

Nachweis von humanen Papillomaviren (HPV)

Möglichkeiten und Grenzen in der Krebsvorsorge

Die Eidgenössische Kommission für Impffragen hat im Juni dieses Jahres die prophylaktische Impfung gegen onkogene HP-Viren empfohlen (EKIF 2007) (1). Eine möglichst präzise Diagnostik HPV-assoziiierter Veränderungen des Genitaltraktes ist somit aktueller denn je. Dieser Beitrag gibt eine Übersicht über heute verfügbare diagnostische Möglichkeiten. Gynäkologen, Zytologen und Molekulardiagnostiker sind heute als Team gefordert. Entscheidend ist Augenmass, aus dem Möglichen das für die Patientin Sinnvolle unter Berücksichtigung des Kosten-Nutzen-Verhältnisses zu wählen.

THOMAS FRIEDRICH, JÜRIG KUNZ

Zytologie als Screeningmethode einer klinisch relevanten HPV-Infektion

Die Vorsorgezytologie wird auch nach Einführung der HPV-Impfung ihren primären Stellenwert in der Erfassung klinisch relevanter HPV-Infektionen besitzen. Dies betonen auch die nationalen Komitees zur Einführung der Impfung. Sie ist zunächst prophylaktisch für Adoleszenten vor der Kohabitarche vorgesehen; für die Mehrzahl der Frauen ändert sich somit zunächst nichts. Aber auch bei der geimpften jungen Frau bleibt ein onkologisches Restrisiko bestehen, da nicht alle High-risk-HPV-Typen erfasst werden. Schliesslich können nur durch die Nachuntersuchungen der Geimpften wichtige epidemiologische Fragen beantwortet werden, so zum Beispiel, ob sich durch die Impfung nicht erfasste onkogene HPV-Typen eventuell ausbreiten.

Seit der Publikation der Fachkommission der Schweizerischen Gesellschaft für Gynäkologie aus den Jahren 2005 und 2006, bei der als «gut schweizerischer Kompromiss» die Gleichwertigkeit von Dünnschichtmethoden und konventionellem Abstrich festgestellt wurde, liegen reichlich neue Daten vor, die zur Aufgabe dieser traditionellen Neutralität einladen (2).

So wurden in einer prospektiven Studie am gleichen Material (split sampling) der konventionelle Ausstrich und die Dünnschichtzytologie getestet hinsichtlich der Rate an Dysplasien und unklarer Befunde mit gleichzeitiger vollständiger histologischer Validierung. Die Sensitivität der Entdeckung einer mittleren bis schweren Dysplasie stieg von 47% beim konventionellen Abstrich auf 66% im Dünnschichtverfahren, die Rate der Zellen unklarer Signifikanz (ASCUS) sank von 8% auf 4,5% (3). Auch in unserer retrospektiven Auswertung im parallelen Vergleich beider Metho-

den fanden wir den gleichen, statistisch signifikanten Zusammenhang. Als weiteren Vorteil entdeckten wir in den Dünnschichtpräparaten signifikant häufiger virusassoziierte Zellveränderungen (Koilozyten). Ein weiterer wichtiger Vorteil ist die auch nachträgliche Möglichkeit, HPV am Restmaterial nachzuweisen.



Abbildung 1: Konventioneller Abstrich (links) und Dünnschichtabstrich (rechts). Für den praktisch tätigen Zytologen, der beide Methoden kennt, steht der Qualitätsgewinn der Dünnschichtmethode ausser Frage.

Computerassistierte Auswertungssysteme

In den letzten Jahren werden zunehmend computerassistierte Auswertungssysteme zur Unterstützung der screenenden Person eingesetzt. Das Prinzip besteht in der Bestimmung der Farbeintensität von Zell-

kernen. Diese ist bei bestimmten Farbstoffen, zum Beispiel bei der Feulgen-Färbung, aufgrund ihrer selektiven Anfärbung von DNA-Strukturen proportional zum DNA-Gehalt. Wenn ein Einbau von HPV-Genom in den Zellkern (sog. integrierte DNA) zu einer Deregulation des Zellzyklus und zur abnormalen Vermehrung von DNA, also zu «dunkleren» Zellkernen, führt, kann dies vom Computer erkannt werden. Die Entscheidungsfindung des visuellen Screenens wird somit durch ein objektives Messergebnis nachgeahmt. Es gibt allerdings zahlreiche «Schafe im Wolfspelz», also gutartige Zellen mit «dunklen Kernen», zum Beispiel regenerierende basale endozervikale Zellen. Es bedarf somit zur Interpretation ausgebildeter Spezialisten. Der Computer ist eine wertvolle Hilfe, da er nicht ermüdet und nichts übersieht. Aber rein qualitativ kann er – mit der heutigen Software – nicht besser sein als der nachkontrollierende, entscheidende Mensch. Labore mit einer spezifischen Ausstattung der DNA-Zytometrie können mithilfe dieser Feulgen-Färbung eine selektive Messung dysplasieverdächtigere Zellelemente vornehmen. In der gynäkologischen Zytologie würde ein Nachweis einer unkontrollierten DNA-Vermehrung einen indirekten Hinweis auf eine persistierende, onkogene HPV-Infektion geben. Wir setzen diese elegante Methode aufgrund des hohen personellen Aufwandes und der damit verbundenen hohen Kosten allerdings nur in Ausnahmefällen ein.

Indirekter Nachweis einer persistierenden High-risk-HPV-Infektion durch die p16-Immunreaktion

p16, genauer p16^{INK4a}, ist ein Zellkernprotein, welches in die Regulation des Zellzyklus involviert ist. Bei einer persistierenden High-risk-HPV-Infektion wird dieses Protein über eine Reaktionskaskade hochreguliert und ist direkt in der Zelle immunhistologisch nachweisbar. Es ist sowohl am Dünnschichtpräparat (Abbildung 2) als auch am histologischen Gewebe (Abbildung 3) gut einsetzbar und im System spezifisch. Sein Vorteil liegt im günstigen Preis; sein Nachteil ist, dass es nur ein indirekter globaler Test ist und man die involvierten HPV-Typen somit nicht kennt.

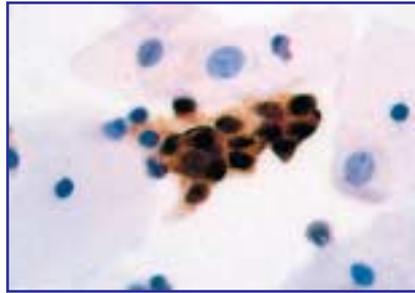


Abbildung 2: Nachweis p16-positiver Plattenepithelien in der Dünnschichtzytologie. Benchmark-II-Immunstainer

Es existieren Entwicklungen, die p16-Immunreaktion an der flüssigkeitsbasierten Zytologie für das automatische Vorscreenen zu nutzen. Damit könnte die Sensitivität der Entdeckung von HPV-assoziierten Zellveränderungen gesteigert werden.

Nachweis des HPV-L1-Hüllenproteins

Mit dem Viractiv®-Test oder vergleichbaren Tests wird es möglich, komplette, also infektiöse Viruspartikel nachzuweisen (Abbildung 4). Ein solcher Test dient dazu, HPV-positive Frauen über ihre Infektiosität zu informieren. Ist der Test negativ, kann die Gefahr einer Übertragung der HPV-Infektion nahezu ausgeschlossen

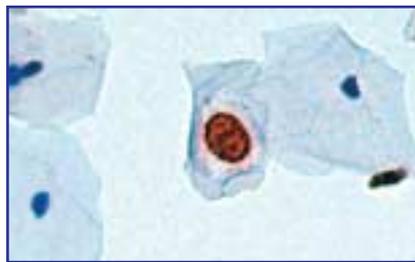


Abbildung 4: Nachweis des kompletten HPV-Virus. Koilozyt als Zeichen einer aktiven Infektion. Viractiv®-Methode

sen werden. Hinsichtlich der Erkennung von Krebsvorstufen ist der Test nicht einsetzbar, da bei dysplastischen Zellveränderungen keine kompletten Viren mehr ausgeschleust werden, die Patientin somit nicht mehr infektiös ist.

Direkter Nachweis von humanen Papillomaviren

Humane Papillomaviren wachsen nicht in konventionellen Zellkulturen, eine Anzucht ist somit nicht möglich. Ein indirekter Rückschluss auf das Virus über den Antikörpertiter der Patientin besitzt

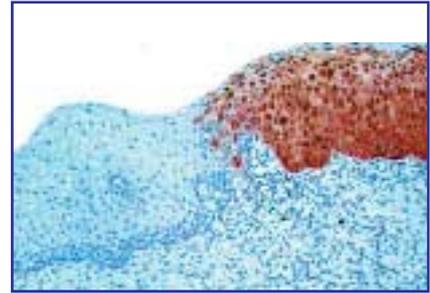


Abbildung 3: p16-Nachweis am histologischen Präparat. Braun: dysplastische, p16-positive Plattenepithelien. Beachte die streng lokalisierte Dysplasie. Benchmark-II-Immunstainer

keine klinische Relevanz, da die Immunantwort über Jahre persistiert und man somit eine gegenwärtige von einer abgelaufenen Infektion nicht unterscheiden kann.

Somit beruht die akkurate Diagnose einer HPV-Infektion auf dem Nachweis der Elemente des Erbmaterials der HP-Viren, der viralen Nukleinsäuren (4). Entscheidend für den Nachweis sind eine selektive Vermehrung und/oder ein entsprechend empfindliches und spezifisches Nachweissystem. Nachfolgend sind gängige Systeme kurz vorgestellt.

In-situ-Hybridisierung mittels Gensonden

Das Erbmateriale der Viren, die HPV-DNA, kann sowohl in zytologischen Präparaten als auch in Biopsien mit der In-situ-Hybridisierung nachgewiesen werden. Man verwendet markierte Sonden, die sich bei Anwesenheit viraler DNA direkt binden. Die Methode weist eine hohe Spezifität, aber eine geringere Sensitivität auf. Der Nachteil ist der relativ hohe Preis der Gensonden. Der direkte Nachweis am Zell- und Gewebematerial ist für morphologisch Arbeitende sehr vorteilhaft (vgl. Abbildung 5).

Gruppennachweis Low-risk- und High-risk-HPV mit Hybrid Capture II

Bereits jahrelang eingesetzt wird und unter Praxisbedingungen bewährt hat sich der Hybrid Capture® II (Digene Corp. USA). Es handelt sich um eine nichtradionaktive Nachweismethode von HPV-DNA mit markierten RNA-Proben. Zunächst erfolgt die Aufspaltung der doppelsträngigen DNA, danach die Zugabe einer Mischung von viralen RNA-Sonden. Eine Bindung nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip erfolgt nur, wenn entsprechende

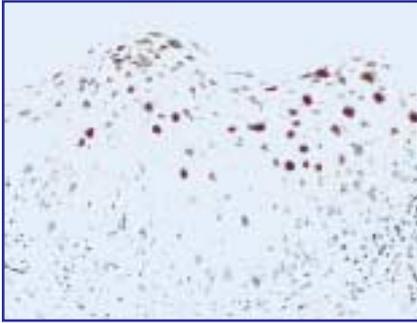


Abbildung 5: In-situ-Hybridisierung High-risk-HPV am histologischen Schnitt. Braun: Nachweis von episomaler High-risk-HP-Virus-DNA in dysplastischen Plattenepithelien. Benchmark-II-Immunstainer

komplementäre HPV-DNA-Sequenzen vorhanden sind. Schliesslich werden die vorhandenen DNA-RNA-Hybride in einer Immunreaktion nachgewiesen. Mit einem lichtaussendenden Substrat wird letztlich die Lichtaussendung gemessen. Dieser Test erkennt 13 High-risk-HPV-Typen (Typen 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68) und 5 Low-risk-HPV-Typen (Typen 6, 11, 42, 43, 44), erlaubt aber keine Identifikation von spezifischen HPV-Genotypen. Er hat sich als robuster und reproduzierbarer, relativ preisgünstiger Screeningtest erwiesen. Die kritische Grösse ist die Definition des kleinsten als positiv zu wertenden Ergebnisses, des sogenannten Cut-off. Wird dieser zu hoch definiert, resultiert eine geringere Sensitivität; ist er zu tief, resultiert eine geringere Spezifität.

PCR zur Amplifikation

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) wird eingesetzt, um einen genau definierten Teil vom Erbmaterial, also eines DNA-Stranges, zu vervielfältigen. In einer zyklischen Folge chemischer Reaktionen werden die Vorgänge bei der physiologischen DNA-Vermehrung nachgeahmt. Ein bestimmtes DNA-Fragment (wegen der geringen Konzentration primär meist nicht nachweisbar) wird so spezifisch vermehrt (amplifiziert) und kann in Folgereaktionen nachgewiesen werden. Je nach der Wahl der DNA-Region können ein spezifischer HPV-Typ oder mehrere HPV-Typen gleichzeitig nachgewiesen werden.

Die **Real-Time-quantitative-PCR** ist eine Vervielfältigungsmethode für Nukleinsäuren, die auf dem Prinzip der herkömmlichen PCR beruht und zusätzlich

die Möglichkeit der Quantifizierung bietet. Die Quantifizierung wird mithilfe von Fluoreszenzmessungen während eines PCR-Zyklus (daher der Name «Real Time») durchgeführt. Dadurch kann zu jedem Zeitpunkt während der PCR die Menge des entsprechenden Produktes berechnet werden. Durch Verwendung von Standards mit bekannten Konzentrationen an Ausgangsmaterial kann die Menge in den Proben ursprünglich vorhandener Targets bestimmt werden.

Die **Reverse-Transcriptase-PCR** weist spezifische virale Boten-(Messenger)-RNA nach. Hier ist zunächst das Ablesen der RNA und die Übertragung in DNA nötig, danach der Vorgang der PCR. Man weist nicht das Gen selbst, sondern die intrazelluläre Genexpression nach und verspricht sich bessere Rückschlüsse auf die Aktivität des Gens.

Nachweisverfahren der vervielfältigten viralen DNA

Es gibt zahlreiche Nachweisverfahren der so vervielfältigten viralen DNA. Ein vielfach begangener Weg ist die Hybridisierung (Bindung nach Schlüssel-Schloss-Prinzip) mit einem oder mehreren Oligonukleotidproben auf Hybridisierungstreifen.

Sehr verbreitet ist die reverse Hybridisierung. Hiermit wird eine Hybridisierung des PCR-Produktes an Oligonukleotidproben in einem Streifentest ermöglicht. Die verschiedenen nachzuweisenden HPV-Typen sind auf dem Streifen bestimmten Lokalisationen zugeordnet. Neben Einzelinfektionen sind hiermit auch Mehrfachinfektionen gut nachweisbar. Beispiele hierfür sind der LINEAR-array-HPV-Genotyping-Test der Firma Roche und der INNO-LiPA-HPV-Genotyping-Test der Firma Innogenetics. Eine weitere Möglichkeit ist die Bestimmung der Gensequenz mit Sequenzern. Der jeweilige HPV-Typ kann dann mittels Sequenzdatenbank online gefunden werden.

DNA-Chips

Die DNA-Chip-Technologie nutzt Techniken aus der Halbleiterfertigung, um bekannte Gene auf einem fingernagelgrossen Plastik- oder Glasplättchen, dem Mikroarray, zu identifizieren und deren Aktivität zu messen.

Die einzelnen Felder des Arrays sind mit einzelsträngigen DNA-Stücken beschichtet. Durch Zugabe der mit einem Fluoreszenzfarbstoff markierten Untersuchungsproben binden diese bei gleicher Basenabfolge an die DNA im Chip. Die Position, Intensität und Wellenlänge der entstehenden Mischfarbe werden mit einer hochauflösenden Laserkamera detektiert. Ein Test nach diesem Prinzip ist zum Beispiel der Test Papillocheck®.

Zusammenfassung

Die HPV-Typisierung bietet Gynäkologen und Zytologen eine wichtige Zusatzinformation bei der Entscheidungsfindung unklarer zytologischer Befunde, je nach der angewandten Nomenklatur der Klassen Pap IIw, Pap III oder ASCUS/AGUS. Am Restmaterial aus dem Einsendegefäss der Dünnschichtzytologie einen HPV-Nachweis anzustreben, hilft entscheidend bei der richtigen Interpretation des Befundes. Es handelt sich um eine sinnvolle Kombination einer Methode mit hoher Spezifität (Zytologie) und einer weiteren Methode mit hoher Sensitivität (5).

Zukünftig wird es wahrscheinlich zwei verschiedene Szenarien in der HPV-Diagnostik geben:

Erstens wird es die etablierten Systeme mit einer möglichst sinnvollen Kombination der Vorsorgezytologie (und der bekannten geringen Sensitivität, aber hohen Spezifität) und einem robusten, klinisch sensitiven HPV-Test geben. Im Brennpunkt stehen hier vor allem die zytologisch fraglichen Befunde, also die «Triage» bei unklarer Zytologie (6). Entscheidend ist hier nicht die möglichst hohe analytische Sensitivität, sondern ein klinisch relevantes Cut-off, denn nicht jedes nachweisbare HP-Virus besitzt auch automatisch eine Relevanz. Ohne begleitendes zelluläres Korrelat einer Dysplasie kann dies zu einer unnötigen Verunsicherung der Patientin führen und aus einer gesunden Frau eine Patientin machen (7). Man sollte sich auch immer bewusst sein, dass die Entstehung einer höhergradigen Dysplasie Jahre dauert.

Zweitens wird nach Einführung der Impfung ein Test mit möglichst hoher analytischer Sensitivität zum Nachweis aller relevanten HPV-Typen als Instrument des Monitorings vor und nach der HPV-Imp-

fung benötigt. Vor einer erwogenen Impfung Erwachsener wird hier die Impfindikation abhängig vom sicheren Ausschluss einer bereits bestehenden Infektion mit dem entsprechenden HPV-Typ gestellt, nach der Impfung die Frage eventueller Infektionen mit anderen High-risk-HP-Viren.

Kinder- und Jugendärzte, Allgemeinärzte, Gynäkologen, Zytologen und Molekulardiagnostiker sind gemeinsam gefordert, um die Vision von George Papanicolaou, den Gebärmutterhalskrebs zu bekämpfen, nunmehr mit neuen Methoden und einem kausalen Ansatz zu erfüllen. ■



Prof. Dr. med. Thomas Friedrich
(Korrespondenzadresse)
Hadlaubstrasse 48
8006 Zürich
E-Mail: red-wine@bluewin.ch

und



Prof. Dr. med. Jürg Kunz
Chefarzt Frauenklinik
Spital Zollikerberg
Trichtenhauserstrasse 20
8125 Zollikerberg

Quellen:

1. EKIF-Entscheid 2007: www.ekif.ch/fr/downloads/Com_presse_EKIF_18062007finalDE.pdf
2. Heinzl, S.: Dünnschichtzytologie (liquid-based cytology) – Ende der Diskussion? Schweizer Ärztezeitung 2006; 87: 17.
3. ZHU J., Norman I., Elfgrén K., Gaberi V. et al.: A comparison of liquid-based cytology and Pap smear as a screening method for cervical cancer. *Oncol Rep.* 2007; 18: 157–60.
4. Dehn, D. et al.: Human papillomavirus testing and molecular markers of cervical dysplasia and carcinoma. *Cancer* 2007; 111 (1): 1–14.
5. Ko V. et al.: Testing for HPV as an objective measure for quality assurance in gynecologic cytology: Positive rates in equivocal and abnormal specimens and comparison with ASCUS to SIL ratio. *Cancer* 2007; 111 (2): 67–73.
6. Ikenberg, H., Börsch, C.: Präventionskonzepte beim Zervixkarzinom. Neue Optionen ergänzen Altbewährtes. *Gynäkologie und Geburtshilfe* 2006; 3: 16–22.
7. Iftner, Th.: Nutzen und Risiken des HPV-Tests für das Früherkennungsprogramm für Gebärmutterhalskrebs. *Mikrobiologie* 2006; 16: 87–91.