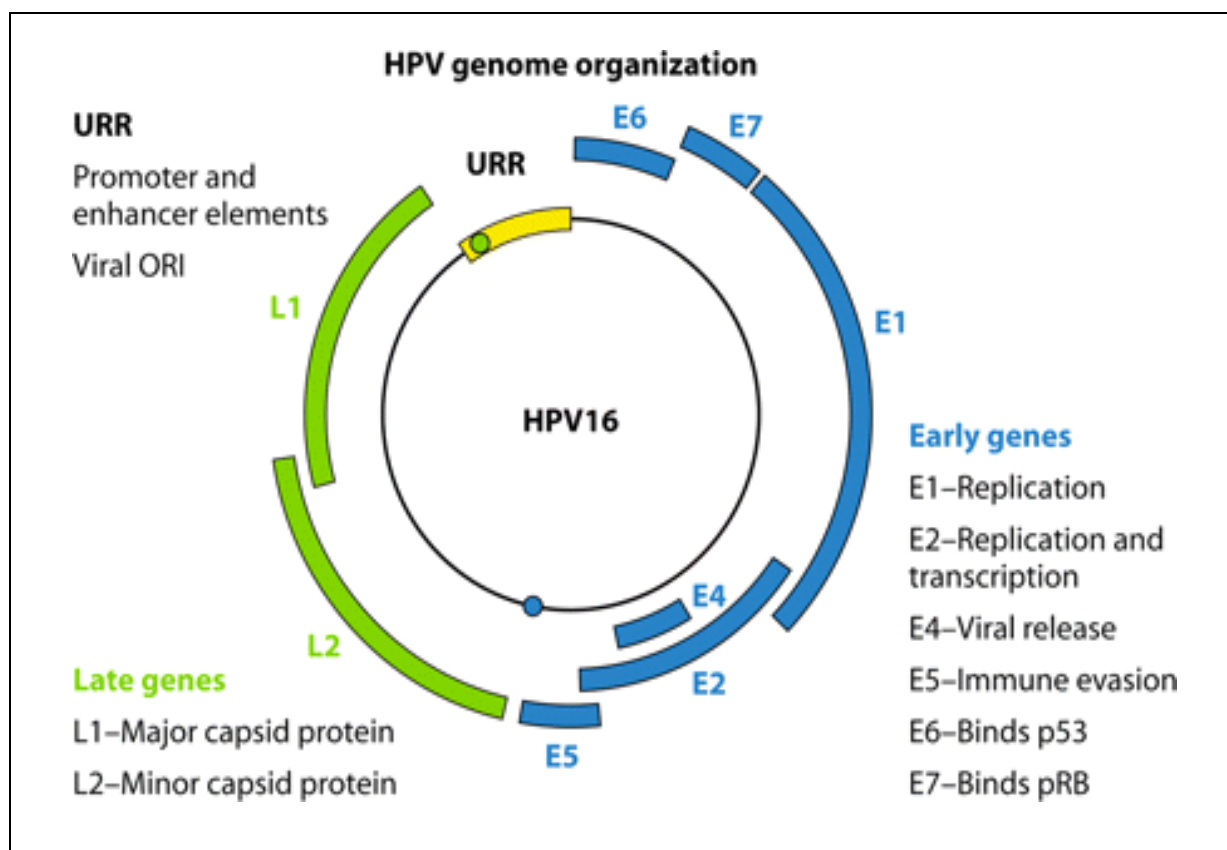


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Aufbaus eines HR-HPV-Genoms (entnommen aus (18))

### 1.2.1 Epidemiologie der anogenitalen HPV-Infektion

#### Weltweit

Die Schätzung der HPV-Prävalenz bei Frauen variiert je nach Studie weltweit zwischen 2 bis 44% und europaweit zwischen 2 bis 36% (19, 20). Dieses große Prävalenzspektrum kommt durch unterschiedliche Altersklassen und



unterschiedliche Studiendesigns zustande. Die HPV-Prävalenz ist altersabhängig: Sie erreicht einen ersten Höhepunkt mit einer Prävalenz von bis zu 50% bei jungen Frauen zwischen 20 und 30 Jahren, sinkt in der mittleren Altersgruppe (30 bis 35 Jahre) und zeigt bei Frauen zwischen 35 und 44 Jahren bzw. zwischen 46 und 50 Jahren einen erneuten Anstieg in den peri- bzw. postmenopausalen Jahren (21). In einer finnischen Studienpopulation wurde die Lebenszeitprävalenz für eine zervikale HPV-Infektion mit über 80% gemessen (22). Dazu passen die Untersuchungen von Workowski et al. (23), nach denen 75 bis 80% der sexuell aktiven Frauen eine genitale HPV-Infektion im Alter von 50 Jahren erlitten hatten.

### *Deutschland*

Für Deutschland liegen Zahlen von Iftner et al. (24) mit einer Prävalenz (Frauen 10 bis 30 Jahre alt) von 28,3% vor. Bekannte Risikofaktoren für eine Infektion sind Promiskuität, Nikotinabusus, Immunsuppression und frühe Kohabitarche (24-27).

In einer prospektiven Studie in Wolfsburg wurde eine Prävalenz der high-risk Genotypen von 22 bis 24% geschätzt (28). Diese Studie war die erste populationsbezogene Untersuchung in Deutschland. In einer Arbeit von Klug et al. (29) konnte die Prävalenz von HPV 16 in HPV-positiven Frauen mit 26,8% am häufigsten nachgewiesen werden. HPV 31 wurde bei 10,9% gefunden und HPV 18 bei 7,7%.

## **1.3 HPV und Krebs**

15 HPV-Typen gelten als karzinogen. HPV ist zentral in der Entwicklung eines Zervixkarzinoms und kann in 99,7% der Zervixkarzinome nachgewiesen werden (30). Außerdem werden durch HPV neben prämaligen Neoplasien am Gebärmutterhals die meisten Analkarzinome (88%) sowie ein Anteil der Vaginal- (70%), Vulva- (43%), Penis- (50%) als auch der oropharyngealen (26%) Karzinome ausgelöst. Weltweit gelten 70% der Gebärmutterhalskarzinome als durch HPV 16 und 18 verursacht. Unter den HPV-positiven Neoplasien wurde HPV 16 in 60% der vaginalen, 80% der analen, 60% der penilen und 95% der oropharyngealen Karzinome gefunden. HPV 6 und 11 sind als nicht karzinogen klassifiziert und für fast 100% der Genitalwarzen und respiratorischen Papillomatose verantwortlich (31) (siehe Tabelle 1).

Tabelle 1: HPV-assoziierte Krankheiten (7)

Genus		HPV-Typ	Krankheit
alpha	mukosal high-risk	16	Adenokarzinom Gebärmutterhals Plattenepithelkarzinom Gebärmutterhals Oropharyngeale Malignome Analkarzinom
		18	Adenokarzinom Gebärmutterhals Plattenepithelkarzinom Gebärmutterhals Analkarzinom
		31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59	Plattenepithelkarzinom Gebärmutterhals
	mukosal low-risk	6, 11	benigne genitale Läsionen Condylomata accuminata Respiratorische Papillomatose
		13, 32	Fokale epitheliale Hyperplasie (M. Heck)
mu	kutan benigne	2, 3, 27, 57	Hautwarzen
		1	Hautwarzen

Der Großteil der HPV-Infektionen sind transiente Infektionen und heilen in 4 bis 20 Monaten aus, verlaufen asymptomatisch und verursachen keine Neoplasien (13, 17). Erst persistierende Infektionen erhöhen das Risiko für Dysplasien, Präkanzerosen und invasive Karzinome der Zervix- und Analmukosa und besonders häufig Vagina-, Vulva- und Peniskarzinome. Die Persistenz einer HPV-Infektion ist in der Literatur uneinheitlich definiert. Aus praktischen Gründen wird häufig von einer persistierenden Infektion gesprochen, wenn der gleiche HPV-Typ mehrmals in einer bestimmten Zeit nachgewiesen wird. Normalerweise sind diese Zeiträume zwischen einigen Monaten (>6 Monate) bis zu einem Jahr gewählt (32). Bei einer persistierenden Infektion dauert es durchschnittlich 15 Jahre bis invasiver Krebs entstanden ist (33).

## 1.4 Das Zervixkarzinom

### 1.4.1 Epidemiologie

Weltweit handelt es sich bei dem Zervixkarzinom um die zweithäufigste geschlechtsspezifische Neoplasie (nach dem Mammakarzinom) der Frau. Im Jahr 2012 konnten ca. 528.000 Neuerkrankungen und 266.000 Todesfälle weltweit registriert werden. Das Zervixkarzinom ist nach dem Mammakarzinom der zweithäufigste Grund für das vorzeitige Ableben durch Malignomerkrankungen unter Frauen in den weniger entwickelten Ländern (34).

84% der Zervixkarzinomfälle treten in weniger entwickelten Ländern auf. Besonders hohe Inzidenzen sind in Subsahara-Afrika, Lateinamerika und der Karibik sowie in Melanesien (pazifische Inselgruppe nordöstlich von Australien) zu verzeichnen. In Westasien, Australien, Neuseeland und Nordamerika gibt es dagegen niedrige Inzidenzraten(35). Der große geografische Unterschied der Inzidenzen von Gebärmutterhalskrebs spiegelt die großen Differenzen bei der Prävention und Therapie von Präkanzerosen wider. Vor allem in Entwicklungsländern ist das Zervixkarzinom die häufigste malignomassozierte Todesursache (36, 37). Die Sekundär-Prävention in den entwickelten Ländern mittels Screening und Therapie der Krebsvorstufen hat zu einer Reduktion der Inzidenz und Mortalität um 75% in den letzten 50 Jahren geführt (38). Aus dem saarländischen Krebsregister ist zu entnehmen, dass von 1971 bis 2006 die Inzidenz von Zervixkarzinomen von ca. 40 Erkrankungen pro 100.000 Frauen auf etwa 10,6 zurückgegangen ist. Die Mortalität sank im selben Zeitraum von ca. 7,6 auf 2,7 Fälle pro 100.000 Frauen (39).

#### *Deutschland*

Im Jahre 2012 gab es laut RKI 4600 registrierte Zervixkarzinom-Neuerkrankungen in Deutschland. Weltweit liegt die Inzidenz bei 527.624, wobei 444.546 Neuerkrankungen in weniger entwickelten Ländern und 83.078 in mehr entwickelten Ländern erwartet wurden (40). Jährlich sterben in Deutschland ca. 1600 Frauen am Zervixkarzinom und die relative 5-Jahres-Überlebensrate nach Diagnose eines invasiven Zervixkarzinoms liegt seit Jahren stabil bei 68% (41). Die Erkrankungsraten sind dabei innerhalb Deutschlands sehr unterschiedlich. Im Saarland wird die höchste Inzidenz angegeben, gefolgt von Thüringen, Brandenburg,

Berlin und Hamburg. Während in Tschechien, Polen, Dänemark und Belgien die Erkrankungsraten höher liegen als in Deutschland, werden aus Finnland, der Schweiz und den USA die niedrigsten Inzidenz- und Mortalitätsraten berichtet.

### 1.4.2 Pathogenese

Keine andere Krebserkrankung ist ätiologisch so eng mit einer Infektion verbunden. In 99,7% der Fälle konnten HPV in zervikalen Neoplasien nachgewiesen werden (30). Schiffman et al. (42) haben folgende Schritte der Entwicklung von Zervixkarzinomen identifiziert:

1. Infektion mit einem HR-Typen in der Transformationszone (Grenzzone zwischen dem Zylinderepithel der Endozervix und dem mehrschichtigen unverhornten Plattenepithel der Ektozervix)
2. Persistierende Infektion
3. Progress von einem Zellklon der epithelialen Zellen mit persistierender Infektion zu Präkanzerose
4. Entwicklung von einem Karzinom und Durchbrechen der Basalmembran

### 1.4.3 Histopathologie

Die Diagnose des Zervixkarzinoms wird anhand einer Biopsie gestellt. Die histologische Unterteilung der Zervixkarzinome erfolgt in:

- Plattenepithel-Karzinome (ca. 80%)
  - verschiedene Subdifferenzierungen: verhornend, nicht verhornend, basaloid, verrukös, papillär etc.
- Adenokarzinome (ca. 20%)
  - verschiedene Subdifferenzierungen: serös, muzinös, endozervikal, endometrioid etc.; am häufigsten: endozervikaler Typ

Selten sind Mischkarzinome und neuroendokrine Karzinome zu beobachten. 50% der Plattenepithelkarzinome werden durch HPV 16 bedingt (43-45). In der letzten Dekade ist eine Zunahme der Inzidenz von Adenokarzinomen zu verzeichnen, bei welchen eine erhöhte Assoziation zu HPV 18 nachgewiesen wurde (46, 47).

## 1.4.4 Klassifikation

### 1.4.4.1 Zervikale intraepitheliale Neoplasie

Die zervikale intraepitheliale Neoplasie (CIN) bildet die Vorstufe zur Entwicklung eines invasiven Zervixkarzinoms. Es erfolgt die Einteilung anhand der Zervixzytologie, welche im Rahmen einer regulären Vorsorgeuntersuchung beim Gynäkologen mit einem Spatel ektozervikal und einem Zervixbürstchen endozervikal gewonnen wird und auf einen Objektträger ausgestrichen wird (Pap-Abstrich). Danach erfolgten die spezielle Färbung nach Papanicolaou und die mikroskopische Auswertung (vgl. Tabelle 2).

**Tabelle 2: Klassifikation der Zervixzytologie im Überblick (48, 49)**

Zytologischer Befund	WHO Nomenklatur (CIN)	Münchner Nomenklatur III (Pap)	Bethesda	Procedere
unzureichendes Material	-	0	Unsatisfactory for evaluation	Kontrolle in ca. 3–6 Monaten
Normales Zellbild	-	I	<b>NILM</b>	Kontrolle in ca. 12 Monaten
leichte entzündliche, degenerative oder metaplastische Veränderungen	-	II	<b>ASC-US AGC</b>	Kontrolle in ca. 6 Monaten
unklarer Befund: schwere entzündliche/degenerative Veränderungen, eine Dysplasie, ein Carcinoma in situ oder (in seltenen Fällen) ein Malignom können nicht ausgeschlossen werden	-	III	<b>ASC-H AGC</b>	nach klinischem Befund: kurzfristige Kontrolle/histologische Abklärung, Differenzialkolposkopie
leichte Dysplasie	<b>CIN 1</b>	<b>IIID1</b>	<b>LSIL</b>	Kontrolle in ca. 6 Monaten
mäßige Dysplasie	<b>CIN 2</b>	<b>IIID2</b>	<b>HSIL/AIS</b>	Kontrolle in ca. 3 Monaten
schwere Dysplasie, Carcinoma in situ	<b>CIN 3</b>	<b>IVa-p</b>		Differentialkolposkopie, histologische Klärung/operative Entfernung, kurative Absicht
invasives Karzinom	-	<b>V</b>	<b>Karzinom</b>	histologische Klärung

Die Ergebnisse werden nach der Münchner Nomenklatur III klassifiziert. Der histologische Befund (nach einer Biopsie) wird nach der WHO-Klassifikation der zervikalen intraepithelialen Neoplasien beschrieben. Im angelsächsischen Raum wird die Bethesda-Klassifikation eingesetzt. Je nach Befund erfolgt dann eine Kontrolluntersuchung bzw. Therapie.

#### **1.4.4.2 Stadieneinteilung**

Zur klinischen Einteilung des Zervixkarzinoms wird die TNM-Klassifikation und optional die Systematik der „International Federation of Gynecology and Obstetrics“ (FIGO) benutzt (siehe Tabelle 3). Hierfür erfolgt eine gynäkologische Untersuchung (einschließlich vaginaler und rektaler Palpation, Inspektion, Kolposkopie), eine Zervixbiopsie und eine Nierensonografie, zusätzlich stadienabhängig evtl. Zysto- und Rektoskopie, Computertomografie Thorax/Abdomen, MRT Becken oder ein operatives Staging.

Tabelle 3: Vergleich TNM- und FIGO-Klassifikation

FIGO	TNM	
	Tx	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
	T0	Kein Anhalt für Primärtumor
0	Tis	Carcinoma in situ
I	T1	Karzinom begrenzt auf Uterus
la	T1a	Mikroinvasives Karzinom, kann nur histologisch gesichert werden
la1	T1a1	Invasionstiefe max. 3 mm, Oberflächenausdehnung max. 7 mm
la2	T1a2	Invasionstiefe max. 3–5 mm, Oberflächenausdehnung max. 7 mm
lb	T1b	klinisch erkennbare Läsion/mikroskopische Ausdehnung größer als la
lb1	T1b1	klinisch erkennbare Läsion, nicht größer als 4 cm
lb2	T1b2	klinisch erkennbare Läsion, größer als 4 cm
II	T2	Uterus überschritten, Beckenwand und unteres Drittel der Vagina nicht erreicht
Ila	T2a	Vagina befallen, Parametrien frei
Ila1	T2a1	klinisch erkennbare Läsion, nicht größer als 4 cm
Ila2	T2a2	klinisch erkennbare Läsion, größer als 4 cm
Ilb	T2b	Parametrien/Vagina und Parametrien befallen
III	T3	Befall der Parametrien bis Beckenwand/Befall unteres Drittel Vagina/Hydronephrose
IIIa	T3a	Befall unteres Drittel Vagina
IIIb	T3b	Befall Parametrien bis Beckenwand/Hydronephrose
IV	T4	Infiltration von Blasen-/Rektumschleimhaut
Ivb	M1	Metastasen außerhalb des kleinen Beckens
	Nx	Lk nicht beurteilbar
	N0	keine Lk-Metastasen
	N1	regionäre Lk-Metastasen
	N4	Lk-Befall oberhalb der Aortenbifurkation/unterhalb des Leistenbandes

### **1.5 Primärprävention: Impfung gegen HPV**

Um eine Infektion mit HPV zu vermeiden und der Entwicklung einer HPV-assoziierten Neoplasie vorzubeugen, bietet sich aktuell eine Impfung als Primärprävention an. Momentan gibt es drei Impfstoffe auf dem internationalen Markt. Alle drei Impfstoffe wirken gegen HPV 16 und 18. Der bivalente Impfstoff Cervarix® (GlaxoSmithKline, Brentford, UK) wird gegen HPV 16 und 18 eingesetzt (50). Der quadrivalente Impfstoff Gardasil® (Merck & Co. Inc., Sanofi Pasteur MSD) immunisiert zusätzlich gegen HPV 6 und 11. Dieser ist seit 2006 in Deutschland zugelassen (51, 52). Der nonavalente Impfstoff Gardasil 9® (Merck & Co. Inc., Sanofi Pasteur MSD) schließlich schützt vor den HPV-Typen 6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52, 58. Letzterer ist seit Mai 2016 in Deutschland verfügbar. In den USA ist dieser seit Dezember 2014 erhältlich und seit Sommer 2015 in der EU zugelassen.

Alle Impfstoffe enthalten als Antigen „virus-like-particles“ (VLPs) der HPV. Klinische Studien haben gezeigt, dass diese Impfstoffe effektiv Krebsvorstufen (CIN 2 und 3 Adenokarzinoma in situ), welche als valide Surrogatmarker gelten, verhindern können (41). Die Impfstoffe von der Firma Merck & Co sind zusätzlich effektiv zur Vorbeugung von Genitalwarzen. Die höchste Wirksamkeit hat die Impfung bei HPV-naiven Frauen.

Die Ständige Impfkommission (STIKO) empfiehlt die Impfung von Mädchen zwischen 9 und 14 Jahren gegen HPV 16 und 18 seit 2007 (53). Bei der Impfung ist kein gesicherter therapeutischer Effekt auf bereits bestehende Infektionen beschrieben, sodass die Impfung mit zwei Dosen in einem Abstand von sechs Monaten vor der Kohabitarche abgeschlossen sein sollte (54). Es wurde eine Kreuzprotektivität gegenüber genetisch nah und weniger nah verwandten Genotypen beobachtet (Typ 31, 33 nah an 16 und 45 nah an 18) (55, 56). Neben der Impfung gegen HPV sind die Aufklärung über den Transmissionsweg und die Nutzung von Präservativen die wichtigsten Präventionsmaßnahmen für einen Schutz vor einer HPV-Infektion (57).

### **1.6 Sekundärprävention: Screening in Deutschland**

Im Jahr 1971 wurde in Deutschland zur gesetzlichen Krebsfrüherkennung die Zervixzytologie eingeführt. Im März 2015 erfolgte eine Überarbeitung der Empfehlungen, die 2017 in Kraft treten soll (58).



Bisher wird von den gesetzlichen Krankenkassen bei allen Frauen ab dem 20. Lebensjahr einmal jährlich der Zervix-Abstrich finanziert. Die im Rahmen der gesetzlichen Krebsfrüherkennung festgelegten Neuerungen sehen eine Veränderung dieses Modells zu einem Einladungsverfahren vor. Dafür schreiben die Krankenkassen alle Frauen von 20 bis 60 Jahren alle fünf Jahre an und informieren über das Screening. Im Alter von 20 bis 30 Jahren können die Frauen in Deutschland weiterhin einmal jährlich die Screening-Untersuchung in Form des Pap-Abstriches in Anspruch nehmen.

Ab einem Alter von 30 Jahren können die Frauen in einem Optionsmodell wählen:

- a) alle fünf Jahre einen HPV-Test durchführen zu lassen, nur bei Auffälligkeiten erfolgt dann ein Zellabstrich oder
- b) weiterhin jährlich das Pap-basierte Screening in Anspruch zu nehmen.

Seit der Einführung des Screenings ist eine stetige Abnahme der Mortalität des Zervixkarzinoms zu verzeichnen. In den letzten Jahren nimmt bei annähernd gleichbleibender Inzidenz des Zervixkarzinoms die Sterberate weiterhin ab (41, 58). Dies ist mit der früheren Erkennung von Krebsvorstufen und deren besserer Therapie zu erklären.

### **1.7 Multiple HPV Infektionen**

Im Vergleich zu einer singulären Infektion mit nur einem Genotyp beschreiben multiple Infektionen Koinfektionen mit mindestens zwei HPV-Genotypen. Safaeian et al. (59) postulieren die Prävalenz von multiplen Infektionen zwischen 20 und 30% der gesamten Infektionen – abhängig von Bevölkerung und Region als auch vom Studiendesign. Aktuell ist die klinische Bedeutung als auch die Ätiologie multipler Infektionen nicht vollständig geklärt. Hypothesen vermuten als Ursache einerseits eine erhöhte individuelle Vulnerabilität (immunologische Faktoren, HLA-Antigene) gegenüber HPV oder auch vermehrte Risikoakkumulation (mehr Sexpartner, Nikotinabusus etc.) (60).

Aktuell gibt es unterschiedliche Aspekte, zu denen in Zukunft eine weitere intensive Forschung nötig ist. Insbesondere die Rolle der multiplen Infektionen in der Karzinogenese ist aktuell Gegenstand der Forschung. So zeigen Schmitt et al. (61) eine signifikante Assoziation von einer hohen Viruslast mit zytologisch

nachweisbaren Präkanzerosen. Chaturvedi et al. (62) stellen fest, dass Kombinationen der HPV-Typen bei Koinfektionen zufällig sind und unabhängig zu Dysplasien führen.

Zudem gilt als gesichert, dass bei Frauen mit auffälliger Zytologie eine HR-HPV-Infektion die Wahrscheinlichkeit für die Entwicklung von CIN III im Sinne einer synergistischen Interaktion erhöht (63). Auch zu beachten ist, dass Spinillo et al. (64) in einer anderen Arbeit beschreiben, dass multiple Infektionen mit HR-Typen signifikant mit größeren Läsionen der Zervix verbunden sind. Die Bedeutung von multiplen Infektionen für die Therapie von Zervixkarzinomen wurde durch Munagala et al. (65) untersucht. In der Arbeit wird postuliert, dass Patientinnen mit multipel HPV-positiven Gebärmutterhalskarzinomen mit größerer Wahrscheinlichkeit nicht auf die Therapie (Radiatio) ansprechen.

Weitere Studien sind nötig, um die Beziehungen zwischen verschiedenen karzinogenen HPV-Typen zu untersuchen und eine Differenzierung zwischen kompetitiven und kooperativen Infektionen zur ermöglichen. Dies hat eine Bedeutung für eine mögliche Veränderung der Prävalenz in der Postvakzin-Ära: Bisher ist unklar, ob die Immunisierung gegen bestimmte HPV-Typen zu einer Verschiebung der Prävalenzen zu Gunsten der nicht im Impfstoff enthaltenen Genotypen führt. Durch weitere Untersuchungen könnte eine Verschiebung v. a. auch in den Vorläuferläsionen durch die Impfung antizipiert werden (66).

### **1.8 Aktuelle Studienlage zu multiplen Infektionen**

Bei einer Literaturrecherche in der Datenbank pubmed wurden von der Autorin elf Studien gefunden (siehe Tabelle 4). Die Heterogenität der Studiendesigns sowie die regionalen Unterschiede führen zu den schon thematisierten Unterschieden in der Prävalenz.

Rousseau et al. (67) haben in Brasilien bei 1860 Frauen (18 bis 60 Jahre) insgesamt eine HPV-Prävalenz von 13,8% gemessen und in 19% multiple Infektionen beschrieben. In Schweden haben Forslund et al. (68) in einer bevölkerungsbasierten Untersuchung bei 6123 Frauen (32 bis 38 Jahre) bei 6,8% einen positiven HPV-Test erhalten, wovon 9,1% multipel infiziert waren. Cuschieri et al. (69) haben in Schottland 3444 Frauen (16,5 bis 78 Jahre) untersucht. Hierbei waren 20% HPV-

positiv und davon 43,3% koinfiziert. Aus den USA liegen Daten von Dunne et al. (70) vor. Es wurden 2026 Frauen (14 bis 59 Jahre) eingeschlossen. Die HPV-Prävalenz lag bei 26,3% und multipel infiziert waren davon 40% (70). In der dänischen Studie von Nielsen et al. (26) wurden 10.544 Frauen (20 bis 29 Jahre) untersucht und die HPV-Prävalenz wurde mit 17,9% angegeben, hiervon gelten 58% als multipel infiziert. Es gibt zwei Veröffentlichungen aus den Niederlanden. 2008 haben Lenselink et al. (25) 2065 Frauen (18 bis 29 Jahre) untersucht und eine HPV-Prävalenz von 19% bzw. von 21% für multiple Infektionen festgestellt. Mollers et al. (71) haben bei 3874 Frauen (18 bis 24 Jahre) respektive 14% der Studienpopulation eine HPV-Infektion festgestellt, davon waren 26% der Frauen multipel infiziert. Aus Portugal berichten Pista et al. (72) HPV-Prävalenzen bei 2326 Frauen (18 bis 64 Jahre) von 19% und multipel von 36%. Carozzi et al. (59) legen Ergebnisse aus Italien dar mit HPV-Prävalenz von 74% und davon 20% multipel infiziert.

In Deutschland gab es bisher keine bevölkerungsbasierte Prävalenzstudie zu singulären und multiplen HPV-Infektionen. Speich et al. (73) haben 2004 eine Studie zur HPV-Prävalenz in Nordrhein-Westfalen durchgeführt und dabei auch multiple Infektionen untersucht. Hierbei lag die Prävalenz insgesamt bei 32,4% und für multiple Infektionen bei 14%. Im Jahr 2007 haben Klug et al. (29) ihre Daten aus Hannover und Tübingen veröffentlicht. Hier ist eine Gesamtprävalenz von HPV 6,4% und davon für multiple Infektionen mit 28,1% dargestellt.

**Tabelle 4: Literaturübersicht multiple Infektionen**

Studie, Jahr	Rousseau et al., 2001	Forslund et al., 2002	Speich et al., 2004	Cuschieri et al., 2004	Dunne et al., 2007	Klug et al., 2007	Nielsen et al., 2008	Lenselink et al., 2008	Pista et al., 2011	Carozzi et al., 2012	Mollers et al., 2014
<b>Land</b>	Brasilien	Schweden	Deutschland (Nordrhein-Westfalen)	Schottland	USA	Deutschland (Hannover +Tübingen)	Dänemark	Niederlande	Portugal	Italien	Niederlande
<b>Zeitraum</b>	November 1993 und März 1997	keine Angabe	keine Angabe	2000	2003–2004	12/1998–12/2000	1991–1993	06–09/2007	2008–2009	02/2002–12/2004	2007–2009
<b>Ausschluss-Kriterien</b>	Schwangerschaft, aktueller Kinderwunsch, Hysterektomie, Vaginalmedikation in letzten 2d, eine Behandlung wg. Cervixdysplasien in letzten 6 Monaten	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	Konisation, Hysterektomie, Schwangerschaft, Dysplasien letztes 1y	keine Angabe	keine Angabe	Impfung, Virginität, Hysterektomie, Konisation in letzten 2y, abnormal Zytologie in letzte 1y	Virginität, Schwangerschaft, Hysterektomie, CIN oder Karzinom in letzten 5y	keine Angabe
<b>Teilnehmerzahl</b>	1860	6123	2916 Proben	3444	2026	8101	10544	2065	2326	36877	3874
<b>Altersrange</b>	33,1 (18–60)	(32–38)	40,5 (17–83)	36,6 (6,5–78)	(14–59)	>30	(20–29)	(18–29)	32 (18–64)	42 (25–60)	21 (18–24)
<b>HPV</b>	HR+LR	HR	HR+LR	HR+LR	HR+LR	HR	HR	HR+LR	HR+LR	HR	HR+LR
<b>Nachweismethode</b>	PCR	PCR-EIA (polymerase chain reaction-enzyme immunoassay)	PCR	PCR	PCR	PCR/HC2	PCR	PCR	PCR	PCR	PCR

**Tabelle 4 (fortgesetzt)**

<b>Auslesemodus</b>	keine Angabe	non-radioactive reverse dot-blot hybridization reverse dot-blot hybridization	Big-Dye Terminator sequencing kit (Applied Biosystems)	linear array assay for genotyping.	Roche prototype line blot assay	prototype PGMY09/11 PCR line blot assay	LiPA; INNO-Genetics, Gent, Belgium	INNO-LiPA HPV genotyping	CLART HPV 2 assay (Genomica, Madrid, Spain)	RLB	SPF10 line probe assay
<b>Probenentnahme</b>	Abstrich	Cytobrush	keine Angabe	Abstrich	Selbstabnahme Schwamm	Abstrich	Baumwolltupfer	Selbstabnahme, Cervicalprobe	Vaginallavage	Spatula, Cytobrush	Selbstabnahme Vaginallavage
<b>Prävalenz insgesamt (%)</b>	13,8	6,8	32,5	20	26,3	6,4	17,9	19	19	74,4	14
<b>Prävalenz multiple Inf.(%)</b>	19	9,1	14	43,3	40	28,1	58	21,6	36,6	20,4	26
<b>Häufigste HR-HPV-Typen insgesamt</b>	keine Angabe	16, 31, 18, 33, 35, 39	16, 31, 18, 58, 51	keine Angabe	62, 84, 53, 89, 61	16, 31, 52, 51, 18, 45	16, 31, 52	16, 51, 52, 18, 6, 11	16, 31, 53, 51, 66, 52, 58, 59, 18	16, 31, 51	16, 51, 52 dann 54, 42, 16, 70 in singulären Inf. Und 43, 44, 45, 35, 11 in multiplen

## **1.9 Erfassung der HPV-Prävalenz in Deutschland**

Es gibt wenig Daten zu multiplen HPV-Infektionen in Deutschland. Um eine valide Schätzung der Prävalenz von HPV-Infektionen der weiblichen Bevölkerung in Deutschland zu erhalten, wurde im Jahr 2010 von Oktober bis Dezember 2012 eine bundesweite, repräsentative Studie zu HPV-Infektionen bei jungen Frauen (20 bis 25 Jahre) in Deutschland von dem Robert-Koch-Institut (RKI) in Kooperation mit dem Labor für Tumormunologie der Charité Campus Benjamin Franklin durchgeführt.

Im Rahmen der Studie wurden 787 Proben untersucht. Davon erwiesen sich 300 (38,1%, 95% KI, 34,7–41,6%) als HPV-positiv. Bei 269 Frauen (34,2%, 95% KI, 30,9–37,6%) wurde ein HR-Typ nachgewiesen, die LR-Typen ließen sich in 63 Frauen (8,0%, 95% KI: 6,2–10,1%) detektieren.

Bei der Studienpopulation war ein positiver HPV-Nachweis im Vergleich zu HPV-negativen Probandinnen signifikant mit einem Nikotinabusus, einer höheren Zahl von bisherigen Sexualpartnern sowie einer (früheren) Genitalwarzendiagnose assoziiert. Ein höherer Bildungsstatus und regelmäßiger Kondomgebrauch scheinen potentielle Schutzfaktoren vor einer HPV-Infektion zu sein (91).

Eingebettet in diese bevölkerungsbasierte Untersuchung wurde retrospektiv die Prävalenz der multiplen Infektionen in Deutschland untersucht. Dies ist die erste bevölkerungsbasierte Analyse der multiplen HPV-Infektionen in Deutschland.

### **1.10 Ziele und Fragestellung**

Die Arbeit wurde im Rahmen eines bestehenden epidemiologischen Kooperationsprojektes mit dem RKI durchgeführt (vgl. 1.9).

Ziel dieser Arbeit ist die Analyse der multiplen HPV-Infektionen bei jungen Frauen in Deutschland. Insbesondere gilt es folgende Fragestellungen zu bearbeiten:

Primäre Fragestellungen:

- Wie hoch ist die Prävalenz von multiplen Infektionen in ungeimpften jungen Frauen in Deutschland?

- Wie ist die Genotypenverteilung?

Sekundäre Fragestellungen:

- Welche Risikofaktoren spielen eine Rolle bei einer multiplen HPV-Infektion?
- Unterscheiden sich diese von den Risikofaktoren einer singulären Infektion?

## **2 Methodik**

### **2.1 Studiendesign**

Zur Bearbeitung der dargelegten Fragestellung wurde auf die Daten einer in der Zeit von Oktober 2010 bis Dezember 2012 durchgeführten bundesweiten Querschnittsstudie mit Frauen im Alter von 20 bis 25 Jahren zurückgegriffen. Die Studie wurde realisiert in Kooperation mit dem Robert-Koch-Institut (RKI) und der Abteilung für Gynäkologie der Charité Universitätsmedizin Berlin (CBF und CCM). Das Ethik-Komitee der Charité Universitätsmedizin Berlin bewilligte diese Studie durch ein Ethikvotum (EA2/028/10) und es erfolgte die Registrierung im Deutschen Register Klinischer Studien (DRKS00000599).

### **2.2 Ablauf der Rekrutierung**

Die Basis der Stichprobengewinnung bildete die Studie zur Gesundheit Erwachsener in Deutschland (DEGS1) des RKI. Die Rekrutierung erfolgte im Rahmen einer geschichteten Zufallsauswahl, mit den Studienorten als erstem und den Personen / potentiellen Teilnehmerinnen als zweitem Schichtungsmerkmal (74). Die Adressen der Personen, die die Einschlusskriterien des Alters und Geschlechts erfüllten, wurden von den jeweiligen Einwohnermeldeämtern bezogen.

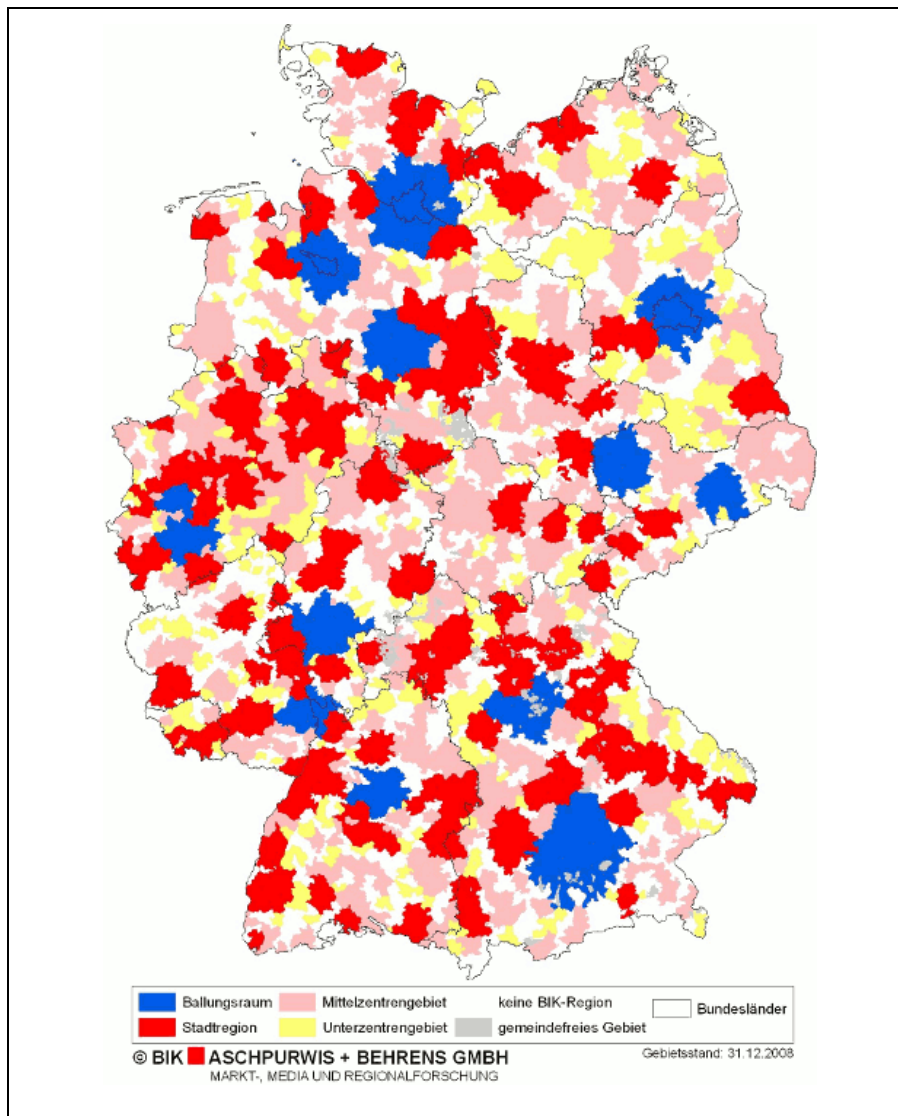
Zur ersten Kontaktaufnahme wurden die potentiellen Probandinnen im Zeitraum zwischen Oktober 2010 und September 2012 postalisch angeschrieben. Sie erhielten einen Aufklärungsbrief sowie das Informationsblatt mit der Bitte um Teilnahme an der vorliegenden Studie. Die Studienteilnehmerinnen mussten die Einverständniserklärung unterschrieben an das RKI zurücksenden und erhielten dann ein Studienpaket mit dem Selbstabnahmeset, einer Bedienungsanleitung und einem Fragebogen mit einer Identifizierungsnummer.

### **2.3 Repräsentativität der Stichprobe**

Um eine repräsentative Stichprobe zu erhalten, wurden mithilfe der BIK-Stadtregionen 180 Studienorte festgelegt (75). Bei diesen Regionen handelt es sich um eine bundesweite räumliche Gliederungssystematik, die vergleichbare Raumeinheiten unter Beachtung von Einwohnerzahl und Strukturmerkmalen wie Verstädterungsgrad u. ä. bietet. Dabei werden zehn verschiedene Größenklassen



der Gemeinden unterschieden. Die Grundgesamtheit der BIK-Stadtregionen bilden die sozialversicherungspflichtigen Beschäftigten sowie die Personen mit Hauptwohnsitz an den jeweiligen Orten. Eine Aktualisierung erfolgt jährlich mit Daten der statistischen Landesämter. In vielen Studien wurde bereits mit dem BIK-System erfolgreich gearbeitet; es gilt als etabliert zur Generierung einer repräsentativen Stichprobe.



**Abbildung 4: BIK-Regionen im Überblick**

Unter Zuhilfenahme der Cox-Prozedur für kontrolliertes Abrunden wurde die Auswahlwahrscheinlichkeit nach Gemeindegröße korrigiert (76). So wurden Ballungszentren durch mehrere Einheiten dargestellt und ländliche Regionen mit angrenzenden Regionen zu einer Einheit zusammengefasst.

Des Weiteren wurde die Gruppe der nicht-geimpften Frauen mit der allgemeinen Bevölkerung in Deutschland von Frauen im Alter von 20 bis 25 Jahren verglichen. Dabei wurden unter anderem Faktoren wie der Migrationshintergrund, Bildung und Nikotinabusus aus Daten vom 31. Dezember 2010 vom Statistischen Bundesamt (77) sowie Daten der repräsentativen GEDA-Studie (78) berücksichtigt.

#### **2.4 Ein- und Ausschlusskriterien**

In die Studie wurden alle nach dem oben beschriebenen Verfahren ausgewählten Frauen mit Hauptwohnsitz in Deutschland eingeschlossen, die zum Studienzeitpunkt im Alter von 20 bis 25 Jahren waren. Eine Studienteilnahme war nicht möglich, wenn aktuell eine Schwangerschaft, eine Geburt vor weniger als 30 Tagen oder eine Konisation in der Vorgeschichte vorlagen. Jede eingeschlossene Probandin hatte der Studienteilnahme schriftlich zugestimmt und die Einverständniserklärung unterschrieben zurückgesendet.

#### **2.5 Fragebogen und Definition der Variablen**

Mithilfe eines 24 Fragen umfassenden Erhebungsbogens wurden folgende Daten ermittelt:

- Demografische Daten (wie Alter, Staatsangehörigkeit, Migrationshintergrund, Bildung, Nettoeinkommen)
- Daten zum Sexualverhalten (wie Alter beim ersten Geschlechtsverkehr, Anzahl der Sexualpartner insgesamt und in den letzten 12 Monaten, Nutzung von Präservativen bei One-Night-Stands, Beziehungsstatus)
- Medizinische Vorgeschichte (diagnostizierte Genitalwarzen, chronische Erkrankungen, Teilnahme am Gebärmutterhalskrebs-Screening, Schwangerschaften)
- Raucheranamnese (Raucher oder Nichtraucher, Zigaretten pro Tag, Dauer des Nikotinkonsums)
- Impfanamnese HPV (Anzahl der geimpften Dosen, Marke des Impfstoffs, Datum der Impfungen)
- Bewertung der Durchführbarkeit der Selbstabnahme der Vaginallavage auf einer Skala von 1 (sehr einfach) bis 6 (sehr schwer)

Ein ähnlicher Fragebogen fand bereits in der Pilotstudie Anwendung (79).

Für die Auswertung wurden folgende Variablen definiert:

Analog zum deutschen Bildungssystem wurde der **Bildungsgrad** in drei Kategorien (niedrig, mittel, hoch) erfasst. Ein niedriger Bildungsstand beinhaltet alle Probandinnen ohne Abschluss oder mit Hauptschulabschluss. Unter dem mittleren Bildungsstand wurden alle Frauen mit Realschulabschluss subsummiert. Als hoher Bildungsstand galt ein Schulabschluss mit Abitur oder Fachabitur.

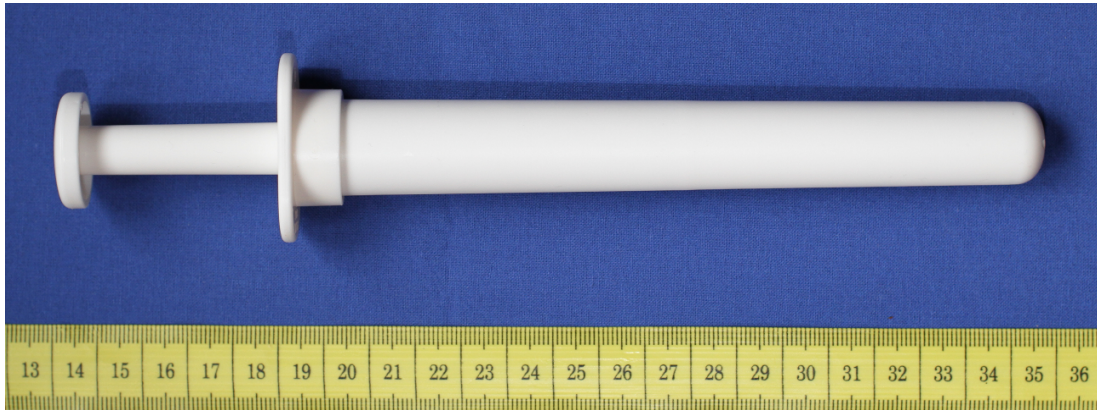
**Früher erster Geschlechtsverkehr** wurde definiert, wenn die Probandinnen beim ersten Geschlechtsverkehr jünger als 14 Jahre alt waren. Dies entspricht in der Erhebung der 20. Perzentile der Verteilung dieser Variable. Teilnehmerinnen zählten nach Erhalt mindestens einer Impfdosis als geimpfte Probandinnen. Die durchschnittliche **Zeit zwischen dem ersten Geschlechtsverkehr und der ersten Impfung** wurde durch Subtraktion des Alters bei der ersten Impfung von dem Alter beim ersten Geschlechtsverkehr, geteilt durch alle geimpften Frauen mit auswertbaren Informationen (n=173) berechnet.

Ein **Migrationshintergrund** lag vor, wenn die Probandin selbst oder ein Elternteil nicht in Deutschland geboren wurde. Die Unterteilung der Teilnehmerinnen anhand des Alters erfolgte in drei Gruppen: 20 bis 21 Jahre, 22 bis 23 Jahre und 24 bis 25 Jahre, um eine differenzierte altersbezogene Prävalenz angeben zu können. Eine **Großstadt** wurde ab einer Einwohnerzahl von 500.000 (Stand 31.12.2010) definiert und Berlin wurde zu Westdeutschland gezählt. Alle mit den Fragebögen erhobenen Daten basieren auf der Selbstauskunft der Probandinnen und wurden vom Studienteam nicht validiert.

## 2.6 Selbstabnahme der Vaginallavage

Neben dem Fragebogen erhielten die Teilnehmerinnen das Selbstabnahmeset zur Probengewinnung. Die Ermittlung der HPV-Prävalenz erfolgte durch eine von den Teilnehmerinnen selbstständig durchgeführte Vaginalspülung mithilfe dieses Sets. Zur Durchführung der Vaginalspülung wurde ein Selbstabnahmeset der ersten Generation von der Firma Delphi Bioscience B.V. (ehemalige Pantarhei Devices B.V., Delphi-Bioscience, Scherpenzeel, Niederlande) benutzt (79). Die Probandinnen erhielten das Set mit einem Selbstabnahmegerät (Screener)

(Abbildung 5), das 5 ml einer sterilen isotonen Kochsalzlösung enthielt, einem Transportbehälter für die Probe sowie einer ausführlichen Gebrauchsanweisung. Der CE-gekennzeichnete Screener ist 22 cm lang, wovon der eigentliche Abnahmekolben 15 cm misst und einen Durchmesser von 2 cm aufweist.



**Abbildung 5: Delphi Bioscience B.V. Selbstabnahmegerät**

Die Probandinnen wurden angehalten, die Vaginallavage im Liegen zu gewinnen. Hierfür sollte das Selbstabnahmegerät in die Vagina eingeführt und der Stempel gedrückt werden, damit die Kochsalzlösung Scheide und Portio umspült. Durch das Zurückgleitenlassen des Stempels nach ca. 5 Sekunden gelangte die Flüssigkeit wieder in den Kolben zurück. Die somit gewonnene Lavage sollte dann in den Transportbehälter gefüllt und dieser fest verschlossen werden. Der Screener wurde über den Hausmüll entsorgt. Abschließend sollte der Transportbehälter mit dem ausgefüllten Fragebogen in dem beigefügten Umschlag innerhalb von 24 Stunden nach der Selbstabnahme per Post an das RKI geschickt werden. Dort wurde er bei  $<8^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt und in weniger als 7 Tagen an das Labor übersandt.

## **2.7 Aufarbeitung der Vaginallavagen**

Spätestens 24 Stunden nachdem die Proben im Labor eingetroffen waren, wurden sie asserviert. Zunächst erfolgte die Homogenisierung der Proben auf dem Vortexer (Scientific Laboratories) mindestens eine Minute lang, um die Flüssigkeit danach in ein Eppendorf Reaktionsgefäß zu überführen. Bei zu dickflüssigen Proben oder fehlender Flüssigkeit wurde in das Transportgefäß 1,5 ml phosphatgepufferte

Salzlösung (PBS, engl.: phosphate buffered saline) gefüllt, die Probe wurde wie oben beschrieben homogenisiert und danach in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß umgefüllt.

Anschließend wurde ein Zellpellet gewonnen, indem die Proben 10 Minuten bei 2200 Umdrehungen pro Minute (rpm, engl.: revolutions per minute) zentrifugiert wurden (Heraeus® Biofuge® primo R) - der dabei entstehende Überstand wurde verworfen. Nach der Resuspendierung des Pellets mit 400 µl PBS wurden 200 µl in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und aus dieser Lösung die DNA aufgereinigt. Die verbleibende Flüssigkeit diente als Reserveprobe und wurde bei -80°C aufbewahrt.

Die DNA-Aufreinigung erfolgte mit dem QIAamp® DNA Minikit (Qiagen GmbH, Hilgen). Als Erstes wurde den Proben QIAgen Proteinase K und Puffer zugeführt und diese anschließend 30 Minuten bei 56°C inkubiert. Nach der Zugabe von Ethanol schloss sich die Übertragung der Proben in Reaktionsgefäße mit speziellen Filtern an. Durch das Zentrifugieren verblieb die Proben-DNA am Filter und die Flüssigkeit konnte verworfen werden. Die Reinigung der DNA erfolgte mithilfe mehrerer Waschdurchgänge nach Protokoll. Zum Schluss löste der Elutionspuffer die gereinigte DNA vom Filter und ermöglichte die Übertragung dieser in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß.

## **2.8 HPV-Nachweis**

### **2.8.1 PCR**

Die Proben der vorliegenden Studie wurden mithilfe eines PCR-basierten Nachweisverfahrens untersucht. Die dabei zu amplifizierende Zielregion liegt in der L1-Region des Virusgenoms. Die üblichen Nachweissysteme benutzen die generellen Primersets GP5+/6+, MY09/11 oder SPF10 zur Vervielfältigung der verschiedenen HPV-Typen-DNA. Im Jahr 1990 beschrieben als erste Snijders et al. (80) die General Primer GP5/GP6. Diese Primer bestehen aus 20 Nukleotiden, die identisch mit der korrespondierenden L1 ORF-Region der Virentypen 6, 11, 16, 18, 31 und 33 sind. Mit einer Zielsequenz von 140 bis 150 Basenpaaren der verschiedenen HPV-Genome gelang es, 26 verschiedene HPV-Typen nachzuweisen. Zur Verbesserung des HPV-Nachweises während der PCR modifizierten Roda Husman et al. (81) die 3'-Enden der Primer mit

hochkonservierten Sequenzen. Die sogenannten GP5+-Primer erhielten dabei drei und die GP6+-Primer fünf Nukleotide zusätzlich. Außerdem wurde Biotin an den GP6+-Primer gekoppelt. Dies ermöglicht die Bindung von Streptavidin-Phycoerythrin (Fluoreszenzmarker) während der Typisierung, die sich nach der Amplifikation der DNA anschloss. Dabei werden die einzelnen HPV-Genotypen mittels spezifischer Sonden nachgewiesen. Bei dieser Untersuchung fand das Primersystem GP5+/6+ (GP6+bio) der Firma Multimetrix® (Heidelberg, Deutschland) Verwendung.

Jede 50 µl PCR-Lösung bestand aus 10 µl der extrahierten DNA, 5 µl des PCR Gold Puffers (Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, USA), 7 µl des 25 mM Magnesiumdichlorids (Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, USA), je 0,25 µl jeder Desoxyribonukleosidtriphosphat-Sorte (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 2 µl PCR-Primer, 0,2 µl Taq Gold Polymerase (Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, USA) und 24,8 µl sterilem Wasser (PCR-Grad).

Die PCR wurde im Mastercycler® (Eppendorf, Deutschland) folgendermaßen durchgeführt: Zu Beginn wurden die DNA-Stränge vier Minuten bei 94° C denaturiert. Anschließend folgten 40 Zyklen der PCR mit den drei immer wiederkehrenden Teilschritten:

- (1) Erneute Denaturierung der DNA-Stränge bei 94°C für 20 Sekunden.
- (2) Hybridisierung der Primer mit den Zielsequenzen für 30 Sekunden bei 38°C.
- (3) Elongationsphase zur Verlängerung des DNA-Molekülstrangs mit der Taq-Polymerase 80 Sekunden bei 71°C.

Zum Schluss wurde der letzte Schritt um vier Minuten verlängert und die Kühlung auf 8°C beendete den Ablauf.

Bei HPV-negativen Proben war es zunächst unklar, ob diese Proben generell keine DNA enthielten und somit von der Studie auszuschließen sind, oder nur keine HPV-DNA nachzuweisen war. Zur Klärung des DNA-Gehalts dieser HPV-negativen Proben erfolgte der Nachweis von humanem  $\beta$ -Globin per Fluorometrie (82).  $\beta$ -Globin ist ein Bestandteil des roten Blutfarbstoffs Hämoglobin. Das Gen für menschliches  $\beta$ -Globin wurde im Rahmen der Studie bei den Proben ohne HPV-DNA explizit mithilfe einer PCR amplifiziert. Danach wurde die Fluorometrie mit dem Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid durchgeführt. Dafür erfolgte die Übertragung des

PCR-Produktes auf ein 2%-iges Agarosegel mit 10 µg/ml Ethidiumbromid. Nach 30 Minuten Laufzeit bei 100 Volt wurde der Versuch gestoppt und ausgewertet. Die Darstellung einer  $\beta$ -Globin-Bande (190 bp) galt als Nachweis von vorhandener menschlicher DNA. Dementsprechend war der HPV-Test richtig negativ und die Probe frei von HPV-DNA (489 Proben). Bei nicht nachweisbarer  $\beta$ -Globin-Bande im Gel wurde der Versuchsablauf mit DNA-Extraktion, PCR und Typisierung mit der Rückstellprobe wiederholt. Bestätigte sich das negative Ergebnis – es war somit keine menschliche DNA nachweisbar – wurde die Probe als ungültig registriert und von der Studie ausgeschlossen. Um Kontaminationen zu detektieren, wurde bei jeder PCR eine Negativkontrolle ohne DNA durchgeführt. Auch unklare Ergebnisse wurden erneut analysiert.

### **2.8.2 HPV-Genotypisierung mit der Luminex-Technologie**

Die Genotypisierung der HPV erfolgte mithilfe der Luminex-xMAP-Technologie von Multimetrix. Dies sind durchflusszytometrische Messsysteme zur quantitativen Analyse von bis zu 500 unterschiedlichen Variablen/Parametern in einer einzelnen Probe pro Messvorgang – so genannte Multiparameter-Testsysteme. Schmitt et al (83) beschrieben diese Methode 2006.

Die Basis dieser Testsysteme bilden Beads bzw. Mikrosphären. Das sind kugelförmige fluoreszenzgefärbte 5,6 µm große Polystyrolpartikel, die als Träger der Analyten dienen. Durch eine individuelle Spektralsignatur aus den Fluoreszenzfarbstoffen Rot und Infrarot entstehen verschiedene Beadtypen (Bead-Mix) mit jeweils spezifischer Beschichtung auf der Oberfläche. In der vorliegenden Studie wurden 27 der möglichen 100 Mikrokügelchensorten/Beadpopulationen mit HPV-typenspezifischen Oligonukleotidsonden benutzt. Durch die Fluoreszenz-Markierung der an der Oberfläche gebundenen Analyten erfolgt die Quantifizierung der Bindungsreaktion, denn die Menge der gebundenen Reagenzien ist direkt proportional zur Fluoreszenzintensität (84, 85). In der Studie wurde das „Multiplex HPV Genotyping Kit for Research in Epidemiology“ von Multimetrix® (Heidelberg, Deutschland) verwendet.

Zunächst wurden die PCR-Produkte mit dem Bead-Mix in die Mikrotiterplatte überführt und fünf Minuten bei 95°C denaturiert. Durch die sich anschließende

Inkubation für 45 Minuten auf dem Schüttler banden die PCR-Produkte an die Sonden der spezifischen Beads. Abhängig von der Konzentration der viralen DNA in der Probe wurden diese Analyten gebunden. Zur Entfernung aller nicht gekoppelten DNA-Fragmente wurde ein Waschschrift durchgeführt. Dann erfolgte die Färbung mit der Reporter-Fluoreszenz R-Phycoerythrin-Streptavidin. Durch die GP6+bio Primer beinhaltet jedes PCR-Produkt ein Biotinmolekül als Bindungsstelle für den Bindungspartner Streptavidin. Nach erneuten Waschdurchgängen erfolgte die Luminex-Fluoreszenzmessung mit dem Luminex200® (Heidelberg, Deutschland). Ein Laser misst dabei zunächst die spezifische Oberflächenfluoreszenz zur Sortierung der Beadsorte und ein zweiter quantifiziert die Fluoreszenz von potentiell gebundenen PCR-Produkten (86).

Aus der Messung von 30 bis 50 Beads einer Sorte ergibt sich der Median der Fluoreszenz-Intensitäten (MFI). Als HPV-positiv wurden Proben mit einem MFI-Wert größer oder gleich dem dreifachen Hintergrundwert protokolliert. MFI-Werte, die niedriger waren, galten als negativ. Auf diese Weise konnten im Rahmen der Studie die HR-HPV-Typen 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73 und 82 sowie die LR-HPV-Typen 6, 11, 42, 43, 44 und 70 nachgewiesen werden (82). Eine Probandin galt als HPV-positiv bei Nachweis mindestens eines HPV-Typen. Die Dokumentation der Ergebnisse erfolgte unter der Identifikationsnummer in einer Exceltabelle und wurde an das RKI gesendet.

## **2.9 Datenerfassung und Auswertung**

### **2.9.1 Berechnung der Stichprobengröße**

Auf Grundlage der Ergebnisse aus der Pilotstudie 2010 (79) und einer dänischen Prävalenzstudie wurde von einer HPV-Prävalenz in der Zielgruppe der 20 bis 25-jährigen Frauen in Deutschland von etwa 45% ausgegangen (79, 87). Um eine möglichst präzise Prävalenz ( $\pm 0,05\%$ ) aller HPV-Typen zu erhalten, wurde eine notwendige Stichprobengröße von 780 Frauen berechnet. Bei einer erwarteten Antwortrate von 15% wurden zunächst 5200 Frauen zur Studienteilnahme eingeladen. Im Falle eines mangelnden Rücklaufs sollte eine erneute Rekrutierung mit 1500 zusätzlichen Einladungen durchgeführt werden, welche auch durchgeführt werden musste.



## 2.9.2 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte in Zusammenarbeit mit dem RKI, Abteilung für Infektionsepidemiologie. Nach jeder Probenanalyse im Labor wurden die Daten an das RKI übersandt. Die Dateneingabe (Ergebnisse des HPV-Screenings, Daten der Fragebögen) in das Datenerfassungsprogramm EpiData® Version 3.1 (EpiData Association, Ottensee, Dänemark) geschah zweimal unabhängig voneinander durch zwei verschiedene Personen. Nach Bereinigung der Datenbank von Doppelteingaben erfolgte der Export der gesamten gespeicherten Daten in das Statistikprogramm STATA®, Version 11 (STATA Corporation, College Station, Texas, USA) zur Auswertung.

Zur Schätzung der HPV-Prävalenz und der Verteilung der HPV-Genotypen, sowohl in geimpften als auch in nicht geimpften Frauen, wurde eine deskriptive Analyse in Prozentangaben mit einem 95% Konfidenzintervall (95% KI) durchgeführt. Die Risikofaktoren für eine multiple Infektion wurden mithilfe einer Multivarianzanalyse bewertet. Unter Ausschluss der nicht signifikanten Faktoren mit Berücksichtigung bekannter Risikofaktoren für eine singuläre Infektion (Anzahl der Sexualpartner, Alter beim ersten Sex, Kondomgebrauch) wurde eine Multivarianzanalyse gestaltet (88). Die kategoriellen Variablen wurden durch den CHI-Quadrat-Test berechnet. Für die Analyse numerischer Variablen wurde der Studentische t-Test und der Exakte Test nach Fisher eingesetzt. Die Ergebnisse werden als Odds Ratio (OR) mit einem 95% KI präsentiert, das Signifikanzniveau wurde bei  $p > 0,05$  festgelegt.

### **3 Ergebnisse**

#### **3.1 Beschreibung der Stichprobe**

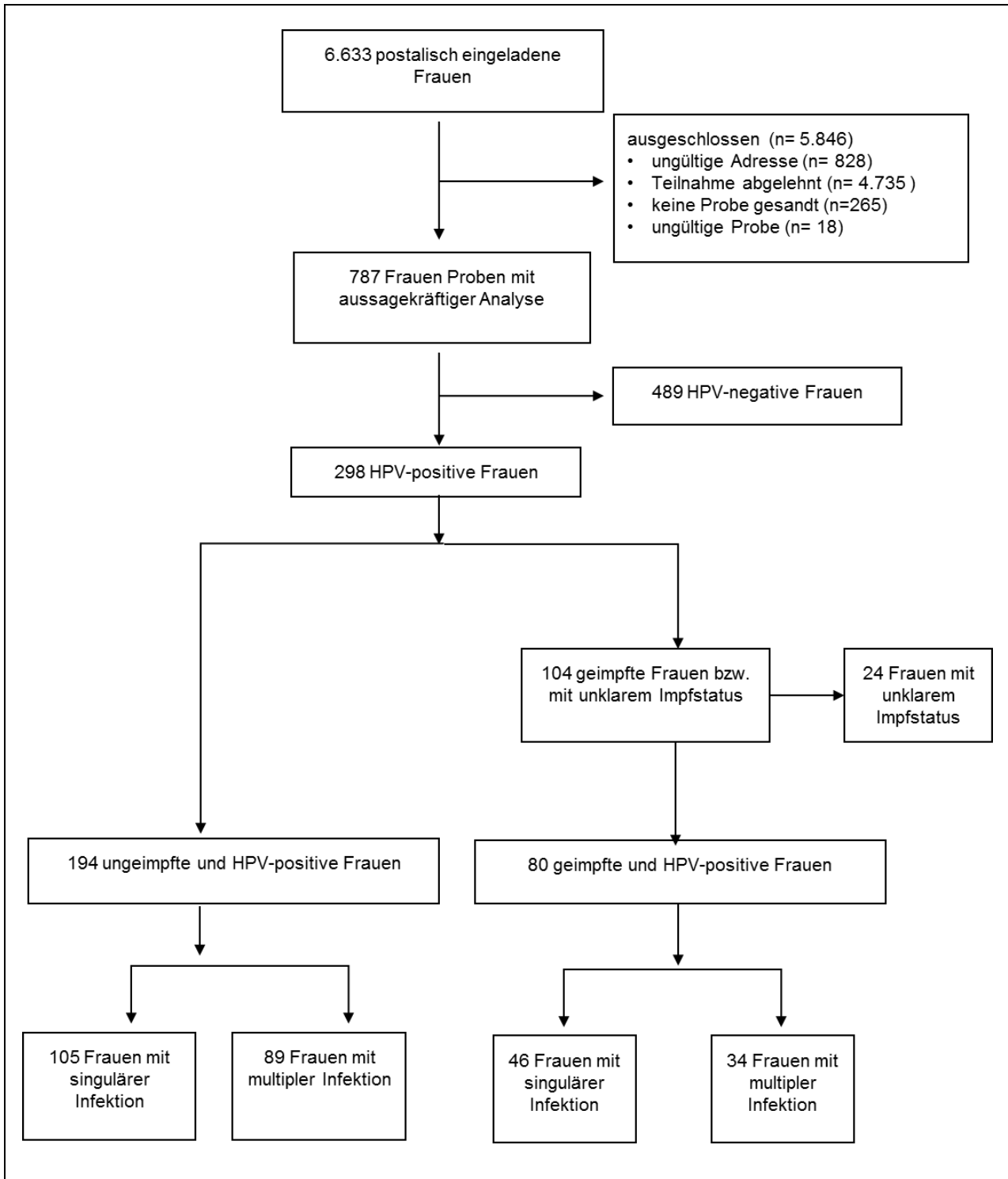
##### **3.1.1 Zusammensetzung der Stichprobe**

Es wurden im Rahmen der Studie 6.633 Frauen mit einem Alter von 20 bis 25 Jahren in der Bundesrepublik Deutschland postalisch angeschrieben. 5.805 Briefe (87,5%) konnten zugestellt werden. 1.070 der erfolgreich angeschriebenen Frauen (18,4%) schickten die Einverständniserklärung unterzeichnet zurück und 805 Frauen (13,9%) sandten die benötigten Proberöhrchen mit einer cervico-vaginalen Spülprobe ein. Bei 787 Proben (13,6%) war genügend DNS für eine erfolgreiche Analyse vorhanden. Unter diesen erfolgreich getesteten Probandinnen waren 298 (37,9%) HPV-positiv (siehe Abbildung 6).

Die vorliegende Arbeit konzentriert sich auf die HPV-positiven Teilnehmerinnen (N=298), die sich wiederum in n=194 (65,1%) ungeimpfte und n=80 (26,8%) geimpfte Teilnehmerinnen unterteilen. 24 Frauen (8,1%) mit unklarem Impfstatus wurden ausgeschlossen. Dabei liegt der Schwerpunkt auf den n=194 ungeimpften Probandinnen, von denen 105 (54,1%) Frauen eine Infektion mit einem einzelnen Erreger aufwiesen. Bei 89 (45,9%) ungeimpften Frauen wurde eine multiple Infektion mit mehr als einem Erreger nachgewiesen.

Unter den 80 geimpften Teilnehmerinnen wurde bei 46 (15,4% der Gesamtpopulation) Frauen eine singuläre und bei 34 (11,4% der Gesamtpopulation) eine multiple Infektion detektiert (siehe Abbildung 6).

## Ergebnisse



**Abbildung 6: Zusammensetzung der Stichprobe**

### 3.1.2 Soziodemografische Daten

Im Folgenden wurde eine Gegenüberstellung der unterschiedlichen Subgruppen vorgenommen. Es erfolgt ein Vergleich der HPV-positiven Frauen mit der Allgemeinbevölkerung Deutschlands und der gesamten Studienpopulation.

Die n=298 HPV-positiv getesteten Frauen wiesen ein Durchschnittsalter von 22,6 Jahren (SD 1,5) auf. 74% der getesteten Personen (n=220) lebten in den alten Bundesländern und 19% (n=57) in einer Großstadt (Einwohnerzahl >500.000). 14% der Probandinnen (n=44) gaben einen Migrationshintergrund an. Im Vergleich zur weiblichen deutschen Bevölkerung des gleichen Alters allgemein zeigten sich insbesondere hinsichtlich des Bildungsstatus und des Migrationshintergrunds deutliche Unterschiede. So sind in der Stichprobe vergleichsweise wenige Probandinnen mit Migrationshintergrund vertreten. Zudem wurden Frauen mit hohem Bildungsniveau überdurchschnittlich häufig rekrutiert (siehe Tabelle 5).

Außerdem waren die HPV-positiven Frauen signifikant häufiger aktive Raucherinnen sowohl im Vergleich zu den HPV-negativen Frauen als auch zu den rekrutierten Frauen insgesamt. Die anderen Merkmalsunterschiede zwischen HPV-positiven und HPV-negativen Frauen sind statistisch nicht signifikant.

**Tabelle 5: Vergleich von Stichprobe und Allgemeinbevölkerung**

<b>Merkmal</b>	<b>Studienpopulation(n=787)</b>	<b>HPV-positive Frauen (n=298)</b>	<b>Allgemeinbevölkerung in Deutschland (20-24 Jahre) weiblich</b>
Alter	22,6	22,6	-
Wohnort in Westdeutschland	76%	74%	84%
Leben in einer Großstadt	16%	19%	19%
Migrationshintergrund	14%	14%	22%
aktiver Raucher	30%	37%	33%
hoher Bildungsstatus	66%	62%	45%
Asthma bronchiale	6%	7%	9%

69,9% (n=207) der HPV-positiven Frauen lebten zum Untersuchungszeitpunkt in einer festen Partnerschaft. 10,4% (n=31) der Teilnehmerinnen sind bereits mindestens einmal schwanger gewesen und 6,1% (n=18) gaben an, bereits ein Kind geboren zu haben.

Das Durchschnittsalter der ungeimpften HPV-positiven Frauen (n=194) liegt bei 23,0 Jahren (SD 1,4), das Alter der geimpften (n=80) bei 21,6 Jahren (SD 1,3). Die beiden Subpopulationen der ungeimpften und geimpften HPV-positiven Frauen unterscheiden sich insbesondere in zwei beschriebenen Merkmalen (siehe Abbildung 7): In der Gruppe der ungeimpften Frauen lag der Anteil der Probandinnen mit Migrationshintergrund mit 18% (n=35) deutlich höher als in der Gruppe der geimpften (9%, n=9). Von den ungeimpften Teilnehmerinnen gaben zudem 13% (n=25) eine erlebte Schwangerschaft an, bei den geimpften waren es lediglich 6% (n=6).

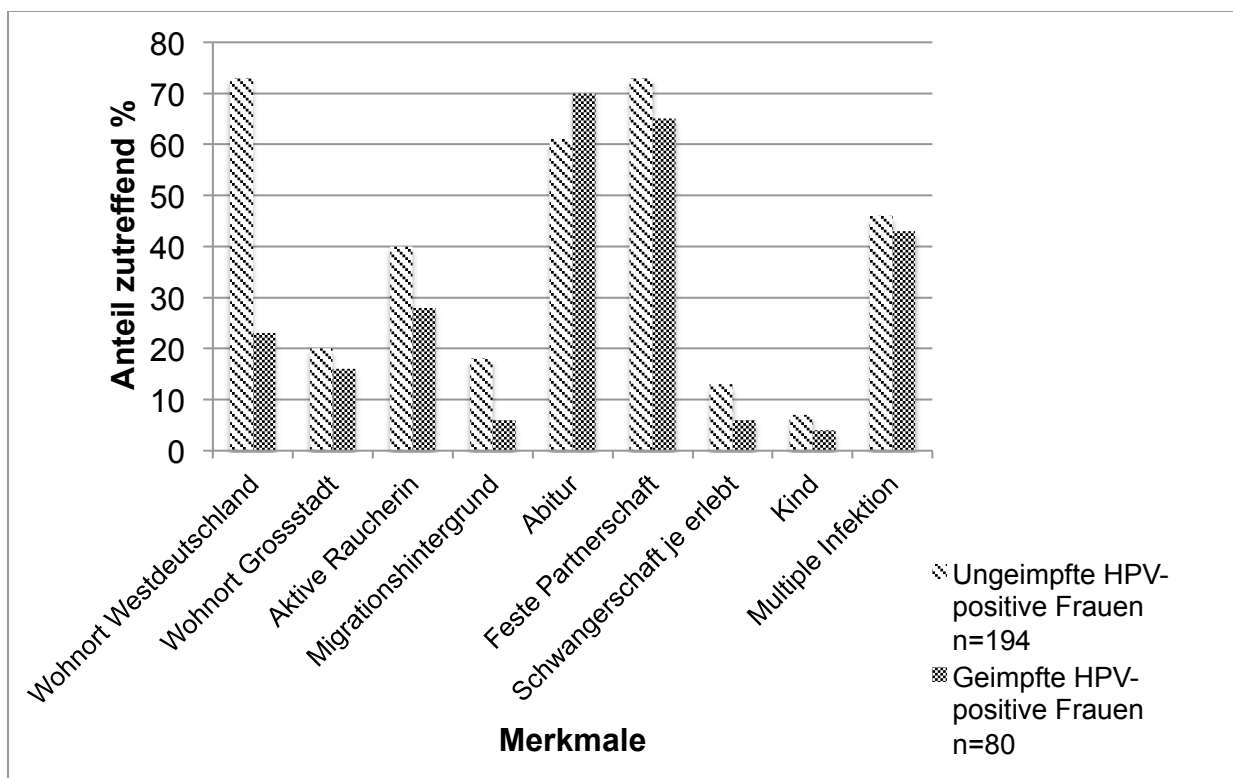


Abbildung 7: Vergleich der Merkmale HPV-positiver ungeimpfter und geimpfter Frauen

### 3.1.3 HPV-Genotyp-Prävalenzen in der Stichprobe HPV-positiver Frauen

In der Gruppe der HPV-positiven Teilnehmerinnen (n=298) wurde bei 45,3% (n=135) (KI 95%: 39,6–51,1%) eine multiple Infektion mit zwei oder mehr HPV-Typen festgestellt. Wobei eine Infektion mit zwei Typen bei 25,5% (n=76) (KI 95%: 20,6–30,8%), eine mit drei bei 14,1% (n=42) (KI 95%: 10,3–18,6%) und eine mit vier bei 4,7% (n=14) (KI 95%: 2,6–7,8%) der Probandinnen gemessen wurde (siehe Tabelle 6).

Bei den ungeimpften HPV-positiven Teilnehmerinnen (n=194) konnte bei 45,9% (n=89) (KI 95%: 38,8–53,2%) eine multiple Infektion mit zwei oder mehr HPV-Typen nachgewiesen werden. Insgesamt waren 25,8% (n=50) mit zwei Typen (KI 95%: 19,8–32,5%) und 14,4% (n=28) mit drei (KI 95%: 9,8–20,2%) sowie 4,6% (n=9) (KI 95%: 2,1–8,6%) der Frauen mit vier Typen infiziert (siehe Tabelle 6: Anzahl der Infektionen in HPV-positiven Frauen). Bei drei Personen der Gesamtstichprobe und zwei Personen der Ungeimpften lagen Infektionen mit fünf oder sechs verschiedenen HPV-Typen vor. Es gibt nur minimale Unterschiede hinsichtlich der Anzahl der Infektionen zwischen der Gesamtstichprobe und den ungeimpften Probandinnen.

**Tabelle 6: Anzahl der Infektionen in HPV-positiven Frauen**

Anzahl der HPV-Typen	Gesamtstichprobe		ungeimpfte Probandinnen		geimpfte Probandinnen	
	n=298	%	n=194	%	n=80	%
1	163	54,7	105	54,1	46	57,5
2	76	25,5	50	25,8	19	23,8
3	42	14,1	28	14,4	12	15,0
4	14	4,7	9	4,6	3	3,8
5	2	0,7	1	0,5	0	0
6	1	0,3	1	0,5	0	0

In der weiteren Ergebnisdarstellung werden die ungeimpften HPV-positiven Frauen intensiver betrachtet.

## 3.2 Multiple HPV-Infektionen in ungeimpften Frauen

### 3.2.1 Prävalenzen der HPV-Typen

45,9% der ungeimpften HPV-positiven Teilnehmerinnen (n=89) wiesen eine multiple Infektion mit mehr als einem HPV-Typen auf (siehe Tabelle 6). Betrachtet man zunächst die HR-Typen, stellt man fest, dass bei nahezu allen ungeimpften multipel HPV-positiven Frauen (88/89, 99%) mindestens ein HR-Typ nachweisbar war. Bei 73% (n=65) der Frauen mit multiplen Infektionen konnte HPV16 und bei 18% (n=16) der Probandinnen konnte HPV 18 nachgewiesen werden. Bei 12% (n=11) waren HPV 16 und 18 nachweisbar. Nur bei einer Frau mit multipler Infektion fanden sich keine HR-Typen. Hier wurden die LR-HPV-Typen 6, 42 und 90 nachgewiesen.

Bei 89% (n=79) der Frauen mit multiplen Infektionen war mindestens einer der in dem nonavalenten HPV-Impfstoff (vgl. Abschnitt 1.5) enthaltenen Genotypen (6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52 oder 58) prävalent (siehe Abbildung 8: Verteilung der Genotypen bei multiplen Infektionen in ungeimpften Frauen).

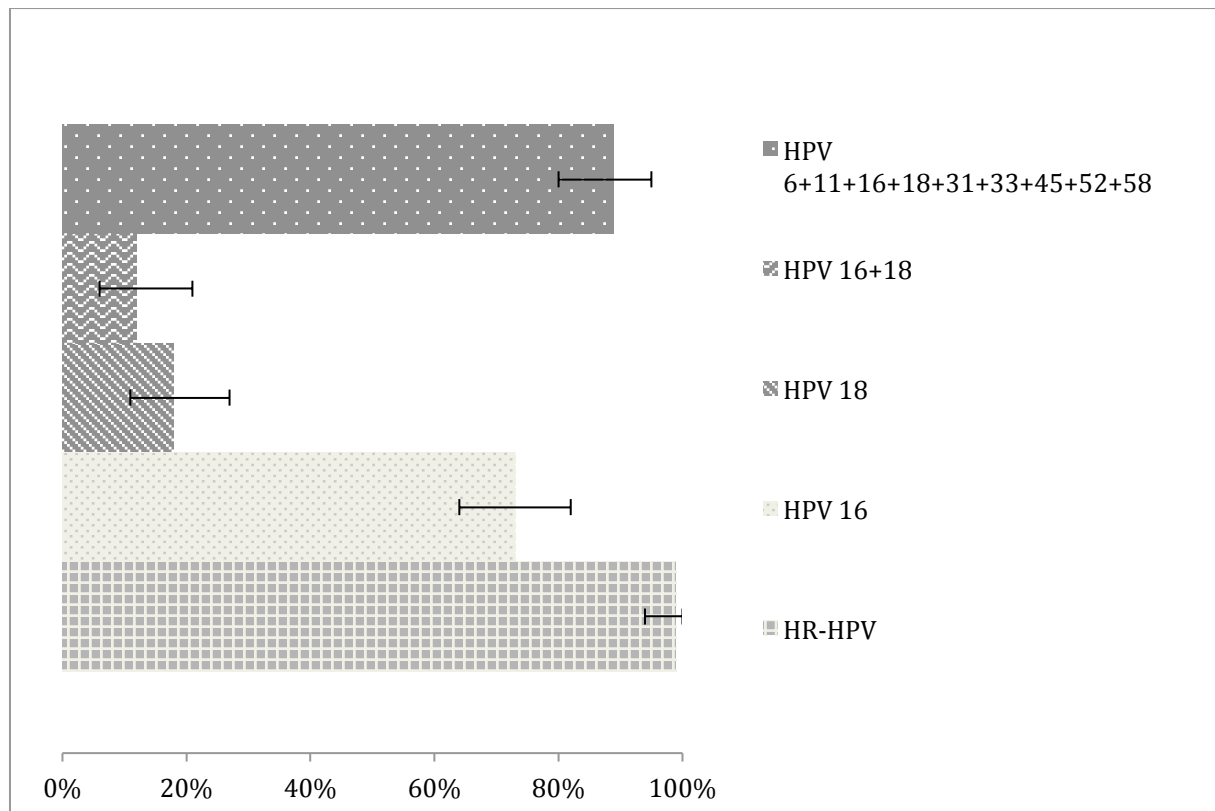


Abbildung 8: Verteilung der Genotypen bei multiplen Infektionen in ungeimpften Frauen

Bei 21% der Frauen fand sich eine Koinfektion mit HPV-Typ 66. 18% der Frauen wiesen u.a. eine Infektion mit HPV 56 auf sowie 16% der Frauen eine Infektion mit HPV 39 (siehe Tabelle 7: Präsenz der Genotypen bei multiplen Infektionen in ungeimpften Frauen). HPV-Typen 35, 45, 57, 61, 72 konnten nicht in multiplen Infektionen nachgewiesen werden.

**Tabelle 7: Präsenz der Genotypen bei multiplen Infektionen in ungeimpften Frauen**

HPV Typ <sup>1</sup>	absolute Zahl an Frauen mit multiplen HPV-Infektionen (n=89)	% der Frauen mit multiplen Infektionen	
16	65	73%	
53	20	22%	
42*	19	21%	
66	19	21%	
18	16	18%	
56	16	18%	
39	14	16%	
51	11	12%	
52	11	12%	
59	11	12%	
70*	5	6%	
11*	4	4%	
6*	3	3%	
31	2	2%	<sup>1</sup> Darstellung der Prävalenzen der einzelnen getesteten HPV-Typen in absteigender Prävalenz
33	2	2%	
43*	2	2%	
44*	2	2%	
58	2	2%	
68	2	2%	
82	2	2%	
26	1	1%	
73	1	1%	
90	1	1%	

\* LR-Typen



### 3.2.2 Prävalenzen der HPV-Typen bei ungeimpften und geimpften Frauen bei multiplen Infektionen

Eine Analyse der Genotypenverteilung in geimpften HPV-infizierten Frauen und ungeimpften HPV-infizierten Frauen zeigt eine große Differenz in der Häufigkeit von Infektionen mit dem HR-HPV-Typ 16 (siehe Tabelle 8).

**Tabelle 8: Vergleich der HPV-Prävalenzen in ungeimpften und geimpften Frauen mit multipler Infektion**

	HPV-Typen	Prävalenz % bei ungeimpften HPV+Frauen (n=89)	Prävalenz % bei geimpften HPV+Frauen (n=34)	p-Wert nach Chi-2-Test	p-Wert nach Fisher-Test
HR-Typen	16	73,0%	47,1%	0,007	-
	18	17,8%	14,7%	0,666	-
	31	2,2%	0,0%	-	1,00
	33	2,2%	5,9%	-	0,306
	35	0,0%	2,9%	-	0,276
	39	15,7%	8,8%	-	0,395
	51	12,4%	5,9%	-	0,512
	52	12,4%	14,7%	0,729	-
	53	22,5%	26,5%	0,640	-
	56	18,0%	17,6%	0,966	-
	58	2,2%	5,9%	-	0,306
	59	12,4%	20,6%	0,248	-
	66	21,3%	23,5%	0,794	-
	68	2,2%	0,0%	-	1,00
	73	1,1%	8,8%	-	0,064
	82	2,2%	11,8%	-	0,049
90	1,1%	0%	-	1,00	
*LR-Typen	6*	3,4%	5,9%	-	0,616
	11*	4,5%	2,9%	-	1,00
	42*	21,3%	17,6%	0,648	
	43*	2,2%	0,0%	-	0,306
	44*	2,2%	0,0%	-	1,00
	70*	5,6%	2,9%	-	1,00

Während 73% (n=65/89) der ungeimpften Teilnehmerinnen mit HPV 16 befallen waren, wiesen lediglich 47% (n=16/34) der geimpften eine HPV 16 Infektion auf – dies ist bei einem p-Wert von 0,07 grenzwertig statistisch signifikant. Bei HPV 39 sind zudem große Unterschiede festzustellen: Bei den ungeimpften Probandinnen sind 15,7% (n=13) mit HPV 39 positiv getestet und bei den geimpften nur 8,8%

(n=3). Im Gegensatz dazu konnte bei 12,4% (n=11) eine Infektion mit HPV 59 bei den ungeimpften Teilnehmerinnen nachgewiesen werden und bei 20,6% (n=7) der geimpften. Weitere, jedoch geringere Differenzen konnten bei HPV 66 gefunden werden: 21% (n=19) der ungeimpften und 23% (n=8) der geimpften Frauen wiesen eine Infektion mit diesem HPV-Typen auf. Außerdem wurden 9% (n=3) der geimpften Frauen und 1% (n=1) der ungeimpften Teilnehmerinnen auch auf HPV 73 positiv getestet. Allerdings waren die Fallzahlen der Nicht-HPV-16-Typen zu gering, um eine statistische Signifikanz nachzuweisen.

### **3.2.3 Untersuchung auf Assoziationen von Genotypen**

Bei ca. 73% der ungeimpften Frauen (n=33/50) mit einer Infektion durch zwei HPV-Typen konnte eine Infektion mit HPV 16 nachgewiesen werden, während es bei denen mit drei Typen ca. 86% (n=24/28) waren. Zu erwähnen ist ein Anstieg der Typen 53 und 66 mit Anzahl der HPV-Typen pro Infektion. So steigt der Anteil von HPV-Typ 53 beispielsweise von 16% (8/44 bei Nachweis von zwei HPV-Typen) auf 44% (4/9) bei Nachweis von vier HPV-Typen. Bei HPV-Typ 66 stieg der Anteil von 14% (7/43) bei Infektion mit zwei HPV-Typen auf 44% (4/9) bei Nachweis von vier HPV-Typen. Es besteht allerdings keine statistische Signifikanz für diesen Anstieg ( $p > 0,1$  für beide) wegen der geringen Fallzahl.

Ein ähnlicher Anstieg zeigte sich bei HPV-Typ 42, von 12% (6/50 Probandinnen) bei Frauen mit zwei HPV-Typen zu 33% (3/9 Probandinnen) bei Frauen mit vier Typen. Die beiden Probandinnen mit sechs verschiedenen Genotypen wurden ebenfalls auf HPV 42 positiv getestet. Zwischen HPV-Typ 52 und Typ 16 konnte eine negative Korrelation beobachtet werden ( $p = 0,02$ ).

### **3.2.4 Prävalenzen der HPV-Typen bei singulären und multiplen Infektionen**

Bei einem Vergleich der HPV-Genotypenverteilung bei ungeimpften Frauen mit singulärer und mit multipler Infektion zeigten sich unterschiedliche Prävalenzraten. Die größte Differenz mit 40 Prozentpunkten findet sich bei dem HR-Typen HPV 16. Es wurden 33% (n=35) der Frauen mit einer singulären Infektion mit HPV 16 identifiziert. Bei den Frauen mit multipler Infektion wurde hingegen bei 73% (n=65) HPV 16 nachgewiesen. Bei HPV 39 und HPV 56 findet sich jeweils ein Unterschied von 15 Prozentpunkten (HPV 39 n=1 (1%) bei singulärer Infektion und bei multipler Infektion n=14 (16%), HPV56 n=3 (3%) und multipel n=16 (18%).

Herauszustellen ist zudem die Differenz von 21 Prozentpunkten bei HPV 66 (singulär  $n=0$  (0%) und multipel  $n=19$  (21%)) (vgl. Abbildung 9).

Wichtig hierbei ist die Betrachtung des Alters der Probandinnen. Das Durchschnittsalter der ungeimpften Frauen ( $n=194$ ) ist bei Frauen mit multiplen Infektionen mit 23,2 Jahren (SD 1,3) signifikant höher, als bei ungeimpften Frauen mit singulärer Infektion (22,8, SD 1,4),  $p=0,03$ . Untersucht man die mit HPV 16 infizierten Altersgruppen genauer, stellt sich heraus, dass sich bei HPV 16 das Alter in den Subpopulationen nicht unterscheidet. Bei singulären Infektionen mit HPV 16 ( $n=35$ ) beträgt das Durchschnittsalter 23,0 Jahre (SD 1,5) im Vergleich zu den multipel infizierten Frauen ( $n=65$ ) mit durchschnittlich 23,1 Jahren (SD 1,4).

# Ergebnisse

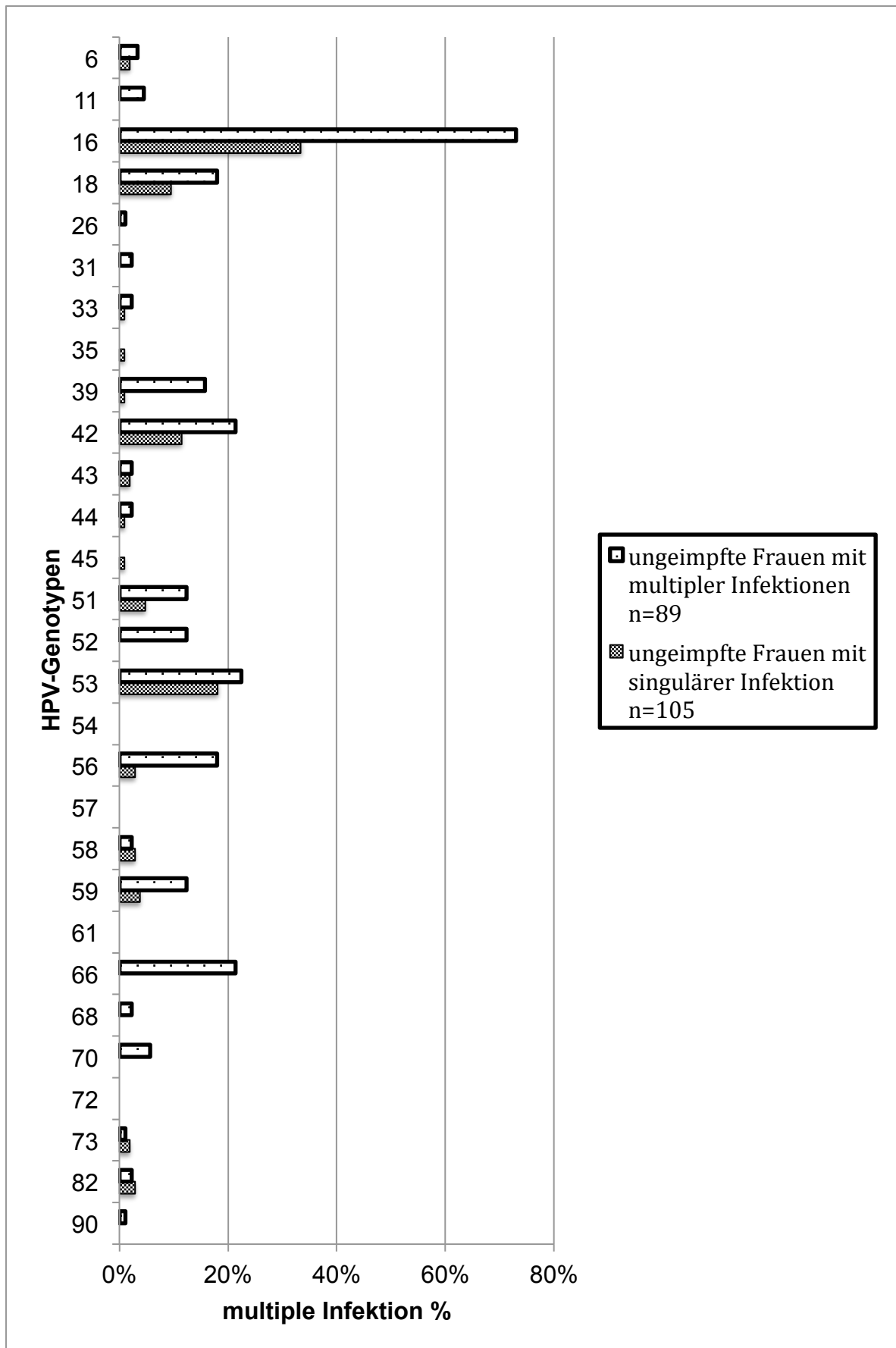


Abbildung 9: Vergleich der Genotypenverteilung in ungeimpften Frauen bei singulären und multiplen Infektionen

### 3.3 Risikofaktoren für multiple Infektionen in ungeimpften Frauen

Bei ungeimpften HPV-positiven Frauen (n=194), die in einer Großstadt leben, wurden signifikant häufiger multiple Infektionen nachgewiesen (OR 2,19 mit 95% KI 1,1–4,5, p=0,03) als bei Probandinnen aus ländlichen Gebieten. Auch das Leben in einer festen Partnerschaft ist signifikant mit einem gehäuften Auftreten von multiplen Infektionen assoziiert (OR 2,12 mit 95% KI 1,1–4,1, p=0,03).

Zudem hatten Frauen mit einer erlebten Schwangerschaft ein 2,34-fach erhöhtes Risiko, eine multiple Infektion mit HPV zu erleiden, die Differenz ist grenzwertig signifikant auf dem Fünf-Prozent-Niveau mit p=0,056 (OR 2,34 mit 95% KI 1,0–5,6).

Die Wahrscheinlichkeit eine HPV-Infektion mit mehreren Subtypen zu haben, lag bei den Probandinnen aus den neuen Bundesländern bei OR 1,17 (mit 95% KI 0,6–2,2, p=0,61) im Vergleich zu Frauen aus den alten Bundesländern (keine statistische Signifikanz). Bei allen anderen Faktoren waren keine statistisch signifikanten Unterschiede festzustellen (Tabelle 9).

In der multivariaten Analyse waren „Leben in einer Großstadt“ (OR 2,37 mit 95% KI 1,11–5,06, p=0,03), eine „erlebte Schwangerschaft“ (OR 2,97 mit 95% KI 1,10–7,10, p=0,03) sowie die Höhe der Schulbildung („mittlere Schulbildung“: OR 5,15 mit 95% KI 1,48–17,88, p=0,01 und „hohe Schulbildung“: OR 3,45 mit 95% KI 1,05–11,35, p=0,04) mit dem Nachweis multipler HPV-Typen assoziiert.

Bei Frauen, die angegeben hatten, dass sie im Rahmen von einmaligen sexuellen Kontakten (One-Night-Stands) Kondome benutzen würden, war die Wahrscheinlichkeit einer multiplen HPV-Infektion in dieser Studie (nicht signifikant) reduziert.

Die Hinzunahme der Variable „Alter“ in das finale Model zeigte keinen entscheidenden Einfluss der Variable auf das Risiko einer multiplen Infektion.

Tabelle 9: Risikofaktoren für multiple Infektionen in ungeimpften Frauen

Merkmal	Einheit	Nicht adjustiertes OR (95%KI)	p-Wert
Wohnort in Ostdeutschland	ja	1,17 (0,6–2,2)	0,61
	nein (Referenz)	1	-
Wohnort in Großstadt*	ja	2,19 (1,1–4,5)	<b>0,03</b>
	nein (Referenz)	1	-
Migrationshintergrund	ja	1,51 (0,7–3,2)	0,27
	nein (Referenz)	1	-
Aktiver Nikotinabusus	ja	0,6 (0,3–1,1)	0,09
	nein (Referenz)	1	-
Leben in fester Partnerschaft*	ja	2,12 (1,1–4,1)	<b>0,03</b>
	nein (Referenz)	1	-
Alter beim ersten Geschlechtsverkehr (GV)	kein GV bisher (Referenz)	1	-
	≤13 Jahre	0,78 (0,1–4,3)	0,77
	14–15 Jahre	0,81 (0,2–3,4)	0,78
	16–17 Jahre	1,02 (0,2–4,3)	0,98
	> 17 Jahre	0,59 (0,1–2,6)	0,49
Anzahl der bisherigen Sexualpartner	0 Partner (Referenz)	1	-
	1–2 Partner	0,49 (0,1–2,2)	0,35
	3–5 Partner	0,75 (0,2–3,2)	0,70
	6–10 Partner	1,00 (0,2–4,3)	1,00
	>10 Partner	1,2 (0,3–5,3)	0,81
Kondomgebrauch bei „One-Night-Stand“	ja	0,59 (0,3–1,1)	0,11
	nein (Referenz)	1	-
Aktuelle Benutzung oraler Kontrazeptive	ja	2,11 (0,82–5,4)	0,12
	nein (Referenz)	1	-
Erlebte Schwangerschaft	ja	2,34 (1,0–5,6)	<b>0,05</b>
	nein (Referenz)	1	-
Anzahl Sexualpartner in den letzten 12 Monaten	≥ 1	2,04 (0,5–8,2)	0,31
	keinen (Referenz)	1	-
Alter (Jahre)	20–21 (Referenz)	1	-
	22–23	1,14 (0,6–2,0)	0,65
	24–25	1,38 (0,8–2,5)	0,29
Bildungsstatus	niedrig (Referenz)	1	-
	mittel	2,14 (0,8–5,8)	0,13
	hoch	1,76 (0,7–4,5)	0,24

(\* signifikant mit  $p < .05$ )

**Tabelle 10: Risikofaktoren für multiple HPV Infektionen in ungeimpften Frauen, multivariate Analyse**

<b>Merkmal</b>	<b>Einheit</b>	<b>Adjustiertes OR (KI 95%)</b>	<b>p-Wert</b>
Wohnort in Großstadt	ja	2,37 (1,11–5,06)	<b>0,03</b>
	nein (Referenz)	1	-
Erlebte Schwangerschaft	ja	2,97 (1,10–7,10)	<b>0,03</b>
	nein (Referenz)	1	-
Bildungsstatus	niedrig (Referenz)	1	-
	mittel	5,15 (1,48–17,88)	<b>0,01</b>
	hoch	3,45 (1,05–11,35)	<b>0,04</b>
Kondomgebrauch bei „One-Night-Stand“	ja	0,60 (0,3–1,2)	0,14
	nein (Referenz)	1	-

## **4 Diskussion**

In dieser Studie wurde erstmalig die Prävalenz von multiplen HPV-Infektionen bei jungen Frauen in Deutschland anhand einer repräsentativen Stichprobe analysiert.

Im Folgenden werden die zentralen Ergebnisse dieser Untersuchung vor dem Hintergrund bisher publizierter internationaler Studien diskutiert.

### **4.1 Multiple Infektionen**

#### **4.1.1 HPV-Prävalenzen und Anzahl multipler Infektionen unter den HPV-positiven Frauen**

Bei 45,9% der HPV-positiven ungeimpften Probandinnen lag eine multiple HPV-Infektion vor. Die bisher in der Literatur beschriebenen Prävalenzraten von multiplen HPV-Infektionen schwanken stark in Abhängigkeit von der untersuchten Altersgruppe und dem geografischen Ort sowie der Nachweismethode (siehe Abschnitt 1.7 Multiple HPV Infektionen). Ein Vergleich der Prävalenzraten ist daher nur eingeschränkt möglich. Dennoch soll die im Rahmen der vorliegenden Studie ermittelte Prävalenz multipler HPV-Infektionen in jungen ungeimpften Frauen (45,9%) mit den vorhandenen Studien verglichen werden. Zunächst werden Daten aus sozioökonomisch schwächeren Staaten im Vergleich zu Deutschland betrachtet. In einer Analyse der „International Agency for Research on Cancer“ (IARC) wird die Prävalenz von multiplen Infektionen mit insgesamt 32,2% der HPV-positiven Frauen angegeben. Dabei variiert dies zwischen 19% in Korea bis zu 46% in Argentinien (90). In einer großen Studie in Costa Rica lag die Prävalenz für multiple Infektionen bei 43,2% und die Anzahl der gefundenen verschiedenen Genotypen lag zwischen zwei bis acht Typen (62). In Brasilien fanden Rousseau et al. (67) bei 24,4% der HPV-positiv getesteten Frauen unter 25 Jahren eine multiple Infektion mit mehreren Genotypen. Bei 82% der Infektionen in allen Altersklassen handelte es sich um eine Infektion mit zwei Genotypen. Nur in einem einzelnen Fall fanden die Forscher vier Genotypen (67). Bei dieser Studie handelte es sich jedoch nicht um eine bevölkerungsbasierte Untersuchung, sondern um eine Erhebung im Rahmen eines Gesundheitsprogrammes für Familien mit niedrigen Einkommen. In der



Hochrisikogruppe der unter 25-Jährigen war eine Infektionsrate mit 24,4% im Mittelfeld der in der Literatur angegebenen Prävalenzen.

Auch bei Betrachtung sozioökonomisch vergleichbarer Staaten variieren die ermittelten Prävalenzwerte sehr stark. Mit 58,6% von multiplen Infektionen unter den HPV-positiven Personen liegt die ermittelte Prävalenz in der dänischen Studie von Nielsen et al. (26) höher als in der vorliegenden Arbeit. Die in dieser Arbeit ermittelten Prävalenzen stimmen hingegen gut mit Daten aus Portugal von Pista et al. (72) mit einer Prävalenzrate von 43,2% überein. Die Ergebnisse von Dunne et al. (70) aus den USA spiegeln ähnliche Prävalenzen wider. Hier wurden bei 40% der HPV-positiven Frauen zwei oder mehr HPV-Typen und bei 16% drei oder mehr HPV-Typen gefunden (70). In Schottland wurden bei 43,3% der untersuchten Frauen (Durchschnittsalter 38 Jahre) multiple Infektionen gefunden (69). Dahingegen beschreiben Forslund et al. (68) in einer schwedischen Studie bei einer bevölkerungsbasierten Kohorte mit Frauen von 32 bis 38 Jahren eine deutlich niedrigere Prävalenzrate multipler Infektionen von nur 9%. Da zur Hochrisikogruppe für HPV-Infektionen junge Frauen in den ersten Jahren nach der Kohabitarche zählen, ist die HPV-Prävalenz der singulären als auch der multiplen Infektionen bei dieser etwas älteren Studienpopulation offenbar niedriger. In einer Studie aus Italien wurden bei 20,4% der HPV-positiven Frauen (Durchschnittsalter 42 Jahre) eine multiple Infektion gemessen (59). Das Durchschnittsalter bei den letzteren Untersuchungen liegt deutlich höher und somit ist es nachvollziehbar, dass die Prävalenz für die koinfizierten Frauen niedriger ist. Dahingegen finden Lenselink et al. (25) in den Niederlanden unter den weiblichen 18- bis 29-Jährigen bei 21,6% eine multiple Infektion.

Daten aus Deutschland, in denen die multiplen Infektionen gesondert untersucht wurden, sind rar. In der einzigen existierenden Untersuchung von 2007 haben Klug et al. (29) eine ältere Kohorte (Alter >30 Jahre) untersucht und bei 28,1% der infizierten Frauen Koinfektionen gefunden.

Die hier ermittelten Ergebnisse zur Prävalenz multipler HPV-Infektionen passen sehr gut in den Bereich des insgesamt sehr weiten Prävalenzspektrums. Somit handelt sich um kein extrem außenliegendes Ergebnis.

#### 4.1.2 Genotypenverteilung in multiplen Infektionen

Ein wichtiger Aspekt ist die Prävalenz der einzelnen Genotypen in multiplen Infektionen und auch der Vergleich mit den bei singulären Infektionen vorkommenden Genotypen. Es stellt sich insbesondere die Frage, ob die vorkommenden Genotypen in multiplen Infektionen andere sind als in singulären Infektionen.

Am häufigsten wurde in der vorliegenden Arbeit der HR-Typ 16 (73%) gefunden (vgl. Kapitel Prävalenzen der HPV-Typen). Auch die Typen 53 (22,5%), 42 (21,3%), 66 (21,3%), 18 (17,8%), 56 (18,0%), 39 (15,7%) und 51 (12,4%) waren häufig. Auffallend ist, dass fast alle multipel infizierten Frauen (99%) mit einem HR-Typ infiziert waren, verglichen mit 34,4% unter den ungeimpften Frauen (n=512) insgesamt (91). Vor allem die onkogenen Typen 16, 39 und 56 waren häufig bei multiplen Infektionen vertreten. Daraus lässt sich die Vermutung ableiten, dass Frauen mit multiplen Infektionen durch die Präsenz mehrerer onkogener HPV-Typen ein höheres Risiko für karzinogene Zellveränderungen haben könnten. Ein Erklärungsansatz ist die Betrachtung der multiplen HPV-Infektion als frühe Infektion der jungen Frau kurz nach der Kohabitarche. Dies ist zu einem Zeitpunkt, in dem noch keine immunologische Kompetenz gegen HPV ausgebildet wurde, die Frauen sind HPV-naiv. Diese Frauen sind dadurch vulnerabler für eine multiple Infektion. Bei einer multiplen Infektion ist die Gefahr einer HPV-Persistenz erhöht, weil das Risiko bei mehr Genotypen größer ist, dass ein Genotyp persistiert. Bei dieser Studie betrachten wir lediglich eine Infektion zu einem Zeitpunkt (Punktprävalenz). Diese Infektionen können aktive, transiente oder persistierende Infektionen sein.

Bei singulären Infektionen ist die Datenlage zur HPV-Prävalenz besser.

In einer vergleichbaren Studie über singuläre HPV-Infektionen in Deutschland wurden die Typen 16 (23,9%), 42 (19,1%), 51 (16,7%), 56 (10,3%) sowie 31 (8,8%) gehäuft nachgewiesen (24). Dies deckt sich weitestgehend mit den Daten für multiple Infektionen der vorliegenden Arbeit, nur Typ 31 wurde darin nur bei 2,2% nachgewiesen und Typ 16 wurde insgesamt mit 73% häufiger nachgewiesen.

In einer multinationalen Studie in elf Ländern (Nigeria, Indien, Vietnam, Thailand, Korea, Kolumbien, Argentinien, Chile, Niederlande, Italien, Spanien) mit 15.613

Frauen (davon 1429 HPV-positiv) wiesen Clifford et al. (43) am häufigsten den HR-Typ 16 (19,7%), in absteigender Reihenfolge gefolgt von den Typen 42 (9,4%), 58 (7,6%), 31 (7,5%), 18 (7,2%), 56 (7,1%), 81 (6,2%), 35 (5,9%), 33 (5,8%) und 45 (5,6%) sowohl in multiplen Infektionen als auch in singulären Infektionen nach. Eine gesonderte Betrachtung der Genotypenverteilung der multiplen Infektionen fand nicht statt. Auch bei dieser Untersuchung war der HPV-Typ 16 der häufigste. Dahingegen sind bei Clifford et al. (43) oft nachgewiesene HPV-Typen wie 42 (21%), 58 (2%), 31 (2%), 18 (18%) und 56 (18%) nur partiell häufig in der vorliegenden Studie nachgewiesen worden. Die Unterschiede in den Prävalenzen sind vor allem auf das ungleiche Altersspektrum zurückzuführen; Clifford et al. (43) haben Frauen von 15 bis 74 Jahren eingeschlossen. Außerdem wurden im Rahmen der Erhebung nur drei europäische Länder (Niederlande, Italien, Spanien) erfasst. Die Unterschiede in der regionalen Genotypenverteilung wurde bereits in der Einleitung thematisiert (Prävalenzen der HPV-Typen bei ungeimpften und geimpften Frauen bei multiplen Infektionen). Dahingegen finden die Autoren in Europa frequente HPV-Typen wie Typ 53 nur in 1,2%, Typ 66 in 4,1% und Typ 39 in 4,3% der Fälle. Auch eine Infektion mit dem LR-Typ 42 konnte oft nachgewiesen werden.

Li et al. (92) zeigten in ihrer bevölkerungsbasierten Studie mit 1.712 Frauen (15 bis 59 Jahre) in China ebenfalls die höchste Prävalenz von HPV 16 in multiplen Infektionen mit 23,5%, gefolgt von HPV 52 (19,8%) und 58 (19,8%). HPV-Typ 52 (12,4%) konnte auch in der vorliegenden Studie häufig nachgewiesen werden, im Unterschied dazu zeigte Typ 58 mit 2,2% eine niedrige Prävalenz. Auch wurde hier Typ 52 gehäuft in multiplen Infektionen gefunden im Vergleich zu singulären Infektionen (Unterschied von 12 Prozentpunkten). Aber HPV-Typ 16 war wiederum deutlich häufiger in der vorliegenden Erhebung nachgewiesen worden.

Mit den Ergebnissen von Klug et al. (29) stimmen die hier ermittelten Prävalenzen gut überein. Auch hier konnte HPV 16 mit 95,6% am häufigsten unter den multipel infizierten Frauen nachgewiesen werden und in absteigender Reihenfolge 31 (38,9%), 52 (33,6%), 51 (29,2%), 18 (27,4%) und 45 (26,5%). Auch häufig waren HPV 73 (26,5%) und HPV 53 (19,5%) im Studienkollektiv (29).

Speich et al. (73) fanden in ihrer Stichprobe von 2.916 Frauen (948 singuläre und multiple Infektionen zusammen) aus gynäkologischen Praxen in den alten

Bundesländern vor allem HR 16 (26,2%), 18 (5,3%) und 31 (10,1%). Die anderen Typen 33, 42, 51, 53, 58, 61, 66 und 70 wurden mit einer durchschnittlichen Prävalenz von 3,4 bis 4,4% gemessen (73). In der Studie unterscheiden die Autoren bei den Ergebnissen keine Prävalenzen für die multiplen Infektionen, sodass ein detaillierter Vergleich nicht möglich ist.

Betrachtet man die Unterschiede zwischen den Genotypen bei singulären und multiplen Infektionen genauer, fallen Differenzen zu einer Studie von Hibbitts et al. (93) auf. In der Studie aus dem Vereinigten Königreich mit 10.000 Frauen mit einem Durchschnittsalter von 38 Jahren wurden hingegen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Prävalenzen von 16, 51 oder 66 bei singulären oder multiplen Infektionen gefunden. Alle anderen Genotypen wurden häufiger bei multiplen Infektionen gefunden (93). Außerdem beschreiben die Autoren Typ 18 mit 34,4% als häufigsten HPV-Typ bei multiplen Infektionen. Im Vergleich dazu ist in der vorliegenden Studie eine deutliche Differenz bei Typ 16 (40 Prozentpunkte) und Typ 66 (21 Prozentpunkte) in der Gegenüberstellung der singulären und multiplen Infektionen beschrieben. Typ 18 ist hier erst an fünfter Stelle in absteigender Reihenfolge der Prävalenz bei multiplen Infektionen.

Aus den Niederlanden werden Daten präsentiert, die wiederum Unterschiede zwischen singulären und multiplen Infektionen beschreiben.

Mollers et al. (71), die in den Niederlanden auch mit einem Selbstabnahmeset gearbeitet haben, ermittelten die HPV-Typen 54, 42, 16 und 70 vor allem in singulären Infektionen, während die Typen 43, 44, 45, 35 und 11 als häufigste Koinfektionen in multiplen HPV-Infektionen detektiert wurden.

Die detektierte Koinfektionsrate ist von mehreren Faktoren wie Alter, Sexualverhalten, Untersuchungsmethode und Einflussgrößen auf das Immunsystem (Immunsuppression oder HLA-Genotyp) abhängig (67).

#### **4.1.2.1 Erwarteter Benefit der neuen Impfung**

89% (n=79) der Frauen wiesen in der vorliegenden Studie eine Infektion mit mindestens einem Typ des neuen nonavalenten Impfstoffes (enthaltene Genotypen: 6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52 und 58) auf. Diese Infektionen wären also teilweise potentiell präventabel. Im Vergleich zur geringen Anzahl der Frauen, die nur mit den

Typen 16 und 18 gleichzeitig infiziert waren (12%, n=11), unterstreicht dies die Bedeutung des neuen Impfstoffes. Der Benefit des neuen Impfstoffes muss in weiteren Anwendungsstudien evaluiert werden. Denn aktuell ist unklar, welche Bedeutung eine Reduktion der Genotypenzahl bei einer multiplen Infektion hat. Es werden durch den nonavalenten Impfstoff nur einzelne Genotypen verhindert werden, da er keine hohe Kreuzprotektivität aufweist. Dies könnte aber insgesamt zu einer Verringerung der Viruslast führen.

#### **4.1.3 Assoziationen (Patterns) zwischen Genotypen**

Um die Wahrscheinlichkeit einer Typenverschiebung in der Postvakzin-Ära zu berechnen ist es wichtig, Daten über eine mögliche Pattern-Bildung von den HPV zu gewinnen. Dafür werden Basisdaten einer impfnaiven Population benötigt. Da aktuell mit dem Impfstoff nur gegen höchstens neun der insgesamt mehr als 206 existierenden HPV-Genotypen immunisiert wird, ist es denkbar, dass die so entstandenen Prävalenzlücken durch andere – assoziierte – Genotypen ersetzt werden. Gleichzeitig wurden immer wieder Kreuzimmunitäten zwischen verschiedenen Genotypen beschrieben (55). Daher ist eine Hypothese, dass multiple Infektionen eher aus HPV-Typen bestehen, für die das Individuum keine – oder noch keine – Kreuzimmunität ausgebildet hat. Das ist damit zu begründen, dass ein Genotyp mit Kreuzimmunität im Laufe der Evolution untergegangen wäre. Zu bedenken ist hierbei, dass bei einer Impfung das Individuum hauptsächlich gegen diesen Virus-Typen geschützt ist (vakzininduzierte L1-typspezifische Antikörper). Im Gegensatz dazu steht eine durchlebte Infektion (mit mehreren Antigenen), die zu breiteren Kreuzimmunitäten führen kann (breite Immunität durch Infektion).

Bei einer multiplen Infektion stieg die Wahrscheinlichkeit einer Infektion mit Typ 16 mit der Anzahl der vorliegenden HPV-Typen insgesamt an (vgl. Prävalenzen der HPV-Typen bei singulären und multiplen Infektionen). Das ist unter anderem damit zu erklären, dass Typ 16 der prävalenteste und persistenteste HPV-Typ ist (43). Liaw et al. (94) zeigen, dass eine Infektion mit HPV 16 mit einer höheren Wahrscheinlichkeit mit einer Infektion mit anderen Genotypen assoziiert ist.

In Übereinstimmung mit mehreren anderen Studien konnte auch in der vorliegenden Arbeit keine Assoziation zwischen bestimmten Genotypen bei multiplen Infektionen nachgewiesen werden (71, 95). Zu diskutieren ist eine Zunahme der Wahrscheinlichkeit einer Infektion mit bestimmten HPV-Typen, durch gemeinsame Risikofaktoren, wie beispielsweise eine unterschiedliche Vulnerabilität der Frauen.

Zu beachten ist bei diesem Gesichtspunkt die Methodik, die Einfluss auf den Nachweis hat. Carozzi et al. (59) beschreiben sogar mögliche diagnostische Artefakte durch die eingesetzten Analyseverfahren. Bei den GP5+/6+ PCR kommt es zu Kreuz-Hybridisierungen bei genetisch ähnlichen Genotypen unter Benutzung von Enzyme Immunoassay bei multiplen Infektionen (59). Vaccarella et al. (90) bestätigen diese Ergebnisse und fordern die weitere Untersuchung der gängigen Typisierungsmethoden. In der vorliegenden Studie wurde mit der Luminex-Technologie gearbeitet. Diese Auslese-Methode wird von der WHO als Referenzmethodik propagiert und technisch validiert. Somit ist dieses Problem durch die Methodenwahl reduziert.

#### **4.2 Risikofaktoren für multiple Infektionen**

Aufgrund des querschnittlichen Studiendesigns können im Rahmen der vorliegenden Arbeit keine eindeutigen Aussagen zur Kausalität zwischen Risikofaktoren und HPV-Infektion getroffen werden. Dennoch liefern die Daten erste Hinweise auf mögliche Risikofaktoren für multiple HPV-Infektionen, die im Folgenden diskutiert werden sollen.

Bei Frauen in Großstädten wurden in der vorliegenden Studie signifikant häufiger multiple Infektionen nachgewiesen (OR 2,19). Dies könnte darauf beruhen, dass in einer Stadt aufgrund der höheren Einwohneranzahl prinzipiell mehr Genotypen verbreitet sind und die Durchseuchungsrate insgesamt höher liegt. In einer Großstadt besteht z. B. eine geringere soziale Kontrolle. Gleichzeitig ist in der Literatur beschrieben, dass die Prävalenzen der einzelnen Genotypen eine große geografische Variabilität aufweisen (geografisch gehäufte Genotypen) (90). Die Daten zu der Divergenz der Prävalenz in Großstädten im Vergleich zu ländlichen Gegenden sind jedoch rar: 2011 wurde in einer Studie in Brasilien ein marginaler

Unterschied der Prävalenz gefunden. In einer Studie von Pinto et al. (96) fanden sich keine Unterschiede im Stadt-Land-Vergleich. 15% der Frauen in einer Großstadt waren HPV-positiv im Vergleich zu 14,2% der Frauen aus ländlichen Gegenden. Gleichzeitig ist eine ländliche Gegend in Brasilien von der sozioökonomischen Struktur mit dem mitteleuropäischen Niveau nicht vergleichbar.

Ein weiterer statistisch signifikanter Risikofaktor für eine multiple Infektion war in der vorliegenden Arbeit eine bereits erlebte Schwangerschaft (vgl. Kapitel Risikofaktoren für multiple Infektionen in ungeimpften Frauen). Ursache hierfür könnte ein höheres Alter speziell dieser Probandinnen sein, was mit einer größeren Anzahl an Sexualpartnern assoziiert ist und dies ist ein bekannter Risikofaktor für eine HPV-Infektion. Diese Frauen hatten unter Umständen insgesamt mehr Geschlechtsverkehr. Das Alter der Frauen beim ersten Kind liegt in Deutschland bei durchschnittlich 29,5 Jahren in Deutschland. Somit sind in der Stichprobe aufgrund des Alters nicht viele Frauen mit einem Kind vertreten (97). In dem multivariaten Modell war das Alter allerdings kein Risikofaktor.

Auch in anderen Studien wurde Schwangerschaft als ein Risikofaktor identifiziert. In einer großen Studie in China konnte ein Abort in der Krankengeschichte der Frauen als Risikofaktor für eine HPV-Infektion identifiziert werden (98). Das kann darauf hinweisen, dass die Vulnerabilität der Frauen durch eine Schwangerschaft beeinflusst wird und die Frauen anfälliger für Infektionen sind. Ein vorausgegangener Abort wurde in der vorliegenden Arbeit nicht gesondert betrachtet. Auch in einer Studie aus Dänemark war die Mutterschaft ein Risikofaktor für singuläre Infektionen, Daten für multiple Infektionen sind bisher nicht veröffentlicht (26). Der Hormonstatus unter einer langen Einnahme von hochdosierten Kontrazeptiva erhöht das Risiko einer persistenten HPV-Infektion und Dysplasientwicklung (104, 105). Da das Ziel der Studie die Erhebung der prävalenten HPV Infektionen und nicht die Persistenz oder Dysplasieentwicklung einer HPV Infektion war, wurde der Hormonstatus, d.h. die Nutzung oraler Kontrazeptiva, nicht weiter untersucht.

In der vorliegenden Arbeit war eine höhere Schulbildung signifikant mit einer multiplen Infektion assoziiert. Dies ist ein überraschendes Ergebnis, da von mehreren Autoren vielmehr eine niedrige Schulbildung als Risikofaktor für eine

singuläre Infektion beschrieben wurde (70). Es ist denkbar, dass die Verzerrung der Gesamtstichprobe (mit mehr höher gebildeten Frauen insgesamt) eine Verzerrung des Ergebnisses bewirkt hat.

In Zusammenschau der Daten aus der Gesamtstichprobe kann man das Ergebnis folgendermaßen interpretieren: Frauen mit einem höheren Bildungsabschluss haben signifikant später Geschlechtsverkehr (spätere Kohabitarche bei höher gebildeten Frauen), also erst später HPV-Kontakt und sind dann in diesem Alter (frühe 20er Jahre) noch multipel infiziert. Das heißt, dass sie im Alter von 20 bis 25 Jahren – recht kurz nach Aufnahme von sexuellem Kontakt – noch multipel infiziert sind. Im Gegensatz dazu stehen Frauen mit geringerem Bildungsniveau, die eine multiple Infektion in einem jüngeren Alter durchleben, da sie früher sexuell aktiv sind und diese Phase der Infektion bereits durchlebt haben und eher singulär infiziert sind.

#### **4.2.1 Präservativgebrauch**

Wie schon in anderen Publikationen gezeigt, deuten die vorliegenden Daten an, dass der „Präservativgebrauch bei einmaliger Kohabitation“ einen protektiven Effekt hat. Herrero et al. (99) haben ähnliche Ergebnisse vorzuweisen. Der sich in den Analysen abzeichnende Trend ist jedoch statistisch nicht signifikant (vgl. Kapitel Risikofaktoren für multiple Infektionen in ungeimpften Frauen).

#### **4.2.2 Anzahl der Sexualpartner**

In mehreren Veröffentlichungen wurde gezeigt, dass eine höhere Anzahl an Sexualpartnern mit einem erhöhten Risiko für eine singuläre HPV-Infektion korreliert (24, 27). Dies konnte in der Gesamtstichprobe ebenfalls bestätigt werden (91). Für multiple Infektionen kann das in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht nachvollzogen werden. Somit kann dies hypothesenbildend sein für eine weitere Analyse.

Diesbezüglich unterscheiden sich die Ergebnisse der vorliegenden Studie deutlich von den Ergebnissen anderer Autoren: Herrero et al. (99) beschreiben für die multiplen Infektionen im Vergleich zu singulären einen stärkeren Zusammenhang zumindest zwischen Sexualverhalten und multipler Infektion. Auch in einer bevölkerungsbasierten chinesischen Querschnitts-Studie mit 1.712 Frauen konnte



die Anzahl der Sexualpartner als ein zentraler Risikofaktor für multiple Infektionen ermittelt werden (92).

Eine Beziehung zwischen dem Sexualverhalten und dem Risiko einer singulären HPV-Infektion wurde auch in mehreren europäischen Ländern beobachtet (25, 26, 24). Auch ein weiterer bekannter Risikofaktor für singuläre Infektionen, „jüngeres Alter bei der/frühe Kohabitarche“, zeigte in der vorliegenden Studie keine Assoziation mit multiplen Infektionen (88).

#### **4.2.3 Nikotinabusus**

Es konnte zudem ein Trend in die Richtung „Rauchen schützt vor multiplen Infektionen“ dargestellt werden. Dieser Trend ist jedoch statistisch nicht signifikant und wahrscheinlich durch andere Parameter (Anzahl Sexualpartner etc.) konfundiert. In mehreren anderen Studien wurde Nikotinabusus vielmehr als Risikofaktor (für singuläre Infektionen) identifiziert (24, 27, 100). In der Gesamtstichprobe waren sowohl ein aktiver Nikotinabusus als auch ein niedriges Alter beim ersten Geschlechtsverkehr signifikant mit einer höheren Anzahl an Sexualpartnern assoziiert.

Zusammenfassend ist also zu sagen, dass die Studie große Differenzen in den bekannten Risikofaktoren für eine HPV-Infektion insgesamt und für multiple Infektionen aufzeigt. Diese Differenzen könnten jedoch in der geringen Fallzahl (mangelnde statistische Power) sowie der eingeschränkt repräsentativen Stichprobe begründet liegen. Andererseits ist zu bedenken, dass der Vergleich von Risikofaktoren für eine singuläre oder multiple Infektion nur HPV-positive Personen berücksichtigt. Somit handelt es sich um eine vergleichsweise homogene Gruppe mit allgemeinen Risikofaktoren für eine HPV-Infektion.

#### **4.3 Klinische Bedeutung**

Die klinische Bedeutung von multiplen Infektionen ist noch nicht abschließend geklärt. Es konnte gezeigt werden, dass multiple Infektionen bei jungen Frauen mit 45,9% unter den HPV-positiven Frauen in Deutschland häufig sind. Es mehren sich die Hinweise, dass eine Koinfektion mit mehreren HPV-Typen mit einem hohen Risiko für Dysplasien assoziiert ist (98, 101, 102). Li et al. (92) postulieren sogar die

Verwendung von multiplen genotypisierten Infektionen als unabhängigen Biomarker. Somit könnte ein Einsatz von HPV-Tests zur individuellen Risikostratifizierung denkbar sein und ein risikoadaptierter Screeningalgorithmus entwickelt werden. Das könnte beispielsweise ein intensiveres Screeningintervall für Patientinnen mit multiplen HR-Infektionen beinhalten.

#### **4.4 Stärken und Schwächen der Untersuchung**

Trotz der bundesweiten randomisierten Stichprobenziehung waren in der gesamten Studienpopulation Frauen mit hohem Bildungsstatus über- und Frauen mit Migrationshintergrund unterrepräsentiert. Dies ist vor allem auf den ausschließlich deutschsprachigen Fragebogen und die für die Teilnahme notwendige Lesearbeit zurückzuführen. Der vergleichsweise hohe Anteil der höher gebildeten Frauen könnte zu einer Verzerrung – im Sinne einer Unterschätzung der Prävalenz – geführt haben, vor allem zur Unterschätzung der Prävalenz von multiplen Infektionen. Eine niedrige Schulbildung gilt als etablierter Risikofaktor für eine (singuläre) HPV-Infektion, somit ist bei einer Population mit einem hohen Anteil an höher gebildeten Frauen der Anteil der infizierten Frauen vermutlich insgesamt geringer.

Die Rücklaufquote ist mit 15% vergleichbar mit ähnlichen Studien (103). Eine Studienteilnahme war mit zeitlichem Aufwand verbunden und ggf. hatten einige Frauen Hemmungen bei der Benutzung des Selbstabnahmesets. In der vorliegenden Arbeit wurde eine kleine Teil-Stichprobe von 89 ungeimpften koinfizierten Frauen untersucht. Die Untersuchung wurde post-hoc geplant. Dies limitiert die statistische Power für die expliziten Fragestellungen und generiert große Konfidenzintervalle aufgrund einer relativ geringen Fallzahl.

Im eingesetzten Fragebogen waren die Frauen angehalten, Angaben zu ihrem Sexualverhalten zu machen. Da dies auf Selbstauskunft beruhte und durch das Studienteam nicht nachkontrolliert werden konnte, kann es zu falschen Angaben im Sinne sozialer Erwünschtheit gekommen sein. Außerdem sind subjektive Fehleinschätzungen bei Fragen zu Ereignissen in der Vergangenheit (beispielsweise Alter beim ersten Geschlechtsverkehr) nicht auszuschließen. Diesbezüglich sind jedoch keine systematischen Fehler zu erwarten. Bei infizierten Patientinnen mit

einer sehr geringen Viruslast ist es zudem möglich, dass diese nicht detektiert wurden und es somit zu falsch negativen Proben gekommen ist.

Positiv zu bewerten ist die Qualität der Basis-Stichprobe, die deutschlandweit durch ein erprobtes Verfahren gezogen wurde. In vielen Merkmalen ist die Basis-Stichprobe repräsentativ für die deutsche Bevölkerung. Die Verwendung eines Selbsttests ermöglichte es auch Frauen in die Messungen einzubeziehen, die nicht regulär am Gebärmutterhalskrebs-Screening beim Frauenarzt teilnehmen. Die Messungen wurden mithilfe eines etablierten Messverfahrens durchgeführt und das Labor, in dem die Analysen realisiert wurden, nimmt regelmäßig an Ringversuchen zur Validierung teil (83).

Abschließend ist zu sagen, dass dies die erste deutschlandweite Studie zur Prävalenz von multiplen HPV-Infektionen bei jungen Frauen ist. Basierend auf den Erhebungen wurden erste Analysen zur Prävalenz verschiedener Genotypen bei multiplen HPV-Infektionen durchgeführt und ein Basisdatensatz generiert. Dieser bildet eine Grundlage um eventuelle zukünftige Verschiebungen der Genotypenprävalenz durch die HPV-Impfung beobachten zu können. Damit kann die Studie einen wichtigen Beitrag zur Ermittlung der populationsbezogenen Wirksamkeit der HVP-Impfung liefern. In der nachfolgenden, bereits geplanten Untersuchung (Start voraussichtlich 2017) könnten mit den vorliegenden Erkenntnissen sowohl die Rücklaufquote erhöht, als auch gezielt mehr Frauen mit niedrigem Bildungsstatus rekrutiert werden, um eine ausgeglichene Stichprobe zu erhalten. Des Weiteren kann der Fragebogen um die Rubrik Abort erweitert werden. Die Charakterisierung der multiplen Infektionen ist ein zentrales Thema im Rahmen der Weiterentwicklung der HPV-Prävention.

## 5 Literaturverzeichnis

1. Steinmann SS. Latein-Wörterbuch [18.04.2017]. Available from: <http://www.frag-caesar.de/lateinwoerterbuch/papilla-uebersetzung.html>
2. Andrew MQ King (Editor) ELE, Michael J. Adams (Editor), Eric B. Carstens (Editor) *Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*: Elsevier; 2011.
3. Wikipedia. Papillomaviridae: Wikipedia; [18.04.2017]. Available from: [https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/c/c4/Papilloma\\_Virus\\_%28HPV%29\\_EM.jpg](https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/c/c4/Papilloma_Virus_%28HPV%29_EM.jpg).
4. de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. *Virology*. 2004;324(1):17-27.
5. Center IHPR. Human papillomavirus reference clones [21.12.2016]. Available from: <http://www.hpvcenter.se/html/refclones.html>
6. Santos-Lopez G, Marquez-Dominguez L, Reyes-Leyva J, Vallejo-Ruiz V. [General aspects of structure, classification and replication of human papillomavirus]. *Revista medica del Instituto Mexicano del Seguro Social*. 2015;53 Suppl 2:S166-71.
7. Bzhalava D, Eklund C, Dillner J. International standardization and classification of human papillomavirus types. *Virology*. 2015;476:341-4.
8. Tommasino M. The human papillomavirus family and its role in carcinogenesis. *Seminars in cancer biology*. 2014;26:13-21.
9. Muñoz N, Bosch FX, de Sanjosé S, Herrero R, Castellsagué X, Shah KV, Snijders, PJF, Meijer C, Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med*. 2003;348(6):518-27.
10. Mittendorf T, Nocon M, Roll S, Muhlberger N, Sroczynski G, Siebert U, Willich SN, von der Schulenburg JM. Assessment of effectiveness and cost-effectiveness of HPV testing in primary screening for cervical. *GMS health technology assessment*. 2007;3:Doc08.
11. Burchell AN, Winer RL, de Sanjose S, Franco EL. Chapter 6: Epidemiology and transmission dynamics of genital HPV infection. *Vaccine*. 2006;24 Suppl 3:S3/52-61.
12. zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nature reviews Cancer*. 2002;2(5):342-50.

13. Hof H, Rüdiger D, Medizinische Mikrobiologie: Thieme; 2014.S. 253–256
14. McKinney CC, Hussmann KL, McBride AA. The Role of the DNA Damage Response throughout the Papillomavirus Life Cycle. *Viruses*. 2015;7(5):2450-69.
15. Harari A, Chen Z, Burk RD. Human papillomavirus genomics: past, present and future. *Current problems in dermatology*. 2014;45:1-18.
16. Munger K, Howley PM. Human papillomavirus immortalization and transformation functions. *Virus research*. 2002;89(2):213-28.
17. Trottier H, Franco EL. The epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Vaccine*. 2006;24 Suppl 1:S1-15.
18. Stanley MA. Epithelial cell responses to infection with human papillomavirus. *Clinical microbiology reviews*. 2012;25(2):215-22.
19. Bosch FX, de Sanjose S. Chapter 1: Human papillomavirus and cervical cancer--burden and assessment of causality. *Journal of the National Cancer Institute Monographs*. 2003(31):3-13.
20. Bruni L, Diaz M, Castellsague X, Ferrer E, Bosch FX, de Sanjose S. Cervical human papillomavirus prevalence in 5 continents: meta-analysis of 1 million women with normal cytological findings. *The Journal of infectious diseases*. 2010;202(12):1789-99.
21. Bosch FX, Burchell AN, Schiffman M, Giuliano AR, de Sanjose S, Bruni L, Tortolero-Luna G, Kjaer SK, Munoz N. Epidemiology and natural history of human papillomavirus infections and type-specific implications in cervical neoplasia. *Vaccine*. 2008;26 Suppl 10:K1-16.
22. Syrjanen K, Hakama M, Saarikoski S, Vayrynen M, Yliskoski M, Syrjanen S, Kataja V, Castren O. Prevalence, incidence, and estimated life-time risk of cervical human papillomavirus infections in a nonselected Finnish female population. *Sex Transm Dis*. 1990;17(1):15-9.
23. Workowski KA, Bolan GA. Sexually transmitted diseases treatment guidelines, 2015. *MMWR Recommendations and reports : Morbidity and mortality weekly report Recommendations and reports / Centers for Disease Control*. 2015;64(Rr-03):1-137.

24. Iftner T, Eberle S, Iftner A, Holz B, Banik N, Quint W, Straube AN. Prevalence of Low-Risk and High-Risk Types of Human Papillomavirus and Other Risk Factors for HPV Infection in Germany Within Different Age Groups in Women up to 30 Years of Age: An Epidemiological Observational Study. *Journal of Medical Virology*. 2010;82(11):1928-39.
25. Lenselink CH, Melchers WJ, Quint WG, Hoebbers AM, Hendriks JC, Massuger LF, Bekkers SL. Sexual behaviour and HPV infections in 18 to 29 year old women in the pre-vaccine era in the Netherlands. *PloS one*. 2008;3(11):e3743.
26. Nielsen A, Kjaer SK, Munk C, Iftner T. Type-specific HPV infection and multiple HPV types: Prevalence and risk factor profile in nearly 12,000 younger and older Danish women. *Sexually Transmitted Diseases*. 2008;35(3):276-82.
27. Deacon JM, Evans CD, Yule R, Desai M, Binns W, Taylor C, Peto J. Sexual behaviour and smoking as determinants of cervical HPV infection and of CIN3 among those infected: a case-control study nested within the Manchester cohort. *British journal of cancer*. 2000;83(11):1565-72.
28. Petry KU, Luyten A, Justus A, Iftner A, Strehlke S, Reinecke-Luethge A, Grunwald E, Schulze-Rath R, Iftner T. Prevalence of high-risk HPV types and associated genital diseases in women born in 1988/89 or 1983/84-results of WOLVES, a population-based epidemiological study in Wolfsburg, Germany. *Bmc Infectious Diseases*. 2013;13.
29. Klug SJ, Hukelmann M, Hollwitz B, Duzenli N, Schopp B, Petry KU, Iftner T. Prevalence of human papillomavirus types in women screened by cytology in Germany. *J Med Virol*. 2007;79(5):616-25.
30. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders, Peto J, Meijer CJ, Munoz N. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *The Journal of pathology*. 1999;189(1):12-9.
31. Villain P, Gonzalez P, Almonte M, Franceschi S, Dillner J, Anttila A, Park JY, De Vuyst H, Herrero R. European Code against Cancer 4th Edition: Infections and Cancer. *Cancer epidemiology*. 2015;39 Suppl 1:S120-38.
32. Schiffman M, Kjaer SK. Chapter 2: Natural history of anogenital human papillomavirus infection and neoplasia. *Journal of the National Cancer Institute Monographs*. 2003(31):14-9.
33. Collins Y, Einstein MH, Gostout BS, Herzog TJ, Massad LS, Rader JS, Wright J. Cervical cancer prevention in the era of prophylactic vaccines: a preview for gynecologic oncologists. *Gynecologic oncology*. 2006;102(3):552-62.
34. Center Human Papillomavirus and Related Diseases Report [18.04.2017]. Available from: <http://www.hpvcentre.net/statistics/reports/XWX.pdf>.

35. IARC. Cervical Cancer, Estimated Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012–2016 [18.04.2017]. Available from: [http://globocan.iarc.fr/Pages/fact\\_sheets\\_cancer.aspx](http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx)
36. WHO. HPV-Centre [18.04.2017]. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs380/en/>
37. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2015;65(2):87-108.
38. Quinn M, Babb P, Jones J, Allen E. Effect of screening on incidence of and mortality from cancer of cervix in England: evaluation based on routinely collected statistics. *BMJ (Clinical research ed)*. 1999;318(7188):904-8.
39. Bertz K. Nationaler Krebsplan, Weiterentwicklung der Früherkennung „Organisiertes Zervixkarzinom-Screening“ [18.04.2017]. Available from: [https://www.bundesgesundheitsministerium.de/fileadmin/Dateien/3\\_Downloads/N/Nationaler\\_Krebsplan/Ziel\\_2a\\_Weiterentwicklung\\_Zervixkarzinom\\_Screening.pdf](https://www.bundesgesundheitsministerium.de/fileadmin/Dateien/3_Downloads/N/Nationaler_Krebsplan/Ziel_2a_Weiterentwicklung_Zervixkarzinom_Screening.pdf)
40. HPV Information Centre, „Human Papillomavirus and Related Diseases Report 2016.“ [21.12.2016], Available from: <http://www.hpvcentre.net/statistics/reports/XWX.pdf>
41. Kaatsch P, Katalinic A, Hentschel S, Luttmann S, Stegmaier C, Caspritz S, Christ M, Ernst A, Folkerts J, Hansmann J, Klein S, Kranzhöfer K, Kunz B, Manegold K, Penzkofer A, Tremel C, Weg-Remers S, Wittenberg K, Baras N, Barnes B, Bertz J, Buttman-Schweiger N, Dahm S, Fiebig J, Franke M, Kraywinkel K, Wienecke A, Wolf U. Krebs in Deutschland, 2015. [21.12.2016], Available from: [http://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs\\_in\\_Deutschland/kid\\_2015/krebs\\_in\\_deutschland\\_2015.pdf?\\_\\_blob=publicationFile](http://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/kid_2015/krebs_in_deutschland_2015.pdf?__blob=publicationFile)
42. Schiffman M, Castle PE, Jeronimo J, Rodriguez AC, Wacholder S. Human papillomavirus and cervical cancer. *Lancet (London, England)*. 2007;370(9590):890-907.
43. Clifford GM, Gallus S, Herrero R, Munoz N, Snijders PJ, Vaccarella S, Anh PT, Ferreccio C, Hieu NT, Matos E, Molano M, Rajkumar R, Ronco G, de Sanjose S, Shin HR, Sukvirach S, Thomas JO, Tunsakul S, Meijer CJ, Franceschi S. Worldwide distribution of human papillomavirus types in cytologically normal women in the International Agency for Research on Cancer HPV prevalence surveys: a pooled analysis. *Lancet (London, England)*. 2005;366(9490):991-8.
44. Clifford GM, Smith JS, Plummer M, Munoz N, Franceschi S. Human papillomavirus types in invasive cervical cancer worldwide: a meta-analysis. *British journal of cancer*. 2003;88(1):63-73.
45. Smith JS, Lindsay L, Hoots B, Keys J, Franceschi S, Winer R, Clifford GM. Human papillomavirus type distribution in invasive cervical cancer and high-

grade cervical lesions: a meta-analysis update. International journal of cancer Journal international du cancer. 2007;121(3):621-32.

46. Smith HO, Tiffany MF, Qualls CR, Key CR. The rising incidence of adenocarcinoma relative to squamous cell carcinoma of the uterine cervix in the United States--a 24-year population-based study. Gynecologic oncology. 2000;78(2):97-105.

47. Andersson S, Rylander E, Larsson B, Strand A, Silfversvard C, Wilander E. The role of human papillomavirus in cervical adenocarcinoma carcinogenesis. European journal of cancer (Oxford, England : 1990). 2001;37(2):246-50.

48. Ulrich Schenck BA, Florian Bergauer, Thomas Weyerstahl. Neue Zytologische Klassifikation – Münchner Nomenklatur III:Was ist wichtig für die Praxis? gyne 06/2014:21-7.

49. H. Griesser KM, B. Jordan, W. Kühn, K. Neis, H. H. Neumann, R. Bollmann, B. Pöschel, M. Steiner, U. Schenck. Münchner Nomenklatur III. FRAUENARZT. 2013;54:1042-8.

50. Paavonen J, Jenkins D, Bosch FX, Naud P, Salmeron J, Wheeler CM, Chow SN, Apter DL, Kitchener HC, Castellsague X, de Carvalho NS, Skinner SR, Harper DM, Hedrick JA, Jaisamrarn U, Limson GA, Dionne M, Quint W, Spiessens B, Peters P, Struyf F, Wieting SL, Lehtinen MO, Dubin G. Efficacy of a prophylactic adjuvanted bivalent L1 virus-like-particle vaccine against infection with human papillomavirus types 16 and 18 in young women: an interim analysis of a phase III double-blind, randomised controlled trial. Lancet (London, England). 2007;369(9580):2161-70.

51. Quadrivalent vaccine against human papillomavirus to prevent high-grade cervical lesions. N Engl J Med. 2007;356(19):1915-27.

52. Garland SM, Hernandez-Avila M, Wheeler CM, Perez G, Harper DM, Leodolter S, Tang GW, Ferris DG, Steben M, Bryan J, Taddeo FJ, Railkar R, Esser MT, Sings HL, Neslon M, Boslgeo J, Sattler C, Barr E, Koutsky LA. Quadrivalent vaccine against human papillomavirus to prevent anogenital diseases. N Engl J Med. 2007;356(19):1928-43.

53. Robert-Koch-Institut. Impfkalender 2016 [18.04.2017]. Available from: [https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/Impfen/Materialien/Downloads-Impfkalender/Impfkalender\\_Deutsch.pdf?\\_\\_blob=publicationFile](https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/Impfen/Materialien/Downloads-Impfkalender/Impfkalender_Deutsch.pdf?__blob=publicationFile)

54. Yang A, Jeang J, Cheng K, Cheng T, Yang B, Wu TC, Hung CF. Current state in the development of candidate therapeutic HPV vaccines. Expert review of vaccines. 2016:1-19.



55. Cervantes JL. Multiple human papillomavirus infection: don't forget the genetic background. *The Journal of infectious diseases*. 2011;204(11):1816; author reply -7.

56. No JH, Kim MK, Jeon YT, Kim YB, Song YS. Human papillomavirus vaccine: widening the scope for cancer prevention. *Molecular carcinogenesis*. 2011;50(4):244-53.

57. Nadarzynski T, Waller J, Robb KA, Marlow LA. Perceived risk of cervical cancer among pre-screening age women (18-24 years): the impact of information about cervical cancer risk factors and the causal role of HPV. *Sexually transmitted infections*. 2012;88(6):400-6.

58. Verband der Diagnostica-Industrie, Zervixkarzinomscreening – Sie haben die Wahl, 2015. [21.12.2016], Available from: <http://www.hpvcentre.net/statistics/reports/XWX.pdf>

59. Carozzi F, Ronco G, Gillio-Tos A, De Marco L, Del Mistro A, Girlando S, Franceschi S, Plummer M, Vaccarella S. Concurrent infections with multiple human papillomavirus (HPV) types in the New Technologies for Cervical Cancer (NTCC) screening study. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*. 2012;48(11):1633-7.

60. Smith M., Occurrence, determinants and dynamics of HPV coinfections in a cohort of Montreal university students: Queen's University Kingston, Ontario, Canada; 2011. [21.12.2016], Available from: [https://qspace.library.queensu.ca/bitstream/handle/1974/6383/Smith\\_Michaela\\_A\\_201104\\_MSc.pdf;jsessionid=12BCAC998FEBEB708BFA2D85ECFBD5B3?sequence=1](https://qspace.library.queensu.ca/bitstream/handle/1974/6383/Smith_Michaela_A_201104_MSc.pdf;jsessionid=12BCAC998FEBEB708BFA2D85ECFBD5B3?sequence=1)

61. Schmitt M, Depuydt C, Benoy I, Bogers J, Antoine J, Arbyn M, Pawlita M. Multiple human papillomavirus infections with high viral loads are associated with cervical lesions but do not differentiate grades of cervical abnormalities. *J Clin Microbiol*. 2013;51(5):1458-64.

62. Chaturvedi AK, Katki HA, Hildesheim A, Rodriguez AC, Quint W, Schiffman M, Van Doorn LJ, Porras C, Wacholder S, Gonzalez P, Sherman ME, Herrero R. Human papillomavirus infection with multiple types: pattern of coinfection and risk of cervical disease. *The Journal of infectious diseases*. 2011;203(7):910-20.

63. Spinillo A, Gardella B, Roccio M, Alberizzi P, Cesari S, Patrizia M, Silini E. Multiple human papillomavirus infection with or without type 16 and risk of cervical intraepithelial neoplasia among women with cervical cytological abnormalities. *Cancer causes & control : CCC*. 2014;25(12):1669-76.

64. Spinillo A, Gardella B, Iacobone AD, Cesari S, Alberizzi P, Silini EM. Multiple Papillomavirus Infection and Size of Colposcopic Lesions Among Women With Cervical Intraepithelial Neoplasia. *Journal of lower genital tract disease*. 2015.

65. Munagala R, Dona MG, Rai SN, Jenson AB, Bala N, Ghim SJ, Gupta RC. Significance of multiple HPV infection in cervical cancer patients and its impact on treatment response. *International journal of oncology*. 2009;34(1):263-71.
66. Safaeian M, Rodriguez AC. Invited commentary: multiple human papillomavirus infections and type replacement-anticipating the future after human papillomavirus vaccination. *American journal of epidemiology*. 2014;180(11):1076-81.
67. Rousseau MC, Pereira JS, Prado JC, Villa LL, Rohan TE, Franco EL. Cervical coinfection with human papillomavirus (HPV) types as a predictor of acquisition and persistence of HPV infection. *The Journal of infectious diseases*. 2001;184(12):1508-17.
68. Forslund O, Antonsson A, Edlund K, van den Brule AJ, Hansson BG, Meijer CJ, Ryd W, Rylander E, Strand A, Wadell G., Dillner J, Johansson B. Population-based type-specific prevalence of high-risk human papillomavirus infection in middle-aged Swedish women. *J Med Virol*. 2002;66(4):535-41.
69. Cuschieri KS, Cubie HA, Whitley MW, Seagar AL, Arends MJ, Moore C, Gilkisson G, McGogaan E. Multiple high risk HPV infections are common in cervical neoplasia and young women in a cervical screening population. *Journal of clinical pathology*. 2004;57(1):68-72.
70. Dunne EF, Unger ER, Sternberg M, McQuillan G, Swan DC, Patel SS, Markowitz LE. Prevalence of HPV infection among females in the United States. *Jama-Journal of the American Medical Association*. 2007;297(8):813-9.
71. Mollers M, Vriend HJ, van der Sande MA, van Bergen JE, King AJ, Lenselink CH, Bekkers RL, Meijer CJ, de Melker HE, Bogaards JA. Population- and type-specific clustering of multiple HPV types across diverse risk populations in the Netherlands. *American journal of epidemiology*. 2014;179(10):1236-46.
72. Pista A, de Oliveira CF, Cunha MJ, Paixao MT, Real O. Prevalence of human papillomavirus infection in women in Portugal: the CLEOPATRE Portugal study. *International journal of gynecological cancer : official journal of the International Gynecological Cancer Society*. 2011;21(6):1150-8.
73. Speich N, Schmitt C, Bollmann R, Bollmann M. Human papillomavirus (HPV) study of 2916 cytological samples by PCR and DNA sequencing: genotype spectrum of patients from the west German area. *Journal of medical microbiology*. 2004;53(Pt 2):125-8.
74. Scheidt-Nave C, Kamtsiuris P, Gosswald A, Hoelling H, Lange M, Busch MA, Dahm S, Dölle R, Ellert U, fuchs J, Hapke U, Heidemann C, Knopf H, Laussmann D, Mensink GB, Neuhauser H, Richter A, Sass AC, Rosario AS, Stolzenberg H, Thamm M, Kurth BM. German health interview and examination survey for adults (DEGS) - design, objectives and implementation of the first data collection wave. *Bmc Public Health*. 2012;12.

75. BIK Aschpurwis + Behrens GmbH. BIK- Regionen 2001 [18.04.2017]. Available from: <http://www.bik-gmbh.de/texte/BIK-Regionen2000.pdf>.
76. Cox LH. A constructive procedure for unbiased controlled rounding. *Journal of the American Statistical Association*. 1987;82(398):520-4.
77. Statistisches Bundesamt Deutschland. Genesis Online Datenbank 2013 [18.04.2017]. Available from: <https://www-genesis.destatis.de/genesis/online>.
78. Robert-Koch-Institut. Daten und Fakten: Ergebnisse der Studie „Gesundheit in Deutschland aktuell 2010“ 2012 [18.04.2017]. Available from: [http://www.rki.de/DE/Content/Gesundheitsmonitoring/Gesundheitsberichterstattung/GBEDownloadsB/GEDA2010.pdf;jsessionid=E4022FB5F9F7BD1D29AF49255804118E.1\\_cid390?\\_\\_blob=publicationFile](http://www.rki.de/DE/Content/Gesundheitsmonitoring/Gesundheitsberichterstattung/GBEDownloadsB/GEDA2010.pdf;jsessionid=E4022FB5F9F7BD1D29AF49255804118E.1_cid390?__blob=publicationFile)
79. Delere Y, Schuster M, Vartazarowa E, Haensel T, Hagemann I, Borchardt S, Perlitz H, Schneider A, Reiter S, Kaufmann AM. Cervicovaginal Self-Sampling Is a Reliable Method for Determination of Prevalence of Human Papillomavirus Genotypes in Women Aged 20 to 30 Years. *Journal of Clinical Microbiology*. 2011;49(10):3519-22.
80. Snijders PJ, van den Brule AJ, Schrijnemakers HF, Snow G, Meijer CJ, Walboomers JM. The use of general primers in the polymerase chain reaction permits the detection of a broad spectrum of human papillomavirus genotypes. *The Journal of general virology*. 1990;71 ( Pt 1):173-81.
81. de Roda Husman AM, Walboomers JM, van den Brule AJ, Meijer CJ, Snijders PJ. The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR. *The Journal of general virology*. 1995;76 ( Pt 4):1057-62.
82. Schmitt M, Dondog B, Waterboer T, Pawlita M. Homogeneous amplification of genital human alpha papillomaviruses by PCR using novel broad-spectrum GP5+ and GP6+ primers. *Journal of Clinical Microbiology*. 2008;46(3):1050-9.
83. Schmitt M, Bravo IG, Snijders PJ, Gissmann L, Pawlita M, Waterboer T. Bead-based multiplex genotyping of human papillomaviruses. *J Clin Microbiol*. 2006;44(2):504-12.
84. Luminex Corporation. xMAP® Technology - Luminex [18.04.2017]. Available from: <http://www.luminexcorp.com/TechnologiesScience/xMAPTechnology/>.
85. PROGEN Biotechnik GmbH. Luminex-Technologie [21.12.2016]. Available from: <http://www.progen.de/de/multiplexe-technologie/luminex-technologie.html>.

86. Medizinisches Versorgungszentrum Dr. Klein, Dr. Rost und Kollegen. Bead Array-SSO [21.04.2017]. Available from: <http://www.medizinische-genetik.de/index.php?id=8711>.
87. Kjaer SK, Breugelmans G, Munk C, Junge J, Watson M, Iftner T. Population-based prevalence, type- and age-specific distribution of HPV in women before introduction of an HPV-vaccination program in Denmark. *International Journal of Cancer*. 2008;123(8):1864-70.
88. Renschmidt C, Kaufmann AM, Hagemann I, Vartazarova E, Wichmann O, Delere Y. Risk Factors for Cervical Human Papillomavirus Infection and High-Grade Intraepithelial Lesion in Women Aged 20 to 31 Years in Germany. *International Journal of Gynecological Cancer*. 2013;23(3):519-26.
89. Genesis Online Database: Federal statistical office, Wiesbaden. [18.04.2017]. Available from: <https://www-genesis.destatis.de/genesis/online>.
90. Vaccarella S, Franceschi S, Snijders PJ, Herrero R, Meijer CJ, Plummer M. Concurrent infection with multiple human papillomavirus types: pooled analysis of the IARC HPV Prevalence Surveys. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*. 2010;19(2):503-10.
91. Renschmidt C. Prävalenz Humaner Papillomviren (HPV) und Risikofaktoren für eine Infektion: eine Querschnittsstudie unter jungen Frauen in Deutschland., unveröffentlichte Masterarbeit 2013
92. Li N, Dai M. [Relationship between multiple infection of human papillomavirus and cervical neoplasia among Chinese women in urban areas]. *Zhonghua yu fang yi xue za zhi [Chinese journal of preventive medicine]*. 2010;44(5):423-6.
93. Hibbitts S, Jones J, Powell N, Dallimore N, McRea J, Beer H, Tristram A, Fielder H, Fiander AN. Human papillomavirus prevalence in women attending routine cervical screening in South Wales, UK: a cross-sectional study. *British journal of cancer*. 2008;99(11):1929-33.
94. Liaw KL, Hildesheim A, Burk RD, Gravitt P, Wacholder S, Manos MM, Scott DR, Sherman ME, Kurman RJ, Glass AG, Anderson SM, Schiffman M. A prospective study of human papillomavirus (HPV) type 16 DNA detection by polymerase chain reaction and its association with acquisition and persistence of other HPV types. *The Journal of infectious diseases*. 2001;183(1):8-15.
95. Thomas KK, Hughes JP, Kuypers JM, Kiviat NB, Lee SK, Adam DE, Koutsky LA. Concurrent and sequential acquisition of different genital human papillomavirus types. *The Journal of infectious diseases*. 2000;182(4):1097-102.

96. Pinto Dda S, Fuzii HT, Quaresma JA. [Prevalence of genital HPV infection in urban and rural women in the Eastern Brazilian Amazon]. *Cadernos de saude publica*. 2011;27(4):769-78.

97. Statistisches Bundesamt Deutschland, Bevölkerung [18.04.2017] Available from: <https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/GesellschaftStaat/Bevoelkerung/Geburten/Tabellen/GeburtenMutterBiologischesAlter.html>

98. Liang LY, Du H, Zhang W, Chen Y, Wu B, Qu XF, Wang C, Yang B, Wu RS, Belinson JL, Wu RF. Relevant factors to female human papillomavirus infection in city and rural areas of Shenzhen. *Zhonghua liu xing bing xue za zhi = Zhonghua liuxingbingxue zazhi*. 2013;34(8):796-9.

99. Herrero R, Castle PE, Schiffman M, Bratti MC, Hildesheim A, Morales J, Alfaro M, Sherman ME, Wacholder S, Chen S, Rodriguez AC, Burk RD. Epidemiologic profile of type-specific human papillomavirus infection and cervical neoplasia in Guanacaste, Costa Rica. *The Journal of infectious diseases*. 2005;191(11):1796-807.

100. Veldhuijzen NJ, Snijders PJ, Reiss P, Meijer CJ, van de Wijgert JH. Factors affecting transmission of mucosal human papillomavirus. *The Lancet Infectious diseases*. 2010;10(12):862-74.

101. Plummer M, Vaccarella S, Franceschi S. Multiple human papillomavirus infections: the exception or the rule? *The Journal of infectious diseases*. 2011;203(7):891-3.

102. Arbyn M, Benoy I, Simoens C, Bogers J, Beutels P, Depuydt C. Prevaccination distribution of human papillomavirus types in women attending at cervical cancer screening in Belgium. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*. 2009;18(1):321-30.

103. Szarewski A, Cadman L, Mesher D, Austin J, Ashdown-Barr L, Edwards R, Lyons D, Walker J, Christison J, Frater A, Waller J. HPV self-sampling as an alternative strategy in non-attenders for cervical screening - a randomised controlled trial. *British journal of cancer*. 2011;104(6):915-20.

104. Roura E, Travier N, Waterboer T, de Sanjose S, Bosch FX, Pawlita M, et al. The Influence of Hormonal Factors on the Risk of Developing Cervical Cancer and Pre-Cancer: Results from the EPIC Cohort. *PLoS one*. 2016;11(1):e0147029.

105. Combined estrogen-progestogen contraceptives and combined estrogen-progestogen menopausal therapy. *IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans*. 2007;91:1-528.

## Literaturverzeichnis

## 6 Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Josefine Leuschner, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema „Prävalenz multipler Infektionen mit humanen Papillomviren bei jungen Frauen in Deutschland“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE – [www.icmje.org](http://www.icmje.org)) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Grafiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o.) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autorin bin, entsprechen den URM (s. o.) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

---

Ort, Datum

---

Unterschrift

## Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.



## Lebenslauf

## **Publikationsliste**

- (1) Deleré Y, Remschmidt C, Leuschner J, Schuster M, Fesenfeld M, Schneider A, Wichmann O, Kaufmann AM. Human Papillomavirus prevalence and probable first effects of vaccination in 20 to 25 year-old women in Germany: a population-based cross-sectional study via home-based self-sampling. BMC Infectious Disease 2014;14:87 doi: 10.1186/1471-2334-14-87
- (2) Haußig J, Kaufmann AM, HPV-Impfung zur posttherapeutischen Prophylaxe bei Frauen nach Cervix-, Vulva- oder Vaginalläsionen. Onkologe 2012; 18:1147-1148

## **Anteilerklärung an etwaigen erfolgten Publikationen**

Josefine Leuschner hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1:

Aufarbeitung der Proben, Durchführung der PCR mit anschließender HPV-Genotypisierung mittels Luminex-Technologie.

Publikation 2:

Literaturrecherche, Verfassen des Textes

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers

Unterschrift der Doktorandin

## **Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich bei der Anfertigung dieser Promotion motiviert und unterstützt haben.

Als Erstes danke ich Herrn PD Dr. Andreas M. Kaufmann, Leiter des Labors für Tumormimmunologie, Klinik für Gynäkologie der Charité für die Vergabe und Betreuung der Dissertation und ganz besonders für seine unendliche Geduld, die wertvollen Anregungen und sehr hilfreichen Diskussionen.

Zudem gilt mein Dank Herrn Dr. med. Cornelius Remschmidt, (MPH), RKI Abteilung Infektionsepidemiologie, für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung und Beantwortung vieler Fragen sowie Frau Dr. med. Yvonne Deléré für die Zusammenarbeit, Planung und Organisation.

Frau Dr. Elena Vartazarova, Frau Ursula Schiller und Frau Christiane Fangerau danke ich für die nette Einarbeitung im Labor.

Vielen Dank auch an die zahlreichen Teilnehmerinnen ohne die diese Arbeit natürlich nicht möglich gewesen wäre.

Besonderer Dank gilt meinem Mann Fabian Leuschner und meinen Eltern Martina und Thilo Haußig.