

Molekularbiologischer Nachweis und Typisierung humaner Papillomaviren in der gynäkologischen Krebsvorsorge

B.-C. Padberg^a, C. Rodrigues^b, D. Zimmermann^c

Ein Ansatz, die Sensitivität der zytologischen Krebsvorsorgeuntersuchung weiter zu steigern, ist der Nachweis sogenannter Hoch-Risiko-Typen humaner Papillomaviren.

Einleitung

Infektionen durch humane Papillomaviren (HPV) manifestieren sich im ano-genitalen Bereich in Form kondylomatöser, dysplastischer und neoplastischer Läsionen. Epidemiologische sowie molekulare Studien haben gezeigt, dass eine dauerhafte Infektion mit sogenannten Hoch-Risiko-HPV-Typen massgeblich an der Entstehung des Zervixkarzinoms beteiligt ist [1–3], während Niedrig-Risiko-Varianten lediglich zu reversiblen epithelialen Läsionen führen (Abb. 1). Das Zervixkarzinom ist das häufigste Genitalkarzinom weltweit. Ein deutlicher Rückgang zeigte sich vor allem in Europa im Verlaufe der letzten 40 Jahre [4, 5]. Die Entnahme eines Zellabstrichs von der Portio beziehungsweise Cervix uteri – in Kombination mit der Kolposkopie – ist zurzeit die beste Methode, um Vor- oder Frühstadien des Zervixkarzinoms (zervikale intraepitheliale Neoplasien [CIN] = squamöse intraepitheliale Läsionen [SIL]) zu erfassen. Ein Ansatz, die Sensi-

vität des Krebsabstrichs weiter zu erhöhen, ist der Nachweis von Hoch-Risiko-HPV-Typen.

Zytologie kombiniert mit molekularbiologischer HPV-Diagnostik

Die im Rahmen gynäkologischer (Krebsvorsorge-)Untersuchungen gestellte Diagnose HPV-assoziiierter Epithelveränderungen des subklinischen bzw. klinisch-manifesten Stadiums der Infektion stützt sich derzeit auf den zytologischen Befund. Die Bestimmung des HPV-Typs ermöglicht jedoch eine über den morphologischen Befund hinausgehende Beurteilung des onkogenen Potentials (bekannte Hoch-Risiko-HPV-Typen: 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 55, 56, 58, 59, 66, 68, 73, MM4 und MM7 sowie Niedrig-Risiko-HPV-Typen: 6, 11, 40, 42, 53, 54, 57 und MM8). Daher wird immer häufiger verlangt, dass zusätzlich zum zytologischen Nachweis HPV-assoziiierter Epi-

^a FIAC, Abteilung Zytologie
^b CFIAC, Abteilung Zytologie
^c Labor für Molekularbiologie, Institut für Klinische Pathologie, Departement Pathologie, Universitätsspital Zürich

Korrespondenz:
 Dr. med. Barbara-Christina Padberg
 Departement Pathologie
 der Universität
 Abteilung Zytologie
 Universitätsspital
 Schmelzbergstrasse 12
 CH-8091 Zürich

barbara.padberg@pty.usz.ch

Abbildung 1. Nach neueren molekularen Studien stellt eine persistierende Infektion mit Hoch-Risiko-HPV-Typen den Hauptrisikofaktor für die Entstehung des Zervixkarzinoms dar, während Niedrig-Risiko-HPV-Varianten lediglich zu reversiblen epithelialen Läsionen führen.

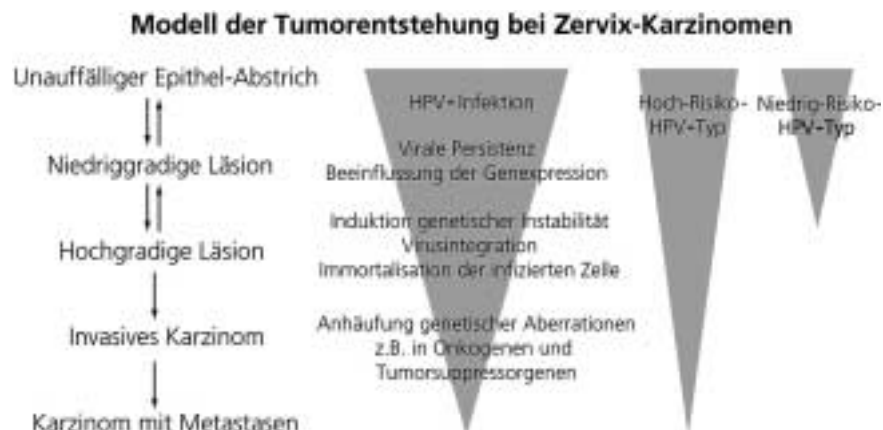
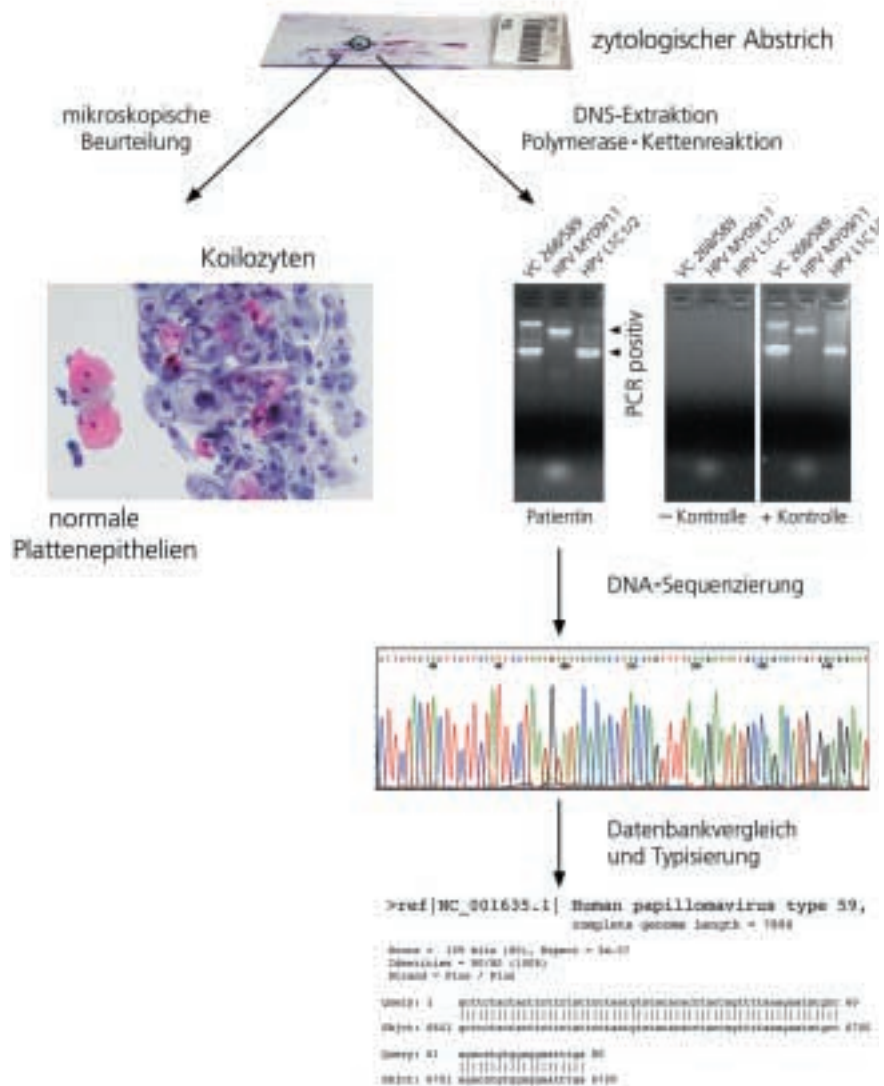


Abbildung 2.

Im Rahmen der gynäkologischen Vorsorgeuntersuchung werden Zellproben entnommen, auf einem Objektträger ausgestrichen und gefärbt (konventioneller zytologischer Abstrich). Am Mikroskop wird das Präparat sorgfältig auf verdächtige Zellen einer plattenepithelialen Dysplasie/Neoplasie untergesucht (gescreent). Bei zytologischen Hinweisen auf eine Infektion mit humanen Papilloma-Viren (Nachweis sogenannter Koilozyten) wird mit molekularbiologischen Techniken (Polymerase-Kettenreaktion, Sequenzierung) abgeklärt, ob im entsprechenden Abstrichmaterial Virus-DNA vorhanden ist und um welche(n) HPV-Typen es sich handelt. Im vorliegenden Beispiel wurde der HPV-Typ 59 identifiziert.

Zytologische und molekularpathologische Untersuchungen



thelveränderungen eine molekularbiologisch-virologische Untersuchung hinzugefügt wird (kombinierter HPV-Zytologie-Test). Am Departement Pathologie (Labor für Molekularbiologie) des Universitätsspitals Zürich wurden die HPV-Detektion und -Typisierung Mitte des Jahres 2000 stark erweitert (Abb. 2). Der Nachweis wird mittels zweier unabhängiger Polymerase-Kettenreaktionen (PCR) geführt. Diese zwei PCR-Analysen erfassen alle bisher bekannten HPV-Typen. Ebenfalls etabliert wurde die Typisierung der Papilloma-Viren mittels Sequenz-Analyse und Datenbankvergleichen via Internet. Sie lässt eine genaue Charakterisierung des HPV-Typs nicht nur bei Einzel-, sondern auch bei Mehrfach- bzw. Mischinfektionen zu. Die beiden PCR-Analysen erlauben auch die Detektion neuer oder seltener Virus-Varianten. Vermutlich wird der Anteil seltener genitaler HPV-Typen noch unterschätzt, da sie von kommerziellen Tests mit nur eingeschränktem HPV-

Sondenspektrum unzureichend erfasst werden; während ein hohes onkogenes Potential einiger dieser Virustypen bekannt ist, ist die Onkogenität anderer Virustypen dieser Gruppe bislang noch nicht zuverlässig charakterisiert.

Problemstellung und aktuelle Kontroversen

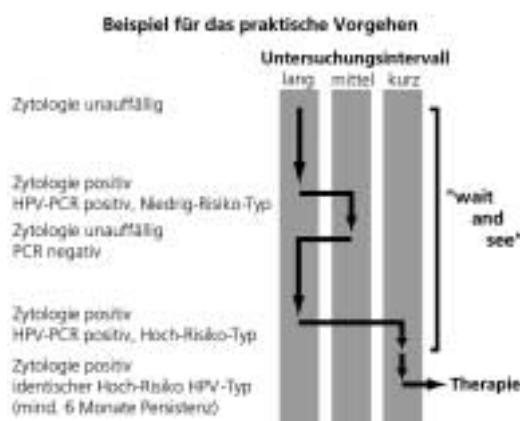
Persistenz beziehungsweise Verschwinden eines Hoch-Risiko-HPV-Typs ist von erheblicher prognostischer Bedeutung für den weiteren Verlauf einer zervikalen dysplastischen Läsion. Der routinemässige HPV-Nachweis, verbunden mit einer Typisierung, wird deshalb zurzeit für eine weitere Differenzierung des therapeutischen Vorgehens bei CIN 1-2 (leichter bis mässiggradiger Dysplasie) [6] und als Kontrolluntersuchung nach erfolgter chirurgischer Therapie [7] diskutiert. In unserem Vorsorge-

system (Deutschland, Österreich, Schweiz [Arbeitsgruppe «Guideline Zervixabstrich» der Schweizerischen Gesellschaft für Geburtshilfe und Gynäkologie [4]) wird der Einsatz der HPV-Diagnostik wegen der Kosten (Stand Anfang 2002: Inklusive ärztlicher Leistung Fr. 217.80 für den HPV-Nachweis und Fr. 103.95 für die Typisierung bei positivem PCR-Resultat) und der noch kontrovers diskutierten Relevanz derzeit im Rahmen kontrollierter Studien empfohlen. Wenngleich der Anteil HPV-positiver Frauen mit oder auch ohne CIN sowie auch die Rate der Spontanheilungen durch Virus-Eliminierung (HPV-Clearance) innerhalb von Monaten relativ hoch ist [8], liegt der Nutzen der stringenten molekularbiologischen Untersuchung in der exakten Unterscheidung zwischen individuellen Typen einer Niedrig- und Hoch-Risiko-HPV-Infektion. Einerseits ist bei Patientinnen mit Niedrig-Risiko-HPV-Infektionen eine Entwicklung präkanzeröser CIN-3-Läsionen nicht zu erwarten [2, 8, 9], andererseits deutet eine persistierende Hoch-Risiko-HPV-Infektion **bei gleichbleibendem Subtyp** auf eine Virusintegration in das Wirtsgenom hin. Die daraus resultierende konstitutive Expression der viralen Proteine E6 und E7 erhöhen das onkogene Potential der infizierten Plattenepithelzellen. Damit ist die Überwachung einer entsprechenden Risikopatientin mit möglicher Entwicklung einer hochgradigen CIN beziehungsweise einer Progression zum

invasiven Karzinom das Hauptanliegen der typenspezifischen HPV-Diagnostik. In Ländern mit organisiertem Screening und gut funktionierendem Einberufungssystem (Skandinavien) ist es möglich, die Intervalle der zytologischen Untersuchung bei fehlender Hoch-Risiko-HPV-Infektion auf 5–7 Jahre zu verlängern [10]. Bei uns kann der typenspezifische HPV-Test für die Therapiewahl – im Vergleich zur wiederholten Zytologie und Kolposkopie – eine gute Methode und eine hilfreiche Entscheidungsgrundlage sein, die neben medizinischen auch ökonomische Vorteile bringt (kostensparende Vermeidung wiederholter Abstriche und Kolposkopien) [10]. Die HPV-Diagnostik, die vor allem auch bei unklaren zytologischen Befunden (ASCUS/AGUS = atypische squamöse/glanduläre zervikale Läsion unbestimmter Signifikanz) zur Diskussion steht [5, 11, 12], gewinnt durch die typenerkennende PCR-Methode eine vom In-situ-HPV-Nachweis derzeit nicht erreichbare Aussagekraft, da nur die PCR-basierte Methode den Nachweis einer persistierenden Hoch-Risiko-HPV-Infektion mit gleichbleibendem Subtyp eindeutig erbringen kann. Sollte darüberhinaus eine – vermutlich in absehbarer Zeit zu erwartende – therapeutische Impfung [13] auf den Markt kommen, würde die Wertigkeit der HPV-Typisierung weiter ansteigen [10].

Abbildung 3.

Kontrollierte Studien empfehlen sogenannte «Wait-and-see»-Perioden mit auf das zytologische und molekularbiologische Ergebnis zeitlich abgestimmten Untersuchungsintervallen: Bei allen Patientinnen mit zytologisch positiven Befunden sollte eine HPV-Diagnostik durchgeführt werden. Kontroll- und therapiebedürftig sind insbesondere die über mehr als 6 Monate persistierenden, mit Hoch-Risiko-HPV-Typen assoziierten Epithelläsionen.



Empfehlungen kontrollierter Studien

Die Empfehlung kontrollierter Untersuchungen [2, 12, 14] umfasst unter anderem die Einführung sogenannter «Wait-and-see»-Perioden (siehe Beispiel in Abb. 3): Bei allen Patientinnen mit CIN 1 oder CIN 2 und ASCUS/AGUS-Läsionen sollte eine HPV-Diagnostik durchgeführt werden; Patientinnen mit CIN 1, 2 oder auch mit ASCUS/AGUS und mit initial positiver und über 6 Monate persistierender Hoch-Risiko-HPV-Infektion mit gleichbleibendem Subtyp sollten einer Kolposkopie und gegebenenfalls einer entsprechenden Therapie zugeführt werden. Dagegen sollten zu beiden Zeitpunkten HPV-negative Patientinnen oder initial HPV-positive und nach 6 Monaten negativ getestete Patientinnen zunächst ohne weitere Therapie wieder in das normale Screening-Programm aufgenommen und mittels zytologischer / kolposkopischer Kontrolle weiterbeobachtet werden. Die Berechtigung eines derartigen Vorgehens wird derzeit auch innerhalb des eigenen Vorsorgesystems retrospektiv im Rahmen der bereits am USZ durchgeführten HPV-Typisierungen überprüft.

Quintessenz

- Die Entnahme eines Zellabstrichs von der Portio beziehungsweise der Cervix uteri ist – in Kombination mit der Kolposkopie – zurzeit die beste Methode, um Vor- oder Frühstadien des Zervixkarzinoms zu erfassen.
- Molekularbiologische Ansätze im Rahmen der Typisierung humaner Papilloma-Viren (HPV) erlauben, die Sensitivität des Krebsabstriches zu erhöhen (kombinierter Zytologie/HPV-Test).

Angaben zur Probeneinsendung

Die HPV-Untersuchung kann sowohl an zytologischem (konventionelle Ausstriche oder/und Flüssig-Methode) als auch an bioptischem Untersuchungsmaterial (Frisch- oder formalinfixiertes Gewebe) vorgenommen werden. Wegen

der hohen Sensitivität der Methode besteht ein nicht zu vernachlässigendes Kontaminationsrisiko; es ist daher streng darauf zu achten, dass zytologische Abstriche verschiedener Patientinnen getrennt eingesandt und verarbeitet werden.

Literatur

- 1 Zur Hausen H. Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92:690-8.
- 2 Nobbenhuis MAE, Walboomers JMM, Helmerhorst TJM, Rozendaal L, Rimmik AJ, Risse EKJ, et al. Relation of human papillomavirus status to cervical lesions and consequences for cervical-cancer screening: a prospective study. *Lancet* 1999; 354:20-5.
- 3 Stoler MH. Human Papillomavirus and cervical neoplasia: a model for carcinogenesis. *Int J Gyn Path* 2000; 19:16-28.
- 4 Heinzl S, Almendral A, Hagmann PD, Obwegeser J, Steiner R, Szalmay G, Wight E. Guideline zum Vorgehen bei suspektem und positivem zytologischen Abstrich der Cervix uteri. Arbeitsgruppe «Guideline Zervixabstrich». © by SGGG/Version 1.9/15.09.2001.
- 5 Kjellberg L, Wadell G, Bergmann F, Isaksson M, Ångström T, Dillner J. Regular disappearance of the human papillomavirus genome after conization of cervical dysplasia by carbon dioxide laser. *Am J Obstet Gynecol* 2000;183:1238-42.
- 6 Franco EL, Villa LL, Sobrinho JP, Prado JM, Rousseau MC, Desy M, Rohan TE. Epidemiology of acquisition and clearance of cervical human papillomavirus infection in women from high-risk area for cervical cancer. *J Infect Dis* 1999;180: 1415-23.
- 7 Ledger WJ, Jeremias J, Witkin SS. Testing for high-risk human papillomavirus types will become a standard of clinical care. *Am J Obstet Gynecol* 2000;182:860-5.
- 8 Ho GY, Bierman R, Beardsley L, Chang CJ, Burk RD. Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. *N Engl J Med* 1998;338:423-8.
- 9 Zielinski GD, Snijders PJF, Rozendaal L. High-risk HPV testing in women with borderline and mild dyskaryosis; long-term follow-up data and clinical relevance. *J Pathol* 2001;195:300-6.
- 10 Breitenecker G, Birner P. HPV-Testung und Typisierung: Konkurrenz oder Ergänzung zum zytologischen Zervixkarzinom-Screening? *Verh Dtsch Ges Zyt* 2001;22:80-3.
- 11 Solomon D, Schiffman M, Tarone R. Comparison of three management strategies or patients with atypical squamous cells of undetermined significance: baseline results from a randomized trial. *J Natl Cancer Inst* 2001;93:293-9.
- 12 Manos MM, Kinney WK, Hurley LB, Sherman ME, Shieh-Ngai J, Kurman R, et al. Identifying women with cervical neoplasia using human papillomavirus DNA testing for equivocal papanicolaou results. *JAMA* 1999;281:1605-10.
- 13 Gissmann L. Papillomavirus-spezifische Impfstoffe zur Behandlung und Prävention von Zervixkarzinomen. *Verh Dtsch Ges Zyt* 2001;22: 89-94.
- 14 Nobbenhuis MAE, Helmerhorst TJM, van den Brule AJC, Rozendaal L, Voorhorst FJ, Bezemer PD, et al. Cytological regression and clearance of high-risk human papillomavirus in women with an abnormal cervical smear. *Lancet* 2001; 358:1782-3.