Serumantikörper gegen HPV-11 bei verschiedenen gynäkologischen Patientenkollektiven

K.		Heim ^a
N.D.		Christensen ^b
R.		Höpf ^c
B.		Wartusch ^a
G.		Pinzger ^a
A.		Zeimet ^a
P.		Baumgarnter ^a
C.		Marth ^a
J.W.		Kreider ^b
O.		Dapunt ^a

^aUnivers.-Klinik f. Frauenheilk. Innsbruck (Vorst.: Prof. Dr. O. Dapunt) ^bDivision of Experimental Pathology, Pennsylvania State University, Hershey, USA (Vorst.: Prof. Dr. J. W. Kreider) ^cUnivers.-Klinik f. Dermatologie Innsbruck (Vorst.: Prof. Dr. P. Fritsch)

OA Dr. Kurt Heim, Univers.-Klinik f. Frauenheilk., Anichstraße 35, A-6020 Innsbruck

Die letzten Jahre der HPV-Forschung waren unter anderem durch die intensive Suche nach einem geeigneten serologischen Testverfahren geprägt. Aufgrund verschiedener Hindernisse gelang es bisher jedoch nicht, spezifische serologische Untersuchungen bei Patientinnen mit HPV-Infektionen durchzuführen. Eines der größten Probleme der gesamten HPV-Forschung ist immer noch, daß humane Papillomaviren (HPV) (mit einer Ausnahme: Typ 11; Kreider 1987) nicht in Zellkulturen oder Tiermodellen vermehrt bzw. hergestellt werden können, sodaß für serologische Untersuchungen kein natives authentisches Antigen verfügbar ist. Daher wurden dafür bis dato bakterienexprimierte Virusproteine (Fusionsproteine) oder synthetische Peptide verwendet. Mit ihnen ergaben sich jedoch entweder niedrige Inzidenzen oder kaum Unterschiede zwischen Normal- und Patientenkollektiven (Übersicht bei Galloway 1992). Sie repräsentieren nur unzulänglich antigene Strukturen des intakten Virus (u. a.

Fusionsproteinanteil, unvollständiges Protein, fehlende Tertiärstruktur, denaturierte, linearisierte Epitope). Virusproteine, nunmehr hergestellt in einem Bakulovirusvektor-Insektenzellsystem, ergeben hingegen authentische HPV-Proteine, Kapsidproteine formieren sich zudem zu leeren Virushüllen (virus-like-partikles [VLPs]), die die gleichen (externen) konformellen, dreidimensional intakten Epitope des natürlichen Virus imitieren und sich morphologisch und immunologisch bisher ident mit intakten Viren erwiesen haben (u. a. Christensen 1994).

Material und Methoden

In einem direkten ELISA-Test wurden Seren von 79 Patientinnen mit Kondylomen (CA = condylomata acuminata), 72 mit CIN (= cervical intraepithelial neoplasia), 49 mit Zervixkarzinomen (ICA = invasive cancer), 87 Kontrollpatientinnen (CO = controls), 63 Frauen unter der Geburt (MO = mothers) und deren Neugeborene (Nabelschnurblut) (NB = newborns)

getrennt auf IgG-, IgM- und IgA-Antikörper gegen HPV-11-L1-VLPs untersucht. Die VLPs wurden in einem Baculovirus-Insektenzell-System hergestellt (Christensen 1994). Bei CA und CIN Patientinnen wurde routine-mäßig in Abstrichen HPV-DNA bestimmt (ViraPap/Type Test, modifizierte dot blot-Hybridisierungsmethode). Zur Überprüfung der Testspezifität untersuchten wir unter anderem einen Teil der CA-, CIN- und Kontrollseren mit BPV-1- (bovine Papillomaviren), HPV-6-L1-VLPs und HPV-11-Virus (produziert im athymic nude mouse xenograft system. Kreider 1987).

Ergebnisse

Von den Kondylompatientinnen zeigten 46 % ein positives IgG-Testergebnis, die CIN-Patientinnen reagierten in 30 % und die Karzinompatientinnen in 33 % positiv mit HPV-11-VLPs, verglichen mit 12 % der Kontrollen und 16 % der Mutter (jeweils hoch signifikanter Unterschied). Nur 6 % der Seren von Kontrollpatientinnen und in der Karzinomgruppe, jedoch 67 % der Kondylompatientinnen bzw. 64% der CIN-Patientinnen zeigten eine positive Reaktivität von IgM Antikörpern. Mutter waren in 19% IgM-positiv. Weitere Positivitätsraten, Signifikanzen und die IgA-Ergebnisse sind den Abb. 1-3 zu entnehmen. Die Medianwerte für IgG und IgM waren ebenfalls hoch signifikant unterschiedlich.

Die IgG-Ergebnisse der Untersuchungen mit BPV-1-VLPs zeigten keine spezifischen Reaktionsmuster oder Korrelationen zu denen mit HPV-11-VLPs. Bei HPV-6-VLP ist eine Patientinnengruppe zu beobachten, die nur gegen diesen Typ positive Reaktion zeigten (10/84), ebenso umgekehrt bei HPV-11-VLPs (9/84). Ein Teil der Seren reagierte gegen beide (24/84). Alle mit dem HPV-11-Virus positiven Seren zeigten auch positive Reaktionen gegen 11-VLPs, es reagierten jedoch noch mehr Seren mit VLPs alleine. Zwischen den Ergebnissen mit HPV-11-Virus und HPV-6-VLP bestand keine Korrelation.

Von den Patientinnen mit aktuellem positiven Nachweis von HPV 6/11-DNA waren 46% (31/67) IgG-positiv gegen HPV-11-VLP, jedoch nur 24% (12/51) der Patientinnen mit anderen nachweisbaren HPV-Typen ($p < 0,05$). Wurden auch die ELISA-Er-

46 %

33 %

CO » $p < 0.05$ ** $p < 0.01$

Unter erstmaliger Verwendung dieses neuartigen HPV-Antigens für serologische Untersuchungen in einem ELISA bei Patientinnen mit verschiedenen genitalen HPV-assoziierten Erkrankungen wurde ein hochsignifikanter Unterschied im Vergleich zu Kontrollkollektiven gefunden. HPV-VLPs sind ein geeignetes Antigen, um im Serum von Patientinnen spezifische Antikörper nachzuweisen. Kirnbauer 1994 fand auch für HPV-16-VLPs hoch signifikante

Ergebnisse bei HPV-16-DNA positiven CIN-Patientin-nen, unterschied jedoch nicht die Isotypen.

Es besteht eine hohe Virus-, Spezies- und zumindest teilweise Typenspezifität.

Es besteht ein signifikanter Zusammenhang mit dem aktuellen HPV-DNA-Status.

Im Serum von erkrankten Patientinnen sind in einem hohen Grad Antikörper gegen konformelle Epitope des nativen Virus nachweisbar. Diese Antikörper dürften z. T. auch stark virusneutralisierende Eigenschaften besitzen (Christensen 1992) und könnten daher nicht nur diagnostisch, sondern zudem auch biologisch bedeutsam sein.

- Es eröffnen sich durch eine erstmals geeignete serologische HPV-Untersuchung wichtige Perspektiven für die Epidemiologie, die Diagnostik und die Prognosestellung der HPV-Infektion, zudem ein möglicher Indikator für den Effekt einer zukünftigen HPV-Impfung. Die spezifische Erfassung der humoralen Immunantwort könnte den HPV-Intrakutantest (Test der zellulären Immunantwort) (Höpfl 1991) ergänzen.

67 %

64 %

* p < 0.05 ** p < 0.01 *** p < 0.001

Abb. 2. Rate an IgM-positiven Seren verschiedener Patientenkollektive und Kontrollgruppen (vgl. Material und Methoden) mit HPV-11-VLPs als Antigen in einem ELISA.

15 %

10 %

10 %

CA p < 0.001

0 %

CIN

ICA

MO

NB

GO p < 0.05

p < 0.01

Abb. 3. Rate an IgA-positiven Seren verschiedener Patientenkollektive und Kontrollgruppen (vgl. Material und Methoden) mit HPV-11-VLPs als Antigen in einem ELISA.

Literatur

Christensen ND, Kreider JW, Shah KV, Rando RF: Detection of human serum antibodies that neutralize infectious human papillomavirus type 11 virions. J Gen Virol 1992; 73: 1261-1267

Christensen ND, Höpfel R, DiAngelo SL, Cladel NM, Patrick SD, Welsh PA, Budgeon LR, Reed CA, Kreider JW: Assembled baculo-virus-expressed HPV-11 LI viruslike particles are recognized by neutralizing monoclonal antibodies and induce high titers of neutralizing antibodies. J Gen Virol. 1994: in press.

Galloway DA: Serological assays for the detection of HPV antibodies. IARC Sci Publ 1992; 119: 147-161.

Höpfel R, Sandbichler M, Sepp N, Heim K, Müller-Holzner E, Wartusch B, Dapunt O, Jochmus-Kudielka I, TerMeulen J, Gissmann L, Fritsch P: Skin test for HPV type 16 proteins in cervical intraepithelial neoplasia. Lancet 1991; 337: 373-374.

Kirnbauer R, Hubbert DL, Wheeler CM, Becker TM, Lowy DR, Schiller JT: A viruslike particle enzyme-linked immunosorbent assay detects serum antibodies in a majority of women infected with human papillomavirus type 16. J Natl Cancer Inst 1994; 86: 494-499. Kreider JW, Howett MK, Leure-Dupree AE, Zaino RJ, Weber JA: Laboratory production in vivo of infectious human papillomavirus type 11. J Virol 1987; 61: 590-293.

168

Heim/Christensen/Höpfel/Wartusch/Pinzger/

Zeimet/Baumgartner/Marth/Kreider/

Dapunt

Serumantikörper gegen HPV-11 bei verschiedenen gynäkologischen Patienten-kollektiven