

Urogenitale Humane Papillomviren und Chlamydien

Epidemiologie bei Schweizer Frauen unter Anwendung neuer Nachweisverfahren

Thomas Krech^{a, b}, Pascal Cassinotti^b, Niklaus Deseö^c, Annette Biegert^d, Thomas Gesenhues^e, Franz Käppeli^b, Marinko Dobec^b

^a Labor Prof. Krech AG, Kreuzlingen, Schweiz, ^b medica, Medizinische Laboratorien Dr. F. Kaeppli, Zürich, Schweiz, ^c Frauenarzt, Praxis, Wil, Schweiz, ^d Frauenärztin, Praxis, Bischofszell, Schweiz, ^e Frauenarzt, Praxis, Konstanz, Deutschland

Quintessenz

- Die Durchseuchung gesunder Frauen mit Humanen Papillomvirus-Typen der Hochrisikogruppe (HR-HPV) liegt zwischen 8 und 12% mit einer Spitze von 15% im Alter zwischen 21 und 30 Jahren, diejenige mit *Chlamydia trachomatis* bei 2,6%.
- Der vorherrschende Hochrisiko-Genotyp (HR-HPV) bei gesunden Frauen in der Schweiz ist 16, gefolgt von 31, 45, 51, 52, 58 und 59.
- Vaginalabstriche für den Nachweis von Humanen Papillomviren (HPV) und *Chlamydia trachomatis* sind gleich gut geeignet wie Endozervikalabstriche, aber einfacher zu entnehmen.
- Die Verwendung neuartiger Abstrichtupfer (Flocked Swabs) ergibt eine deutlich höhere Ausbeute an positiven Befunden und ein besseres Testsignal in vitro als konventionelle Probenträger.
- Trocken gehaltene Tupfer liefern beim molekulardiagnostischen Nachweis von Humanen Papillomviren (HPV) und *Chlamydia trachomatis* ebenso gute Resultate wie im Flüssigmedium eingesandte Abstriche, was den Probentransport erleichtert.

Einführung

Die Erkenntnis, dass den Humanen Papillomviren eine grundlegende pathogenetische Bedeutung für die Entstehung des Zervixkarzinoms zukommt [1], verlangt nach sensitiven Hochdurchsatz-Methoden für Screening-Programme zum HPV-Nachweis aus einfach zu entnehmenden Proben. Impfprogramme gegen das Zervixkarzinom müssen sich gegen die am häufigsten verantwortlichen Genotypen richten, weshalb es wichtig ist, die in der Population vorherrschenden Typen zu kennen.


Von den über 100 verschiedenen Papillomviren verursachen etwa ein Dutzend nur benigne Warzen und werden deshalb als Low-risk-Typen (LR-HPV) bezeichnet. Unter den rund 40 High-risk-Typen (HR-HPV) ist der Genotyp 16 in allen Weltregionen am weitest häufigsten am Zervixkarzinom und seinen Vorstufen beteiligt.

Aufsteigende urogenitale Chlamydien-Infektionen bei Frauen sind verbunden mit Endometritis, Entzündungen des kleinen Beckens und tubarer Sterilität [2]. Hochsensitive Nachweismethoden an einfach zu entnehmenden Proben fördern hier die Akzeptanz für Screening, Diagnostik und Eradikationstherapie.

Wir berichten über 2 Studien unserer Institute, die Aufschluss über das Vorkommen der HPV-Genotypen unter Frauen in der Schweiz geben. Zudem haben wir neu-

artige Abstrichtupfer für den Nachweis von Chlamydien und Humanen Papillomviren an endozervikalen und vaginalen Proben gesunder Frauen getestet.

Epidemiologie

Wir untersuchten in zwei voneinander unabhängigen Studien das Vorkommen von Humanen Hochrisiko-Papillomviren an über 1000 (Studie A 680 und Studie B 494) Endozervikalabstrichen von Frauen, die sich beim Arzt zur Vorsorgeuntersuchung meldeten. Die teilnehmenden Ärzte und Ärztinnen stammten überwiegend aus Zürich und Umgebung (Studie A) [3] sowie der Ostschweiz und Konstanz (Deutschland) (Studie B) [4]. Bei insgesamt 125 Proben (55/680 und 70/494) konnten HR-HPV nachgewiesen werden. Dies ergibt eine Durchseuchungsrate von 8,1% (Studie A) bzw. 14% (Studie B). Die höhere Durchseuchungsrate von 14% kann durch die Verwendung neuartiger Abstrichtupfer erklärt werden. Wir verglichen in dieser Studie konventionelle Dacron-Abstrichtupfer mit den neuartigen «Flocked Swabs». Bei diesen Tupfern wird der Schaft zur Bildung des kolbenförmigen Probenträgers nicht mit einem kilometerlangen Faden umwickelt, sondern der Probenträger besteht aus einem Kunststoffkolben, auf den kurze Nylonhärchen aufgebracht sind, so dass ein Flies-artiges Material entsteht. Der Vorteil dieses Probenträgers liegt darin, dass er im Labor mehr Probenmaterial wieder freigibt als ein herkömmlicher Abstrichtupfer. Dadurch liefern mit «Flocked Swabs» entnommene Proben häufiger positive Resultate als mit herkömmlichen Tupfern entnommene Abstriche, wie wir auch in unserer Studie zeigen konnten (Abb. 1 ). Um Diskrepanzen aufgrund unterschiedlicher Probenentnahmen zu minimieren, wurden die Proben für die Studie B mit einem Doppeltupfer entnommen: In der Verschlusskappe steckte sowohl ein herkömmlicher Tupfer als auch ein «Flocked Swab», so dass mit beiden Tupfern gleichwertiges Probenmaterial in einem einzigen Vorgang gewonnen werden konnte. Unsere Vergleichsergebnisse zeigen, dass wir mit den konventionellen Tupfern in Studie B auf eine ähnliche Durchseuchung kommen (7,5%) wie in Studie A (8,1%). Andere Untersuchungen aus der Schweiz zeigen ähnliche Zahlen [5]. Die neuartigen Abstrichtupfer bringen mit 14% Positivrate eine um etwa die Hälfte höhere Ausbeute für Humane Papil-

T. Krech erklärt, dass die Herstellerfirma der «Flocked Swabs» Copanitalia einen finanziellen Beitrag an die Testkosten leistete. Die weiteren Autoren haben keine Interessenkonflikte im Zusammenhang mit diesem Beitrag.



Thomas Krech

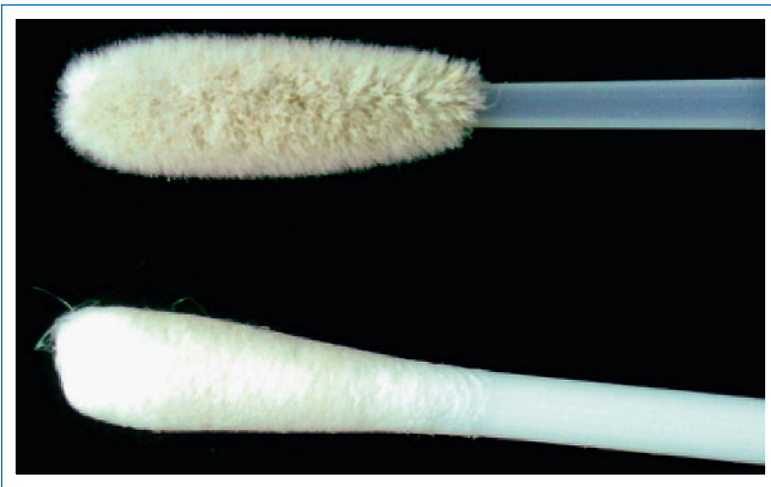


Abbildung 1

Ein «flocked Swab» (oben) im Vergleich zu einem konventionellen Dacron-Tupfer (unten). Während der konventionelle Probenträger unten lediglich durch Umwicklung des Schafts mit einem langen Faden hergestellt wird, besteht der neuartige Probenträger oben aus feinen, kurzen Härchen, die auf einem kolbenartig verdickten Schaftende sitzen. Aus diesem flauschigen Abstrichtupfer kann bedeutend mehr Probenmaterial wieder herausgespült werden als aus dem konventionellen Tupfer, weshalb in der PCR eine wesentlich höhere Nachweisrate erzielt wird.

lommviren als konventionelle Tupfer und im Mittel ein deutlich höheres Testsignal (141 gegenüber 70 Signaleinheiten). Eine hohe Testsensitivität ist bei der Untersuchung gesunder Frauen wichtig, da lediglich eine Besiedlung und keine manifeste Erkrankung vorliegt, welche in der Regel mit einem niedrigen Virusgehalt einhergeht.

Die Durchseuchungsrate mit HR-HPV ist altersabhängig. Bei unter 20-Jährigen beträgt sie in der deutschsprachigen Schweiz 7,5% und erreicht eine Spitze von 15,1% bei den 21–30-Jährigen, um dann mit zunehmendem Alter abzufallen bis auf 1,4% bei den über 60-Jährigen. Bei der überwiegenden Zahl der Fälle handelt es sich um eine transiente Besiedlung, und die Viren lassen sich nach 6–12 Monaten nicht mehr nachweisen. Nur bei persistierender Infektion kann es nach Jahren zum Zervixkarzinom kommen.

Der Genotyp 16 wurde in beiden Studien am häufigsten gefunden, nämlich bei 12% aller Positiven, gefolgt vom Genotyp 31 mit 9,4%. In absteigender Reihenfolge wurden folgende weitere kanzerogene Genotypen nachgewiesen: 52, 51, 56, 45, 58, 59, 18, 33, 56, 68, 73, 82. Typ 31 wird zwar bei Gesunden und Patientinnen mit präkanzerösen Vorstufen häufiger gefunden als Typ 18. Dieser kommt aber beim invasiven Karzinom häufiger vor. Der Grund scheint darin zu liegen, dass Typ 18 ein höheres onkogenes Potential hat als Typ 31 [6]. In der überwiegenden Zahl der Fälle werden in der Probe mehrere HR-HPV-Typen gleichzeitig nachgewiesen.

Weil die Besiedlung mit einem HR-HPV-Typ zwar nicht mit einem Karzinom oder Krebsvorstufen gleichzusetzen ist, wohl aber die Voraussetzung für die Entstehung des Zervixkarzinoms ist, kommt dem HPV-Nachweis als Suchtest gerade in Schwellenländern, wo wenige Frauen Zugang zur Krebsvorsorge haben, eine grosse Bedeutung zu [7]. Hier besteht die Möglichkeit der Proben-Selbstentnahme, weil Vaginalabstriche zum Nachweis

von Humanen Papillomviren und auch Chlamydien mindestens ebenso sensitive Resultate liefern wie Endozervikalabstriche [8, 9]. In unserem Falle waren von den 9 HPV-positiven Endozervikalabstrichen alle auch im Vaginalabstrich positiv. Zusätzlich wurden 5 weitere vaginal entnommene Proben HPV-positiv getestet. Der Genotypvergleich zwischen endozervikal und vaginal entnommenen Proben zeigt eine weitgehende Übereinstimmung, weshalb Vaginalabstriche ausreichend repräsentativ die in der Endozervix replizierenden Viren widerspiegeln.

Infektionen mit *Chlamydia trachomatis* sind in Europa die Hauptursache ungewollter Kinderlosigkeit. Dem Screening und der Eradikation der Erreger mittels Antibiotika – noch bevor sie durch aufsteigende Infektion zu tubarer Sterilität führen oder auf Sexualpartner übertragen werden – kommt deswegen eine grosse Bedeutung zu [2]. Auch hier bieten die neuartigen «Flocked Swabs» Vorteile gegenüber den herkömmlichen Abstrichtupfern. In unserer Studie waren 13 von 494 Frauen positiv (2,6%), wobei es sich in 3 Fällen um eine Doppelinfektion mit HR-HPV handelte. Im direkten Vergleich wurden für *Chlamydia trachomatis* 6 aus mit «Flocked Swab» entnommenen Proben und 4 aus mit herkömmlich gewonnenen Abstrichtupfern positiv getestet. In mit «Flocked Swabs» entnommenen Proben waren die Erregerzahlen ein Vielfaches höher als aus herkömmlichen Tupfern (198000 verglichen mit 13000 DNA-Kopien pro ml). Aus Vaginalabstrichen waren 6 Proben, aus endozervikal entnommenen 5 Proben positiv. Auch für *Chlamydia trachomatis* zeigt sich demnach die Überlegenheit der neuartigen Abstrichtupfer gegenüber den konventionellen sowie die Gleichwertigkeit des Vaginalabstriches zum Endozervikalabstrich für den Erregernachweis.

Üblicherweise werden Abstriche für die Molekulardiagnostik im Flüssig-Transportmedium ins Labor gesandt.

Werden sich infolge der Impfung mit HPV-Typ 16 und 18 andere HPV-Typen häufen?

Dies birgt die Gefahr des Auslaufens, wenn das Röhrchen schlecht zugeschraubt ist oder auf dem Transport beschädigt wird. In Studie B gelangten deswegen trocken im Röhrchen eingesandte Abstrichproben zur Untersuchung. Mit diesen Proben ergab sich eine ähnliche Durchseuchung wie mit den im Flüssigmedium eingesandten Proben der Studie A. Diese und andere Studien belegen, dass trocken eingesandte Tupfer gut für den Nachweis von Humanen Papillomviren und Chlamydien geeignet sind. Dies gilt auch für den oft gleichzeitig angeforderten Nachweis von Gonokokken [8, 9].

Ausblick

Die beiden in der Schweiz zugelassenen Impfstoffe gegen Humane Papillomviren enthalten die Typen 16 und 18, durch welche rund 70% aller Zervixkarzinome verursacht werden. Neuere Studien zeigen, dass mit der Impfung eine Kreuzprotektion gegen andere Papillomvirus-Typen induziert wird [10]. Somit ist zu erwarten,

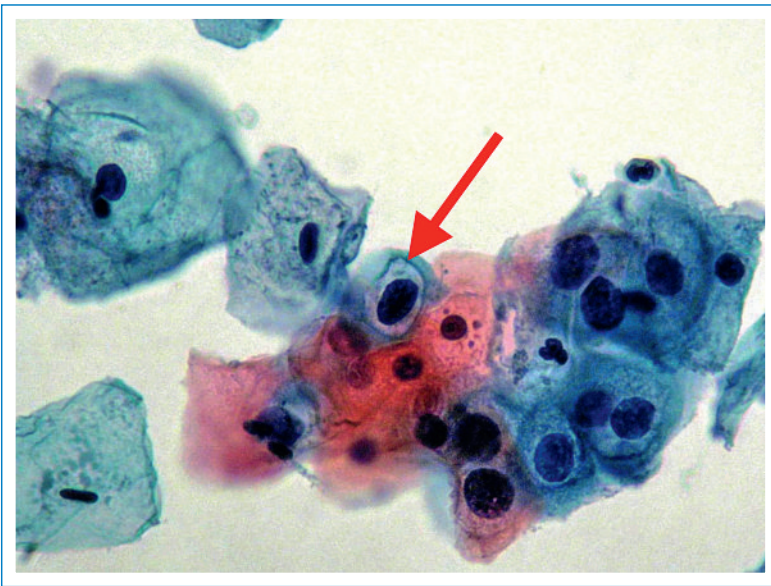


Abbildung 2

Papanicolaou-Färbung: niedriggradige squamöse intraepitheliale Läsion in Zervixabstrich bei HPV-Infekt (LSIL nach Bethesda-System). Zu sehen sind oberflächliche Plattenepithelien mit Kernvergrösserungen und Hyperchromasie. Der Pfeil zeigt auf einen Koilozyten mit vergrössertem, hyperchromatischem Kern und perinukleärem, scharf begrenztem hellem Hof. Diese Veränderungen können als durch das Virus hervorgerufener zytopathischer Effekt interpretiert werden. Der PCR-Nachweis ist sensitiver, weil nicht jeder HPV-Infekt im PAP-Abstrich sichtbare zelluläre Veränderungen bewirkt und Virusbestandteile (DNA-Fragmente) von lediglich 100–240 Kopien/ml erfasst werden. Die Abbildung wurde in verdankenswerter Weise zur Verfügung gestellt von Dr. med. F. Bannwart, Leiter Institut für klinische Pathologie, medica, Medizinische Laboratorien Dr. F. Käppeli AG.

dass bei konsequenter Durchimpfung aller Mädchen deutlich mehr als 70% der Zervixkarzinome vermieden werden können. Offen ist die Frage, ob infolge der Impfung HPV-Typen häufiger werden, gegen die die Impfung allenfalls nicht schützt. Hier ist eine Überwachung der Situation mit Screening-Programmen notwendig, um eine solche Entwicklung frühzeitig zu erkennen. Das hier angeführte Hochdurchsatz-Verfahren mit gleichzeitiger Genotypisierung sowie die vereinfachte Probenentnahme unter Verwendung der neuartigen Abstrichtupfer eröffnen die Möglichkeiten hierzu.

Dies gilt auch für den Nachweis von *Chlamydia trachomatis*. Die durch die Infektion bedingten Komplikationen mit Infertilitätsfolge bei der Frau und Epididymitiden beim Mann haben nicht unerhebliche individuelle und volkswirtschaftliche Folgen. Die Zahl der Infektionen durch *Chlamydia trachomatis* nimmt

zu und zeigt auch in der Schweiz in den letzten 6 Jahren eine Verdoppelung [11]. Die Bekämpfung der Epidemie setzt bei der Erkennung von asymptomatischen Trägerinnen und Trägern an, die mit den hier angeführten molekulardiagnostischen Nachweisverfahren unter Anwendung der neuartigen Abstrichtupfer («Flocked Swabs») einfach und sicher erkannt werden können.

Der HPV-Nachweis mit gleichzeitiger Typisierung wird in der Diagnostik seinen festen Platz als Ergänzung zytologischer Verfahren finden. Der molekulardiagnostische Nachweis lässt sich direkt aus Flüssig-Zytologietransportmedien (ThinPrep®) durchführen und trägt zu einem erheblichen Informationsgewinn in der Risikoeinschätzung dysplastischer Veränderungen bei. Ein negativer HPV-Befund schliesst bei der Patientin zudem die Entwicklung eines Zervixkarzinoms in den nächsten 5 bis 10 Jahren mit hoher Wahrscheinlichkeit aus, denn es dauert in der Regel mehr als 10 Jahre von der HPV-Infektion bis zum Zervixkarzinom [12].

Verdankung

Herrn Dr. med. Fridolin Bannwart, Abteilungsleiter klinische Pathologie, medica, Medizinische Laboratorien Dr. F. Käppeli, sei für die Durchsicht des Manuskripts und seine kritischen Anregungen herzlich gedankt.

Korrespondenz:

Prof. Thomas Krech
Labor Prof. Krech AG
Konstanzerstrasse 31a
CH-8280 Kreuzlingen
thomas.krech@labor.ch

Empfohlene Literatur

- Zur Hausen H. Papillomaviruses in the causation of human cancers – a brief historical account. *Virology*. 2009;384(2):260–5.
- Dobec M, Bannwart F, Kaeppli F, Cassinotti P. Automation of the linear array HPV genotyping test and its application for routine typing of human papillomaviruses in cervical specimens of women without cytological abnormalities in Switzerland. *J Clin Virol*. 2009;45:23–7.
- Krech T, Castriciano S, Jang D, Smieja M, Enders G, Chernesky M. Detection of high risk HPV and *Chlamydia trachomatis* in vaginal and cervical samples collected with flocked nylon and wrapped rayon dual swabs transported in dry tubes. *J Virol Meth*. 2009; doi:10.1016/j.jviromet.2009.08.011

Die vollständige nummerierte Literaturliste finden Sie unter www.medicalforum.ch

Urogenitale Humane Papillomviren und Chlamydien: Epidemiologie bei Schweizer-Frauen unter Anwendung neuer Nachweisverfahren / Papillomavirus humains et chlamydies urogénitaux: Epidémiologie chez les femmes suisses en recourant à de nouvelles méthodes de dépistage

Weiterführende Literatur (Online-Version) / Références complémentaires (online version)

- 1 Zur Hausen H. Papillomaviruses in the causation of human cancers – ab brief historical account. *Virology*. 2009;384(2):260–5.
- 2 Waters Jo. European countries are urged to develop national policies to control chlamydia. *BMJ*. 2009;339:b2687.
- 3 Dobec M, Bannwart F, Kaeppli F, Cassinotti P. Automation of the linear array HPV genotyping test and its application for routine typing of human papillomaviruses in cervical specimens of women without cytological abnormalities in Switzerland. *J Clin Virol*. 2009;45:23–7.
- 4 Krech T, Castriciano S, Jang D, Smieja M, Enders G, Chernesky M. Detection of high risk HPV and Chlamydia trachomatis in vaginal and cervical samples collected with floccated nylon and wrapped rayon dual swabs transported in dry tubes. *J Virol Meth*. 2009; doi:10.1016/j.jviromet.2009.08.011
- 5 Bundesamt für Gesundheitswesen [Homepage] Bern: Empfehlungen zur Impfung gegen humane Papillomaviren (HPV). Available from: www.bag.admin.ch/themen/medizin
- 6 Clifford GM, Rana RK, Franceschi S, Smith JS, Gough G, Pimenta JM. Human papillomavirus genotype distribution in low-grade cervical lesions: comparison by geographic region and with cervical cancer. *Cancer Epid Biomarkers Prevention*. 2005;14:1157–64.
- 7 Sankaranarayanan R, Bhagwan MD, Nene M, Shastri SS, Jayant K, Muwonge R, et al. HPV screening for cervical cancer in rural India. *NEJM*. 2009;360(14):1385–94.
- 8 Shah KV, Daniel RW, Tennant MK, Shah N, McKee K, Gaydos CA, et al. Diagnosis of human papillomavirus infection by dry vaginal swabs in military women. *Sex Trans Inf*. 2001;77:260–4.
- 9 Masek BJ, Arora N, Quinn N, Aumakhan B, Holden J, Hardick A, et al. Performance of three nucleic acid amplification tests for detection of Chlamydia trachomatis and Neisseria gonorrhoeae by use of self-collected vaginal swabs obtained via an internet-based screening program. *J Clin Microbiol*. 2009;47(6):1663–7.
- 10 Paavonen J, Naud P, Salmeron J, Wheeler CM, Chow SN, Apter D, et al. Efficacy of human papillomavirus (HPV)-16/18 AS04-adjuvanted vaccine against cervical infection and precancer caused by oncogenic HPV types (PATRICIA): final analysis of a double-blind, randomised study in young women. *Lancet*. 2009;374(9686):301–14.
- 11 Bundesamt für Gesundheitswesen [Homepage] Bern: Meldesystem. http://www.bag.admin.ch/k_m_meldesystem
- 12 Dillner J, Rebolj M, Birembaut P, Petry KU, Szarewski A, Munk C, et al. Long term predictive values of cytology and human papillomaviruses testing in cervical cancer screening: joint European cohort study. *BMJ*. 2008;337:a1754 doi:10.1136/bmj.a1754