

Krooninen junktionaalinen stomatiitti lymfosyyttikertymineen –
diagnoosin spesifiointi immunohistokemiallisin menetelmin

Abdirisak Ahmed Haji Omar HLK

Hammaslääketieteen laitos

Helsinki 1.10.2009

Tutkielma

Abdirisak.Ahmed@helsinki.fi

Ohjaajat: Prof. Jarkko Hietanen ja EHL, HLT Jaana Hagstrom

HELSINGIN YLIOPISTO

Lääketieteellinen tiedekunta

HELSINGIN YLIOPISTO – HELSINGFORS UNIVERSITET

Tiedekunta/Osasto – Fakultet/Sektion – Faculty Lääketieteellinen tiedekunta		Laitos – Institution – Department Hammaslääketieteen laitos	
Tekijä – Författare – Author Abdirisak Ahmed Haji Omar			
Työn nimi – Arbetets titel – Title Krooninen junktionaalinen stomatiitti lymfosyyttikertymiseen – diagnoosin spesifiointi immunohistokemiallisin menetelmin			
Oppiaine – Läroämne – Subject Hammaslääketieteellinen Patologia			
Työn laji – Arbetets art – Level Tutkielma		Aika – Datum – Month and year 1.2008-1.10.2009	Sivumäärä - Sidoantal - Number of pages 1+19
Tiivistelmä – Referat – Abstract <p>Oral lichen planus (OLP) on yleisen ihotaudin lichen planuksen suun limakalvojen manifestaatio. Krooninen junktionaalinen stomatiitti (KJS) on suhteellisen tuntematon tauti, jolle on tunnusomaista epiteelinalaisen strooman lymfaattinen infiltraatio. Lymfaattinen infiltraation esiintyminen on myös OLP:n diagnostisena kriteerinä. OLP:n ja KJS:n erotusdiagnoosi on epäselvä ja taudit voivat olla jopa saman taudin eri muotoja. Värjäsimme 10 OLP- ja 10 KJS näytettä tutkiaksemme näiden mahdollisia eroja. Käytimme seuraavia markkereita CD1-a, CD3, CD4, CD5, CD8 ja CD20. Luokittelimme tulokset neliportaisen asteikon perusteella ja käytimme Fishern exact testiä tilastolliseen analyysiin. CD20 positiivisia B-lymfosyyttejä oli enemmän KJS:ssä kuin OLP:ssä, pääosin lymfaattisten follikkelirakkuloiden johdosta. CD4 positiiviset T-lymfosyytit olivat enemmistönä OLP:ssä kun verrattiin niiden suhdetta CD8 positiivisiin T-lymfosyytteihin. Erot olivat tilastollisesti merkittäviä. Tulosten perusteella OLP:n ja KJS:n lymfaattisessa infiltraatiossa on eroavaisuuksia, joskin lopullisen selvyuden saavuttamiseksi lisätutkimukset olisivat tarpeen.</p>			
Avainsanat – Nyckelord – Keywords Immunohistochemistry, lymphocytes, lichen planus			
Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited			
Muita tietoja – Övriga uppgifter – Additional information			

Sisällysluettelo

1.1 Johdanto	2
1.2 Tutkimuksen tavoitteet	2
2. Aineisto ja Menetelmät	3
2.1. Tilastollinen analyysi	3
2.2 Immunohistokemiallinen kudosvärjäys ja kirjallisuuskatsaus.....	3
3. Tulokset.....	12
4. Pohdinta	16
Lähdeviitteet	17

1.1 Johdanto

Lichen planus (LP) on yleinen ihosairaus, jota esiintyy myös suun limakalvoilla (oral lichen planus, OLP). OLP on yleisesti keski-ikäisten naisten tauti ja lapsilla se on äärimmäisen harvinainen (1). OLP:n etiologia on epäselvä, mutta sille ajatellaan olevan immunologinen tausta (2). OLP muistuttaa sekä kliinisesti, että histologisesti yliherkkyysoireita eli ns. likkenoidia reaktioita, joka voi olla hyvin vaikeasti erotettavissa OLP:stä (3). Histopatologisesti OLP näytteessä nähdään tyvisolukerroksen degeneraatiota sekä lymfosyyteistä koostuva nauhamainen tulehdussoluinfiltraatio epiteelin alla sidekudoksessa (1). Krooninen junktionaalinen stomatiitti lymfosyyttikertymineen (KJS) tarkoittaa suun limakalvolla esiintyvää OLP:n kaltaista kroonisen tulehduksen tilaa, johon kuuluu sidekudoksen lymfosyyttiinfiltraatioissa esiintyvät follikkelirakenteet itukeskuksineen tai ilman. Immunohistologisesti molemmissa KJS:n muodoissa submukoosaa on infiltroitu CD45- ja CD20 positiivisia lymfosyyttejä. (4). Tästä muutoksesta on toistaiseksi hyvin vähän julkaisuja. Ensimmäisenä KJS nimi tuli esiin 1998 Etelä-Afrikassa suupatologiain kongressissa Eversolen abstraktissa (4).

1.2 Tutkimuksen tavoitteet

Tutkimuksen tarkoitus olisi löytää mahdollisia immunologisia markkereita, joilla voisi luokitella OLP:n ja KJS:n eroja ja yhtäläisyyksiä kudostasolla. Tutkimuksen tavoitteena onkin mahdollisesti luokitella KJS omaksi tautimuodokseen. Tutkimuksen

lähtökohtana on kaksi vastakkaista hypoteettista kysymystä: ”OLP ja KJS ovat eri tauteja” tai, ”OLP ja KJS ovat saman taudin eri variantteja”.

2. Aineisto ja Menetelmät

Analysoimme 20 suun limakalvonäytettä. Näytteet saatiin patologian keskuslaboratorion näytearkistosta. Näytteet oli fiksoitu formaliiniin ja valettu parafiiniin. Kahdestakymmenestä näytteestä 10:lla oli OLP diagnoosi ja 10:lla KJS:a muistuttava löydös. KJS:n diagnoosi perustui lymfaattisten follikkeleiden kaltaisten rakenteiden esiintyminen submukoosassa sekä kliinisen informaation. Potilaiden ikää ja sukupuolta ei tunneta. Potilastietoja ei ole käsitelty. Kymmenen 3 µm paksuista leikettä leikattiin jokaisesta näytteestä.

2.1. Tilastollinen analyysi

Tilastollinen analyysi suoritettiin käyttäen Fisherin exact testiä. Alle 0,05 p-arvoa pidettiin tilastollisesti merkittävänä. Otokoko oli 10. Terveitä kontrolleja ei ollut.

2.2 Immunohistokemiallinen kudovärjäys ja kirjallisuuskatsaus

Immunohistokemiallinen värjäys (IHV) on immunologiaan perustuva menetelmä, jossa käytetään hyväksi vasta-aineen kykyä tunnistaa kudoksesta tietyt antigeenit. Tämän ominaisuuden avulla kudisleikkeestä saadaan ilmi vasta-aineeseen liitettyllä väriaineella tietyt antigeenit kudostasolla. Immunohistokemiallisessa värjäyksessä suoritetaan yleensä myös ns. vastavärjäys visualisoinnin helpottamiseksi tumia

värjävällä hematoksyliinillä. IHV vasta-aineet, jotka tuotetaan koe-eläimissä, jaotellaan polyklonaalisiin ja monoklonaalisiin. Valmistusvaiheessa antigeeni injektoidaan eläimeen subkutaanisesti, ihon alle. Polyklonaaliset vasta-aineet eristetään eläimen veressä kiertävistä lymfosyyteistä, joten käytetty B-lymfosyyttipopulaatio on hyvin heterogeeninen. (5). Monoklonaalisen menetelmän vasta-aineet kerätään pernan ja imusolmukkeiden elatusmaljalla kasvatetuista lymfosyyteistä, joten käytettävä B-lymfosyyttipopulaatio on hyvin homogeeninen luonteeltaan ja näin ollen saadut vasta-aineet ovat immunokemiallisesti tarkasteltuna identtisiä. Monoklonaalisilla vasta-aineilla onkin korkea homogeenisyys ja spesifisyys. (6,7)

Immunohistokemiallinen värjäys voidaan jakaa suoraan tai epäsuoraan menetelmään. Suora värjäys on yksivaiheinen ja siinä käytetään yhtä vasta-ainetta, johon on valmiiksi konjugoitu väriaine (kaavio 1). Epäsuora menetelmä on kaksivaiheinen. Ensimmäisessä vaiheessa primäärivasta-aine reagoi kudoksen antigeenin kanssa. Toisessa vaiheessa tähän vasta-aine-antigeeni kompleksiin liitetään sekundäärivasta-aine, johon on konjugoitu väriaine (kaavio 2). (8). Epäsuoran menetelmän jatkokehitelmiä ovat PAP-, Avidiini-biotiini- sekä Streptavidiinientsyymi-kompleksit (9). PAP-kompleksi (kaavio 3) menetelmä on kolmivaiheinen. Ensimmäisessä vaiheessa antigeenin kanssa käytetään primäärivasta-ainetta, ja tähän kompleksiin liitetään sekundäärivasta-aine toisessa vaiheessa. Kolmannessa vaiheessa sekundäärivasta-aineen kanssa reagoi antiperoksidaasi, johon on konjugoitu peroksidaasi ja lopuksi peroksidaasi-kompleksiin liitetään väriaine. Avidiini-Biotiini kompleksi (ABC) menetelmä (kaavio 4) on myös kolmivaiheinen. Ensimmäinen ja

toinen vaihe muistuttavat PAP-kompleksin protokollaa sillä erotuksella, että sekundaarivasta-aineeseen konjugoidaan biotiini. Biotiini toimii linkkinä vasta-aineen ja avidiini-biotiini-peroksidaasi-kompleksin välillä. Yhteen biotinolysoituyyn sekundaarivasta-aineeseen voidaan liittää useita peroksidaasi molekyyliä. (9). Konjugoitu streptavidini-biotiini (LSAB) menetelmä (kaavio 5) on kolmivaiheinen. LSAB-menetelmä on yhtenevä ABC-menetelmän kanssa sillä erotuksella, että biotiini toimii linkkinä streptavidini-peroksidaasi-kompleksin ja vasta-aineen välillä. Uudempina menetelminä ovat polymeerirunkoon perustuvat immunohistokemialliset menetelmät. Polymeerirunkoon perustuva IHV (kaavio 6) on kaksivaiheinen. Ensimmäisessä vaiheessa kudosanogeneeniin liitetään primäärinvasta-aine. Toisessa vaiheessa primäärinvasta-aineeseen liitetään pitkä polymeerirunko, johon on konjugoitu kymmenittäin entsyymejä sekä useita sekundäärinvasta-aineita. (10,11). ABC ja LSAB metodeilla saavutetaan suurempi herkkyys värjäyksessä verrattuna suoraan PAP-värjäykseen. Polymeerirunkoon perustuva IHV metodin herkkyys vastaa ABC ja LSAB metodien herkkyyttä. (10).

Potilaasta saatu kudoksenäyte tarvitsee monivaiheisen esikäsittelyn ennen kuin kudoksenäytteestä leikattu kudoksenleike voidaan värjätä. Immunohistokemiallisessa värjäyksessä käytetyt kudoksenleikkeet ovat yleensä formaliinifiksoituja ja parafiiniin valettuja, tosin jääleikkeitäkin käytetään. Kudoksenäytteen normaalikäsittelyssä formaliinia käytetään tuoreen kudoksen kiinnittämiseen eli fiksoimiseen (12). Kudoksenäytteen fiksoimisen jälkeen kudoksenäytteestä poistetaan vesi, eli näyte dehydroidaan, nousevan alkoholisarjan avulla. Nousevan alkoholisarjan jälkeen kudoksenäyte altistetaan ksyleenikäsittelylle, sillä parafiini ei sekoitu alkoholin kanssa.

Ksyleenikäsitteilyn jälkeen kudospäyte valetaan parafiiniin. Parafiiniin valetusta kudospäytteestä leikataan mikrotomilla 2-10µm paksuja leikkeitä, jotka voidaan immunovärijätä protokollan mukaisesti parafiininpoistokäsitteilyn sekä kudosten antigeenien herkistykseen jälkeen. Parafiininpoisto suoritetaan ksyleenin avulla. Laskevan alkoholisarjan avulla ksyleeni huuhdellaan pois ja kudospäike rehydroidaan, sillä immunovärijäys suoritetaan vesifaasissa. (13). Kudospäikeen antigeenejä herkistetään eri menetelmin esim. mikroaaltouunissa ”herkistysliuoksessa” (14). Tässä tutkimuksessa käytettiin pH 9 tris-HCL ja EDTA liuosta. Tris-EDTA puskuri sitoo Ca^{2+} -ioneja, joita vapautuu proteiinien välisten sidosten katketessa. Tämä menetelmä purkaa formaliinin ja muiden fiksaatioaineiden muodostamia ristisilloja, jolloin epäspesifinen värijäytyvyys kudospäytteessä vähenee. (15)

Tässä tutkimuksessa värjäykset suoritettiin HusLabin immunohistokemian laboratoriossa. Immunohistokemiallisessa värjäyksessä sekä näytteen esikäsitelyssä seurattiin seuraavaa protokollaa. (16)

1	Deparafaointi laskevan alkoholisarjan avulla
2	Esikäsitely mikroaaltouunissa Tris-EDTA liuoksessa (2x7 min 900 W ja 2x5 min 900W)
3	Lasien jäähdyttely ja huuhtelu PBS-liuoksessa (20 min jäähdyttely, 2x5 min PBS-pesu)
4	Immunohistokemiallinen värjäys Labvision värjäysautomaatilla 1. Kudosleikkeiden endogeenisen peroksidaasiaktiivisuuden blokkauksen vetyperoksidiliuoksella 2. Primääri-vasta-aineen inkubointi 3. Inkuboidaan polymeerirunkoon kiinnitetyt sekundaarinen vasta-aine sekä peroksidaasi. 4. DAB värjäys vasta-aineen ekspresion ilmentämiseksi 5. Hematoksyliinivärjäys 6. Huuhtelu juoksevan veden alla (10 min)
5	Dehydraatio nousevan alkoholisarjan avulla
6	Lasien peittäminen peittelykoneessa

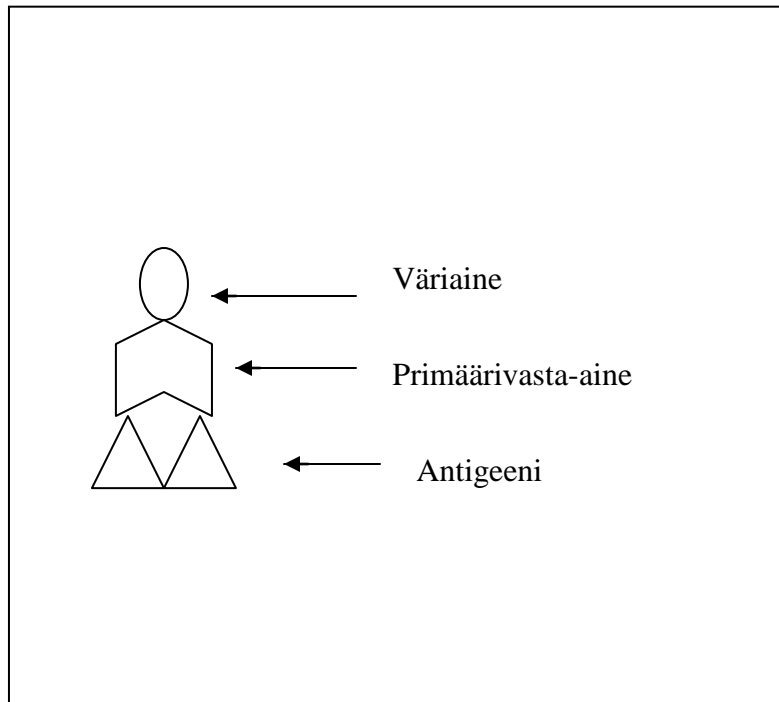
Tutkimuksessa käytetyt vasta-aineet

Kohde antigeeni	Ekspressio	vasta-aine & klooni	Laimennus & Esikäsitely	lähde
CD1-a	Dendriittisoluiissa (Langerhanssin soluissa)	L mAB mouse, MTB1	1:10 Tris-EDTA pH 9	Novocastra
CD3	T-lymfosyyteissä	L mAB mouse, PS1	1:1000 Tris-EDTA pH 9	Novocastra
CD5	T-lymfosyyteissä, joskus B- lymfosyyteissä	L mAB mouse, 4C7	1:25 Tris-EDTA pH 9	Novocastra
CD4	Auttaja T-lymfosyyteissä, jotka toimivat mikro- organismien aiheuttaman kudosvasteen aloittajina	mAB mouse, 4B12	1:150 Tris-EDTA pH 9	Novocastra
CD8	Supressori T- lymfosyyteissä, jotka tuhoavat mikro- organismien infektoimia soluja, sekä tuottavat virusvasta-aineita	L mAB mouse, 4B11	1:25 Tris-EDTA pH 9	Novocastra
CD20	B-lymfosyyteissä	mAH mouse, L26	1:1000 Tris-EDTA pH 9	Dako

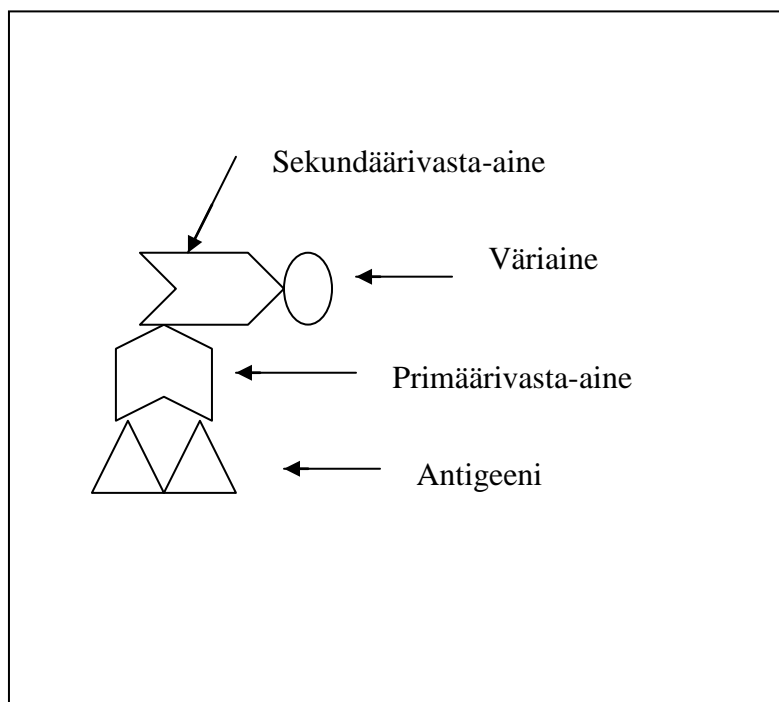
mAB = monoclonal anti-body, mAH = monoclonal anti-human

pAB = polyclonal anti-body, L = lyophilized

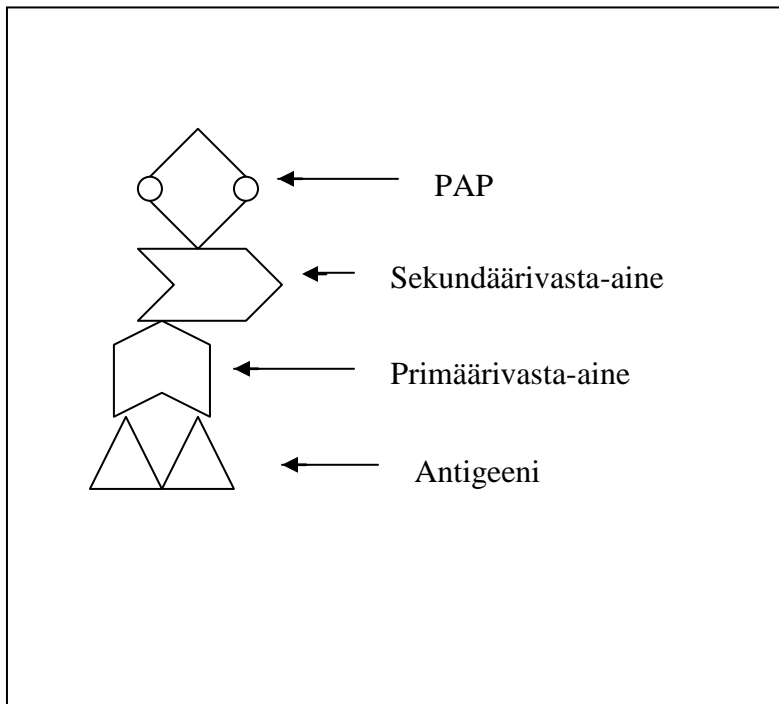
Kaavio 1



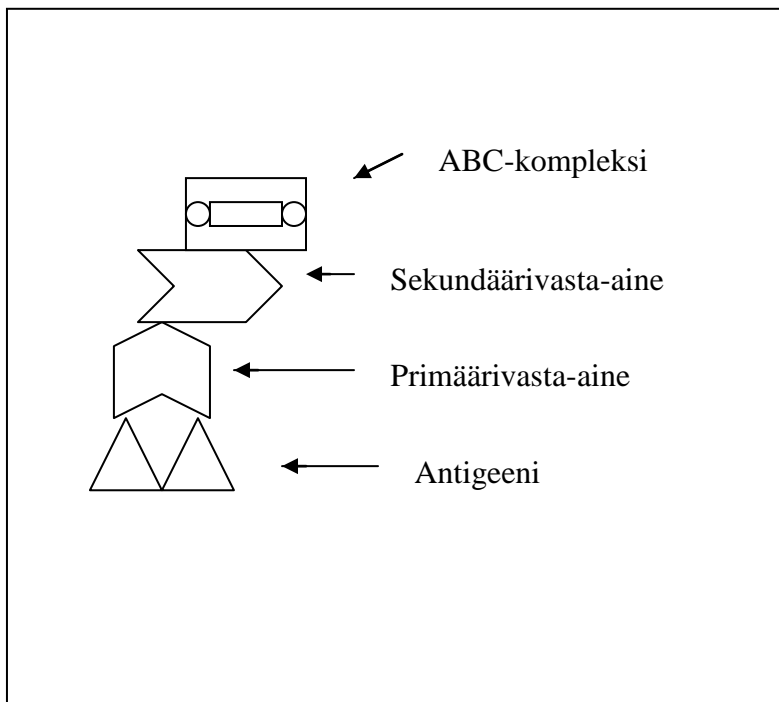
Kaavio 2



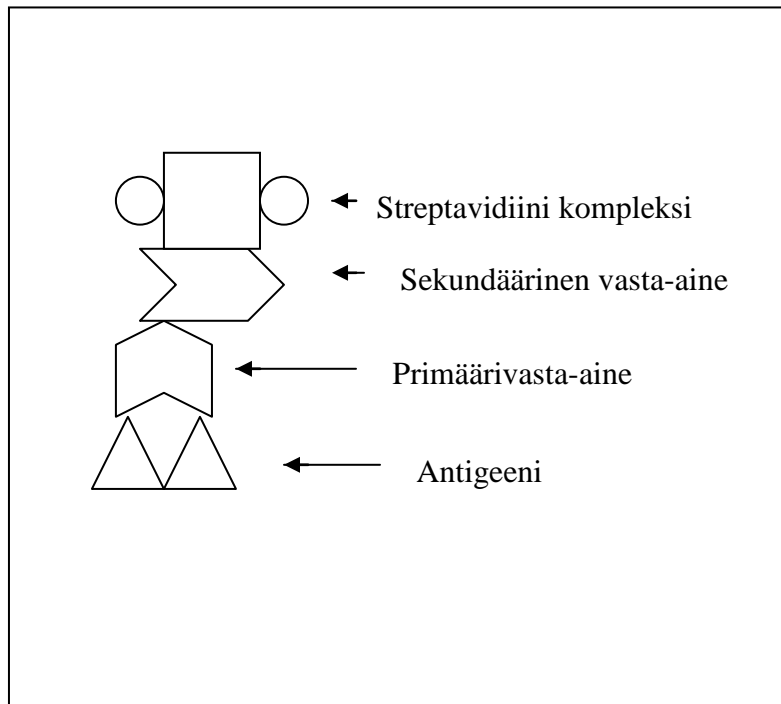
Kaavio 3



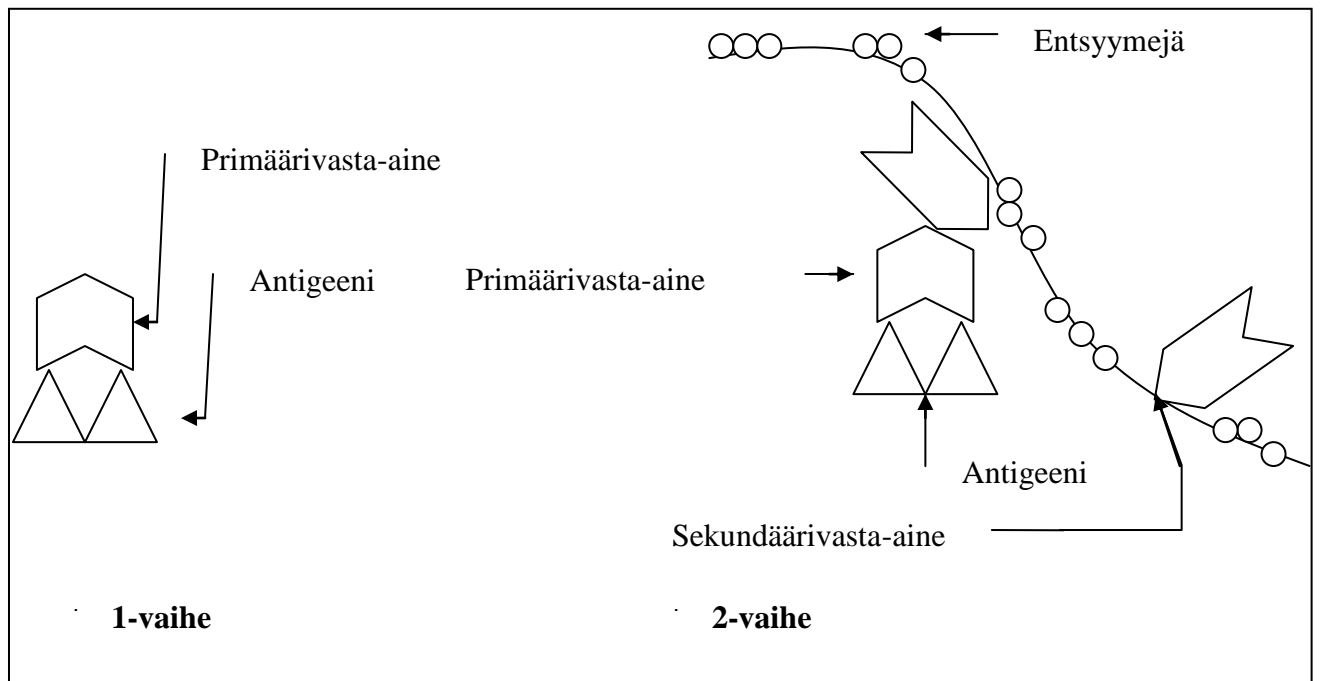
Kaavio 4



Kaavio 5



Kaavio6



2.2 Immunohistokemiallisen värjäyksen tulkinta

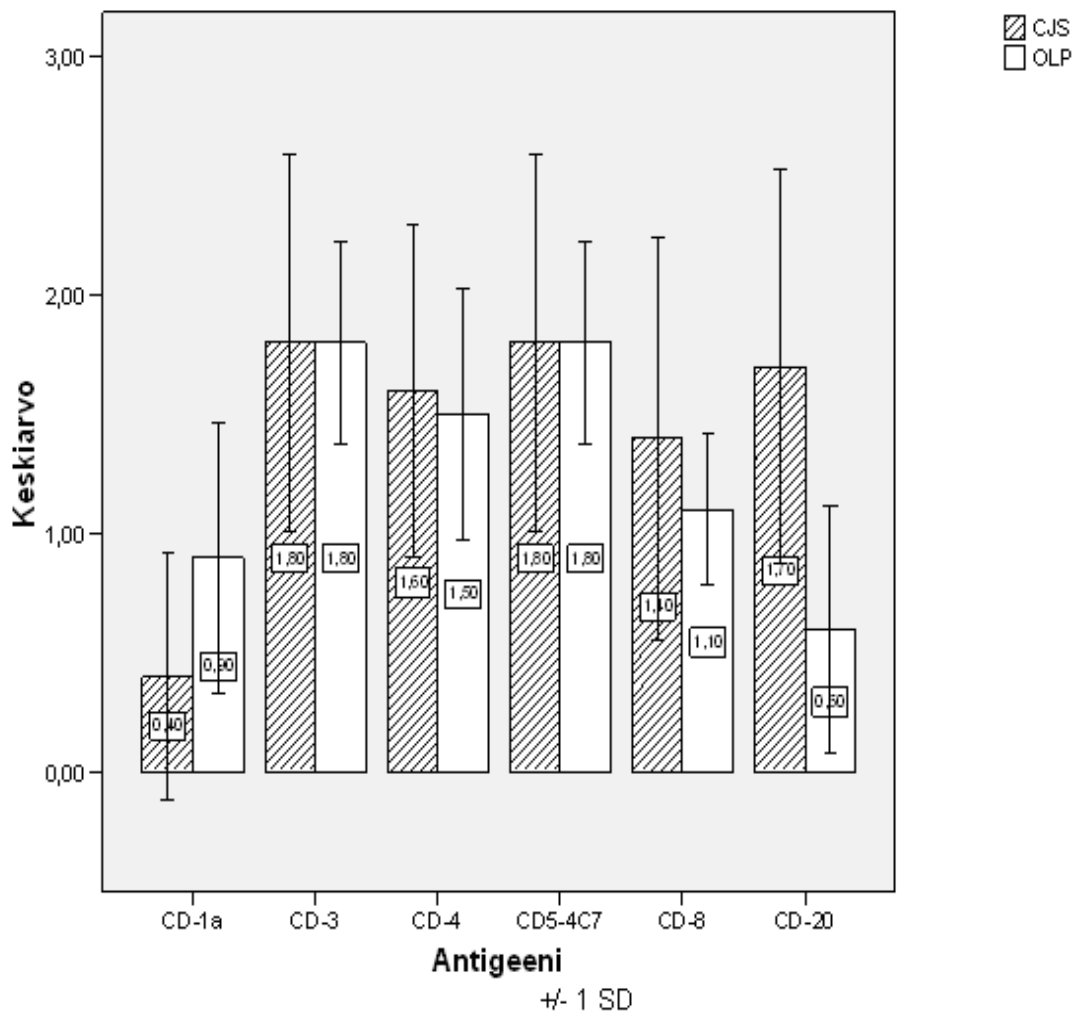
Immunovärjätyt näytteet tutkittiin kahdella eri kvantitatiivisellä menetelmällä. Ensimmäiseksi jokaisen värjäyksen voimakkuus luokiteltiin neliportaisella asteikolla: ei värjäytyvyyttä, heikko värjäytyvyys, keskivahva värjäytyvyys ja vahva värjäytyvyys. Vastaavat prosentit ovat 0, 0-10%, 10-50% ja 50-100%. B-lymfosyytit tunnistettiin positiivisen CD20 värjäytyvyyden ja T-lymfosyytit positiivisen CD3 värjäytyvyyden perusteella. Tämä tutkimus tehtiin erikseen OLP- ja KJS-näytteille sekä jokaiselle käytetylle antigeenille. Timár et al (17) modifioitua menetelmää käytettiin CD4 positiivisten solujen ja CD8 positiivisten solujen suhteellisten osuuksien (CD4/CD8) vertailuun. Vasta-aine, CD4/CD8 joka värjää suhteellisesti enemmän soluja saa arvon 3 (vahva). Vasta-aine, joka värjää suhteellisesti vähemmän soluja saa arvon 1 (heikko) tai 2 (keskivahva), riippuen CD4 ja CD8 positiivisten solujen vasta-ainevärjäyksen voimakkuuden välisestä erosta. Jokainen OLP ja KJS näyte sai yhden arvon kuvaamaan CD4 ja CD8 positiivisten T-solujen suhdetta. Suhdeluku (CD4/CD8) voi saada seuraavia arvoja: vahva CD8 (1/3), keskivahva CD8 (2/3), ei eroa (3/3), keskivahva CD4 (3/2), vahva CD4 (3/1).

3. Tulokset

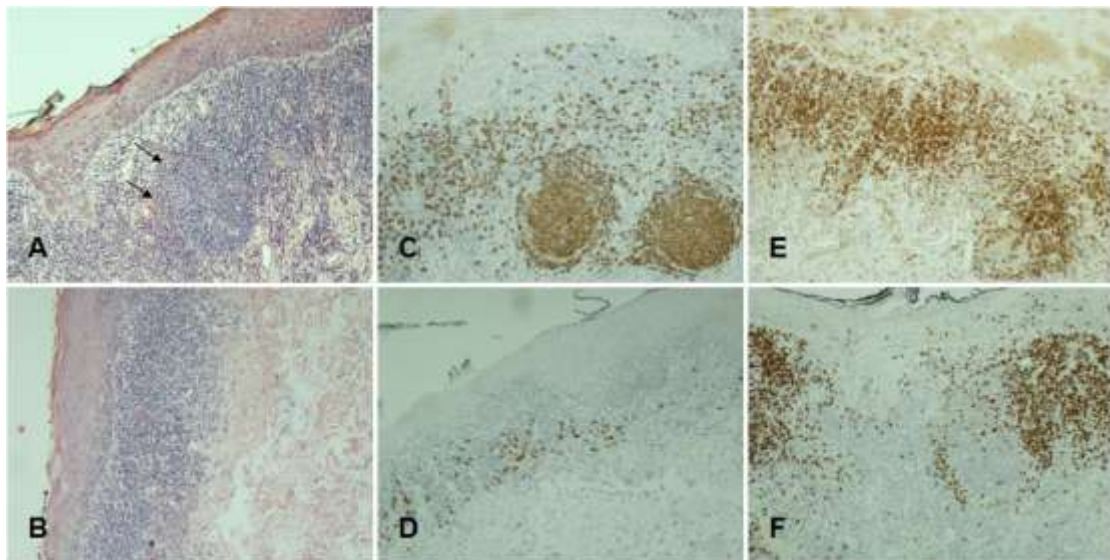
Löysimme tilastollisesti merkittävän eron CD20 antigeenin ilmentymisessä ja CD4/CD8 arvossa OLP:n ja KJS:n välillä. Loppujen antigeenien (CD1-a, CD3, CD4, CD5 ja CD8) ilmentymisessä ei löytynyt tilastollisesti merkittäviä eroja OLP: ja KJS:n välillä. (kuva 1, kuva 2). CD20 antigeenin kohdalla positiivista immunovärjäystä esiintyy subepiteliaalisessa stroomaan infiltraatiossa ja

lymfaattisissa follikkeleissa. CD20 värjäytyvyys oli 3 kertaa vahvempaa KJS:n kohdalla kuin OLP:n kohdalla. Tämä ero johtui enimmäkseen KJS:n lymfaattisista follikkeleista (kuva 1). CD20-antigeenin ilmentymisessä strooman lymfaattisessa infiltraatiossa oli OLP:n ja KJS:n välillä tilastollisesti merkittävä ero ($p= 0,0160$). OLP:ssa CD4 positiiviset T-solut olivat vallitseva solupopulaatio OLP:n yhteydessä ja CD4 positiivisten T-solujen osuus oli suurempi OLP:ssä kuin KJS:ssä (kuva 3). CD4/CD8 suhteen kohdalla löydettiin tilastollisesti merkittävä ero OLP:n ja KJS:n välillä ($p = 0,041$).

Kuva 1. Antigeenien keskimääräinen ekspresio OLP:n ja KJS:n stroomakudoksessa



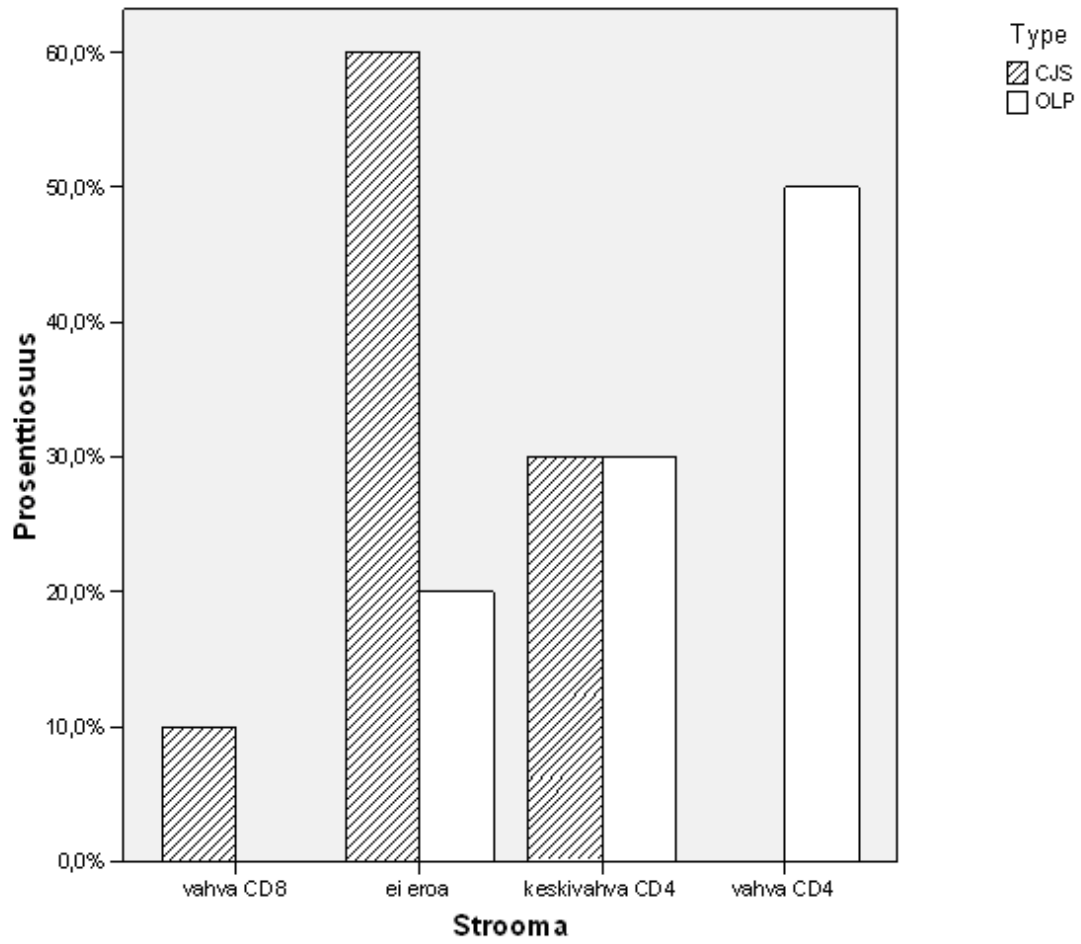
Kuva 2.



Kroonisen juktionaalisen stomatiiti follikulaaristen rakenteiden (nuolet) (A) ja Oral lichen planus HE-värjäys (B).

Kroonisen juktionaalisen stomatiitin CD20 immunohistokemiallinen (C) ja Oral lichen planus (D). Kroonisen juktionaalisen stomatiitin CD4 immunovärjäys (E) ja CD8 immunovärjäys (F). (A,B,E and F suurennos x 100, C ja D x 200)

Kuva 3. CD4/CD8 suhdeluku OLP:n ja KJS:n stroomassa.



4. Pohdinta

Tiedossamme ei ole muita aikaisempia tutkimuksia, kuin Eversole ja Eversole (1998) abstrakti. Emme myöskään ole löytäneet yhtään tutkimusta, joka käsittelee OLP:n ja KJS:n strooman lymfaattisen infiltraatin eroja. OLP on T-soluvälitteinen tulehduksellinen-/autoimmuuni reaktio, kun taas KJS:n yhteydessä esiintyy follikulaarirakenteita lymfaattisessa solukossa. KJS:n lymfaattisissa follikkeleissa on erityisesti runsas B-solupopulaatio. Kuten Eversole ja Eversole (1998) tutkimuksessa, me löysimme myös, että B-soluja on enemmän KJS:ssa verrattuna OLP:hen, johtuen enimmäkseen KJS:n lymfaattisista follikkeleista.

T-solut jakautuvat erilaisiin alaluokkiin ilmentämiensä antigeenien avulla. CD4-antigeenia ilmentävät auttaja T-solut ja CD8-antigeenia ilmentävät supressori/tappaja T-solut. T-solusuhdetta (CD4/CD8) käytetään immuunipuolustuksen tilan mittarina (18). Tutkimuksemme mukaan OLP ja KJS eroavat sekä B-solupopulaation sekä CD4 ja CD8 T-solujen suhteiden osalta. CD4/CD8 arvo oli korkea (2.15) OLP:ssa ja matala (1.08) KJS:ssä. Tämä tulos indikoi OLP:n ja KJS:n T-solupopulaatioiden erilaisuutta.

Strooman lymfaattinen infiltraatio on histologinen ja diagnostinen avaintekijä OLP:n ja KJS:n diagnostiikassa. Näiden kahden taudin, OLP:n ja KJS:n, erojen selvittäminen tarvitsee vielä lisätutkimuksia, molempien etiologia on vielä avoin.

Lähdeviitteet

[1] Neville BW, Damm DD, Allen CM, Bouquot JE. Oral & Maxillofacial Pathology, 2nd edition. City: Saunders; 2002. pp.680-1

[2] Sugerman PB, Savage NW, Walsh LJ, Zhao ZZ, Zhou XJ, Khan A, Seymour GJ, Bigby M. The pathogenesis of oral lichen planus. Crit Rev Oral Biol Med 2002;13:350-65.

[3] Thornhill MH. Immune mechanisms in oral lichen planus. Acta Odontol Scand 2001;59:174-7.

[4] Eversole LR, Eversole GM. Chronic junctional stomatitis with lymphoid aggregates: Dendrocyte-lymphocyte relationship. J Oral Pathol Med 1998;27:342-66.

[5] Harboe NMG, Ingild A. Immunization, Isolation of Immunoglobulins and Antibody Titre Determination. Scand J Immunol 1983;17:345-51.

[6] Boenisch T. Formalin-fixed and heat-retrieved tissue antigens: a comparison of their immunoreactivity in experimental antibody diluents. Appl Immunohistochem Molecul Morphol. 2001;9:176-9.

[7] Spira G, Pollock RR, Bargellesi A, Scharff MD. Monoclonal antibodies: a potentially powerful tool in the diagnosis and treatment of infectious diseases. Eur J Clin Microbiol. 1985;4:251-6.

[8] Felix B. The fluorescent antibody method in medical and biological research. Bull World Health Organ. 1961; 24:249–56.

[9] Hsu SM, Raine L, Fanger H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. J Histochem Cytochem. 1981;29:577-80.

[10] Sabattini E, Bisgaard K, Ascani S, Poggi S, Piccioli M, Ceccarelli C, et al. The EnVision++ system: a new immunohistochemical method for diagnostics and research. Critical comparison with the APAAP, ChemMate, CSA, LABC, and SABC techniques. J Clin Pathol. 1998;51:506-11.

[11] Kammerer U, Kapp M, Gassel AM, Richter T, Tank C, Dietl J, et al. A new rapid immunohistochemical staining technique using the EnVision antibody complex. J Histochem Cytochem. 2001;49:623-30.

[12] Fox CH, Johnson FB, Whiting J, Roller PP. Formaldehyde fixation. J Histochem Cytochem. 1985;33:845-53.

[13] Mies C. Molecular biological analysis of paraffin-embedded tissues. Hum Pathol. 1994;25:555-60.

[14] D'Amico F, Skarmoutsou E, Stivala F. State of the art in antigen retrieval for immunohistochemistry. J Immunol Methods. 2009;341:1-18.

[15] Leong TY, Leong AS. How does antigen retrieval work? *Adv Anat Pathol.* 2007;14:129-31

[16] Laboratorio käsikirja: HUS-Intranet.

[17] Timar J, Ladanyi A, Forster-Horvath C, Lukits J, Dome B, Remenar E, et al. Neoadjuvant immunotherapy of oral squamous cell carcinoma modulates intratumoral CD4/CD8 ratio and tumor microenvironment: a multicenter phase II clinical trial. *J Clin Oncol.* 2005;23:3421-32.

[18] Cajigas A, Suhrland M, Harris C, Chu F, McGowan J, Golodner M, et al. Correlation of the ratio of CD4⁺/CD8⁺ cells in lymph node fine needle aspiration biopsies with HIV clinical status. A preliminary study. *Acta Cytol.* 1997;41:1762-8.