Correlation between histopathological criteria of Human Papilloma Virus infection and the presence of HPV in paraffin-embedded cervical biopsies based on PCR assay

H.R. Ghasemian Moghadam, MD [1] H. Ayatollahi, MD [2] A.R. Sobhani, MD [3] Z. Etaati, MD [4] S. Zare, PhD [5]

Resident of Pathology [1] , , Assistant Professor Department of Pathology [3] , Assistant Professor Department of Obstetrics and Gynecology [4] , Associatr Professor Department of Community Medicine [5] , Hormozgan University of Medical Sciences, Bandar Abbas, Iran. Associate Professor Department of Pathology [2] , Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran.

(Received 23 Mar, 2012 Accepted 30 Apr, 2013)

ABSTRACT

Introduction: This study was carried out to correlate histological findings in cervical lesions to human papilloma virus (HPV), as detected by polymerase chain reaction (PCR).

Methods: In this descriptive study, out of 143 cervical biopsies, 50 biopsies, containing sufficient histopathologic criteria, were examined. PCR assay was performed with the primers GP05/06+ and, as control, the beta-globin gene was amplified. The morphological findings were correlated to HPV positivity: koilocytic atypia, multinucleation, acanthosis, papillomatosis, dyskeratotic cell, mitosis in the lower basal third of the epithelium, hyperplasia of basal layers.

Results: In 50 selected samples pathologic diagnosis was chronic cervicitis in 37 cases (74%) and cervical intraepithelial neoplasia (CIN) in 13 cases (including CIN I in 6 cases, CIN II in 5 cases, CIN III in 2 cases). HPV DNA was positive in 6 cases, including 5.4% of chronic cervicitis (2 cases) and 30.8% of CINs (including 33.3% of CIN I, 40% of CIN II). The analysis did not indicate any strong relationship between morphological criteria and HPV. The only finding showed an independent, straight and weak correlation between HPV and koilocytic atypia (P value=0.003 & Kappa=0.296) with sensitivity of 100% and a relatively low specificity of 63.6%. By excluding mild koilocytic atypia, this correlation was amplified (P<0.001 & Kappa=0.669) and appear acceptable sensitivity of 83.3% and specificity of 93.2%. The finding with highest positive and negative predictive value was the presence of definite koilocytosis (PPV=62.5% & NPV=97.6%).

Conclusion: In spite of association of some HPV infection with chronic cervicitis; there is no correlation between severity of chronic cervicitis and HPV infection. Although koilocytosis is a good indicative criterion for HPV infection; nevertheless, there is some limitations in histological diagnosis of cervical HPV infection.

Correspondence:
A.R. Sobhani, PhD.
Pathology Department Shariati Hospital, Hormozgan University of Medical Sciences.
Bandar Abbas, Iran
Tel:+98 917 361 1180
Email:
asobhani@hums.ac.ir

Key words: Human Papilloma Virus (HPV) - Polymerase Chain Reaction (PCR) - Biopsy

بررسی ارتباط بین معیارهای هیستوپاتولوژیک ویروس پاپیلومای انسانی و وجود HPV در نمونه‌های بیوپسی سرویکس در بلوکهای پارافینی به روش PCR

دکتر حمیدرضا قاسمیان مقدم [۱] دکتر حسین آیت‌اللهی [۲] دکتر علیرضا سبحانی [۳] دکتر زهرا اطاعتی [۴] دکتر شهرام زارع [۵]

[۱] دستیار گروه پاتولوژی [۳] استادیار گروه پاتولوژی، [۴] استادیار گروه زنان و زایمان، [۵] دانشیار گروه پزشکی اجتماعی، دانشگاه علوم پزشکی هرمزگان [۲] دانشیار گروه پاتولوژی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد

مجله پزشکی هرمزگان سال هفدهم شماره سوم مرداد و شهریور ۹۲ صفحات ۱۹۰-۱۸۴

چکیده

مقدمه: هدف از این مطالعه، تطابق یافته‌های هیستولوژیک ضایعات سرویکس با شناسایی ویروس پاپیلومای انسانی (HPV) به وسیله واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) بود.

روش کار: *در این مطالعه توصیفی، ۱۴۳ نمونه بیوپسی مورد بازبینی قرار گرفتند و ۵۰ نمونه که معیارهای هیستوپاتولوژیک کافی را داشتند به مطالعه وارد شدند. ارزیابی PCR با استفاده از پرایمرهای GP05/06+ انجام شد و از ژن بتاگلوبین به عنوان کنترل داخلی استفاده شد. یافته‌های موروفولوژیکی که با نتایج مثبت HPV تطابق داده شد شامل آتیپی کویلوسیتی، چند هسته‌ای شدن، آکانتوز، پاپیلوماتوز، پاراکراتوز، سلول دیسکراتوتیک، میتوز در یک سوم تحتانی اپیدرم، هیپرپلازی لایه های بازال بودند.*

نتایج: *در ۵۰ نمونه انتخابی تشخیص پاتولوژیک در ۳۷ مورد سرویسیت مزمن (۷۴٪) و در ۱۳ مورد نئوپلازی اینتراپیتلیال سرویکس CIN بود. DNA ی HPV جمعاً در ۶ مورد مثبت شد که شامل ۵/۴٪ موارد سرویسیت مزمن (۲ مورد)، ۳۰/۸٪ موارد CIN (شامل ۳۳/۳٪ موارد CIN I، ۴۰٪ موارد CIN II) بود. هیچ یک از معیارهای هیستولوژیک ارتباط بالایی با HPV نشان ندادند. تنها یافته ای که ارتباط مستقل، مستقیم و ضعیفی با HPV نشان میداد، آتیپی کویلوسیتی بود (P=۰/۰۰۳ و Kappa= ۰/۲۹۶) که حساسیت ۱۰۰٪ و ویژگی ۶۳/۶٪ نشان می‌داد. پس از حذف موارد خفیف آتیپی کویلوسیتی این ارتباط تقویت شد (P<۰/۰۰۱ و Kappa=۰/۶۶۹) و حساسیت و ویژگی به ترتیب به ۹۲/۲٪ و ۸۳/۳٪ تغییر یافت. بالاترین ارزش اخباری مثبت و منفی نیز مربوط به وجود کویلوسیتوز بارز بود.*

نتیجه‌گیری: *با وجود آن که برخی از موارد سرویسیت مزمن ناشی از عفونت HPV می‌باشد، بین شدت سرویسیت و ابتلا به HPV ارتباطی وجود ندارد. هرچند کویلوسیتوز یک معیار نشانگر خوب برای عفونت HPV می‌باشد، با این حال محدودیتهایی در زمینه تشخیص هیستولوژیک عفونت HPV سرویکس وجود دارد.*

کلیدواژه‌ها: *ویروس پاپیلومای انسانی (HPV)، PCR – بیوپسی*

نویسنده مسئول:
دکتر علیرضا سبحانی
گروه پاتولوژی بیمارستان شریعتی، دانشگاه علوم پزشکی هرمزگان
بندرعباس – ایران
تلفن: ۱۱۸۰ ۳۶۱ ۹۱۷ ۹۸+
پست الکترونیکی:
asobhani@huma.ac.ir

دریافت مقاله: ۹۱/۱/۲۴ اصلاح نهایی: ۹۱/۸/۲۲ پذیرش مقاله: ۹۲/۲/۱۰

مقدمه:

شایع‌ترین تغییرات مشاهده شده در اپیتلیوم اسکواموس سرویکس وضعیتهای متاپلاستیک یا واکنشی و ضایعات دیسپلاستیک مرتبط با عفونت HPV می‌باشد (۱). ویروس پاپیلومای انسانی (HPV) با ضایعاتی در داخل اپیتلیوم اسکواموس سرویکس (SIL) همراه است که می‌تواند به سمت سرطان سرویکس پیشرفت کند (۲). مطالعات همگروهی نشان داده‌اند که وجود DNA ی HPV برای پیشرفت نئوپلاسم‌های سرویکس الزامی است و با ناپدید شدن آنها پسرفت سلولهای نئوپلاستیک انتظار می‌رود (۲،۳). بیشتر ضایعات از اپیتلیوم اسکواموس یا اپیتلیوم اندوسرویکال متاپلاستیک منشا می‌گیرند. هنگامی که این ضایعات محدود به اپیتلیوم باشند، طبق تعریف سازمان بهداشت جهانی (WHO) نئوپلازی اینتراپیتلیال سرویکس (CIN) یا دیسپلازی-کارسینوم درجا نامیده می‌شوند. درجات CIN I, II, III برپایه وسعت و شدت درگیری تشخیص داده می‌شوند. چندین مطالعه نشان داده‌اند که عفونت HPV با ضایعات پیش‌ساز و نیز سرطانهای پیشرفته ارتباط دارند. تاریخچه طبیعی بیشتر کانسرهای سرویکس با یک

بیماری عفونی همراه با HPV شروع می‌شود که منجر به ایجاد ناهنجاریهای در سلولهای داخل اپیتلیوم اسکواموس می‌گردد. با پیشرفت روشهای شناسایی HPV کشف DNA ی HPV در ضایعات درجه پایین (LSIL) و درجه بالا (HSIL) داخل اپیتلیوم اسکواموس به ۸۰-۹۰٪ افزایش پیدا کرده است (۲).

با وجود آنکه در گزارش HSIL بین آسیب شناسان و نیز هنگام بازخوانی مجدد موارد گزارش شده، عموماً اتفاق نظر بالایی وجود دارد، این امر در موارد گزارش LSIL پایین می‌باشد. یک علت احتمالی تجربه هیستوپاتولوژیست می‌باشد که ضایعات ناشی از HPV را که دیسپلازی واضحی نداشته و جزو موارد CIN در نظر گرفته نشده، تشخیص LSIL مطرح می‌گردد (۱،۴). در این ضایعات غیرطبیعی علایم هیستولوژیک عفونت HPV به شکل متغییری به صورت کویلوسیتوز (koilocytosis)، چند هسته‌ای شدن (multinucleation)، آکانتوز (acanthosis)، سلول دیسکراتوتیک (Dyskeratotic cell)، میتوز در یک سوم بازال اپیتلیوم، هیپرپلازی لایه‌های بازال و فقدان یک لایه بازال مجزا بروز می‌کند. علاوه بر این در کولپوسکوپی این ضایعات غیرطبیعی و ضایعات متاپلاستیک و واکنشی و LSIL طی تماس با اسید استیک سفید می‌شوند (acetowhite) که تحت بیوپسی قرار گرفته و جهت بررسی ارسال می‌گردند (۱). با توجه به اهمیت تشخیص تغییر کویلوسیتی در شناسایی هیستولوژیک HPV، در این مطالعه وجود تغییرات کویلوسیتی در اپیتلیوم سطحی بطور تیپیک و یا همراهی با تغییرات دیسپلاستیک در جاهای دیگر نمونه، همراهی با آکانتوز یا سلول دیسکراتوتیک و یا میتوز در محل مشاهده تغییر کویلوسیتی به عنوان معیار در نظر گرفتن این تغییرات به عنوان تغییر کویلوسیتی بارز مدنظر قرار گرفت.

بیشتر کشورها از تست غربالگری پاپانیکولا برای کشف CIN استفاده می‌کنند. بیمارانی که در آنها نتایج تست پاپانیکولا مثبت شود، جهت انجام کولپوسکوپی و بیوپسی نواحی مشکوک ارجاع می‌شوند. تشخیص هیستولوژیک CIN بر اساس معیارهای تعریف شده توسط WHO گذاشته می‌شود. علاوه براین برخی از نماهای هیستولوژیک به عنوان احتمال وجود عفونت HPV در ضایعات اپیتلیالی در نظر گرفته می‌شود. با این حال با وجود آن که این معیارهای هیستولوژیک قابل قبول هستند اما در تشخیص نهایی بین پاتولوژیستها اختلاف نظر وجود دارد (۲).

پس از ایجاد پرایمرهای شناسایی HPV توسط واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)، از آنجایی که تقریباً در تمامی موارد DNA ی HPV یافت شد، مشخص گردید HPV نقشی اساسی در سرطانهای سرویکس بازی می‌کند. این امر منجر به استفاده وسیع از آزمونهای شناسایی DNA ی HPV در بیماران مبتلا به SIL یا دارای سلولهای اسکواموس غیرطبیعی با اهمیت نامشخص در مطالعات غربالگری توسط کولپوسکوپی گردید (۵-۲).

در یک مطالعه در سال ۲۰۰۸ به وسیله Cabibi و همکارانش به بررسی معیارهای هیستوپاتولوژیک مرتبط با HPV پرداختند، آنها نتیجه گرفتند که تنها معیارهای هیستولوژیکی که ارتباط معنی‌داری با نتایج مثبت HPV داشتند، کویلوسیتوز و دوهسته‌ای شدن می‌باشد و تنها معیار نسبتاً اختصاصی و حساس کویلوسیتوز است (۱). در مطالعه دیگری که در سال ۲۰۰۴ توسط Salvia و همکارانش انجام شد، آنها نیز نتیجه گرفتند که حساسترین یافته‌های مرتبط با HPV، آتیپی کویلوسیتی و دوهسته‌ای شدن می‌باشد، اما میزان اختصاصیت آنها پایین است. همچنین بالاترین ارزش اخباری مثبت نیز مربوط به آتیپی کویلوسیتی، دیسکراتوز و دوهسته‌ای شدن می‌باشد (۲). در مطاله انجام شده در سال ۲۰۰۲ در استان مازندران درصد بالایی از موارد دیسپلازی\متاپلازی سرویکس و موارد کارسینوم سرویکس حاوی DNAی HPV بودند، در حالی که این میزان در موارد سرویسیت مزمن پایین بود. در مطالعات انجام شده در سالهای ۲۰۰۳ در کره جنوبی توسط Tae Sook Hwang (۶) و ۲۰۰۴ در برزیل توسط Salvia و همکارانش (۲) در درصد بسیار بالایی از موارد نئوپلازیهای اینتراپیتلیال سرویکس و کارسینوم سرویکس DNAی HPV یافت شد. آنها همچنین در درصد قابل ملاحظه‌ای از موارد سرویسیت مزمن HPV را کشف نمودند (به ترتیب ۳۷/۲٪ و ۳۵٪).

هدف از این مطالعه ارزیابی معیارهای مورفولوژیک نمونه‌های بیوپسی شده و مقایسه آنها با نتایج حاصله از PCR جهت کشف وجود DNAی HPV می‌باشد. به این امید که این مطالعه بتواند تشخیص مورفولوژیک HPV را بهبود بخشد.

روش کار:

در این مطالعه که به روش توصیفی -مقطعی انجام شد، تمامی نمونه‌های بیوپسی و کورتاژ سرویکس که از ابتدای سال

۱۳۸۹ به بخش پاتولوژی بیمارستان شریعتی بندرعباس ارسال شده بودند، مورد بازبینی قرار گرفتند. پس از بررسی نمونه‌ها مواردی که براساس معیارهای هیستوپاتولوژیک کافی جهت ورود به مطالعه را داشتند، پس از ثبت معیارها طبق پرسشنامه تهیه شده، بلوکهای مربوطه از آرشیو خارج و جهت استخراج DNA و ارزیابی از نظر وجود HPV مورد بررسی قرار گرفتند.

در این مطالعه مواردی که تغییرات کویلوسیتی را به صورت بارز و گسترده نشان می‌دادند، به صورت مثبت و مواردی که آتیپی کویلوسیتی خفیفی به صورت هسته‌های هیپرکروماتیک با نامنظمی خفیف شکل و حاشیه غشای هسته به همراه سیتوپلاسم روشن را نشان می‌دادند، به عنوان موارد مشکوک ثبت گردید. براساس وجود التهاب و دیسپلازی و نیز شدت آن نمونه‌ها به ۴ گروه تشخیصی سرویسیت مزمن، CIN I، CIN II، CIN III تقسیم‌بندی شدند. بدین صورت که مواردی که التهاب را نشان می‌دادند و فاقد دیسپلازی بودند در گروه سرویسیت مزمن قرار گرفتند و مواردی که دیسپلازی را نشان می‌دادند برحسب شدت دیسپلازی در گروه CIN قرار گرفتند.

استخراج DNA: پس از تهیه ۶ برش ۱۰ میکرونی از هر نمونه به روش استریل، بااستفاده از میکروتوم با تیغ های یک بار مصرف، نمونه به لوله های میکروسانتریفوژ وارد شد و مراحل دپارافینیزه کردن نمونه با استفاده از حرارت، گزیلن انجام شد و نمونه بافتی با استفاده از سانتریفوژ و رسوب‌دهی بوسیله اتانل جدا گردید. پس از خشک کردن نمونه در حرارت $37^{o}C$ به مدت ۲ ساعت، جهت استخراج DNA نمونه ها در $300\mu l$ بافر هضم‌کننده (متشکل از ۵۰mM اسید کلریدریک تریس، ۱۰mM EDTA، ۰/۵٪ توین ۲۰ و $300\mu g/ml$ پروتیینازK) به مدت یک شبانه روز در حرارت $56^{o}C$ با لرزش ملایم تا خورد شدن کامل بافت قرار داده شد. سپس با استفاده از روش فنل-کلروفرم نمونه DNA استخراج گردید (۱،۱۹،۲۳). جهت ارزیابی کیفی نمونه DNA از پرایمرهای ژن بتاگلوبین استفاده گردید. سپس نمونه‌های حاوی DNA جهت کشف DNAی HPV تحت آزمون PCR با استفاده از پرایمر عمومی GP05/06+ قرار گرفت که باعث آمپلیفیکاسیون ژن HPV L1 ORF و ایجاد یک رشته حاوی ۱۵۰ جفت باز می‌شود (۲،۷،۸).

β-globin6F 5'-GGTTGGCCAATCTACTCCCAGG-3'

β-globin6R 5'-GCTCACTCAGTGTGGCAAAG-3'

GP5: 5' - TTTGTTACTGTGGTAGATAC - 3'

GP6: 5' - GAAAAATAAACTGTAAATCA - 3'

جهت آمپلیفیکاسیون نمونه DNA، ۱۰۰ نانوگرم از DNA نمونه به ۵۰ میکرولیتر محلول PCR متشکل از ۲۰ میلی مول (8.3) Tris-Hcl، ۸ میلی مول $Mgcl_2$، ۷/۵ میلی مول DTT، ۲۰۰ میکرومول از انواع دزوکسی نوکلئوتیدهای تری فسفات، مخلوطی حاوی ۲۰ پیکومول از هر پرایمر، و ۰/۲۵ واحد Taq DNA polymerase، سپس نمونه‌ها طبق برنامه اجرا شده توسط ترموسایکلر به مدت ۲ ساعت تحت PCR قرار گرفت (۹).

در نهایت معیارهای هیستولوژیک ثبت شده با نتایج حاصل از PCR با استفاده از نرم‌افزار SPSS 20 مقایسه و مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. جهت بررسی ارتباط هر یک از معیارهای هیستولوژیک با وجود DNAی HPV از تست کای اسکوئر (Chi-square test) استفاده شد. هنگامی که تعداد موارد مثبت معیار مورد نظر کمتر از پنج بود، از تست دقیق فیشر (Fisher's exact test) استفاده شد. جهت تایید ارتباط بین تشخیص بیوپسی و معیارهای هیستولوژیک با نتیجه PCR، ضریب کاپا (Kappa) محاسبه گردید. مقادیر نزدیک به ۱+ نشان‌دهنده ارتباط مستقیم بین دو روش، مقادیر بالاتر از ۰/۷۵ نشان دهنده ارتباط قوی، مقادیر کمتر از ۰/۴ نشان دهنده ارتباط ضعیف و مقادیر بین ۰/۴ و ۰/۷۵ نشان‌دهنده ارتباط بینابینی بین دو روش می‌باشد (۲).

نتایج:

در این مطالعه معیارهای هیستوپاتولوژیک و تشخیص نهایی ۵۰ نمونه بیوپسی و کورتاژ سرویکس مورد ارزیابی قرار گرفت. میانگین سنی بیماران در این مطالعه ۱۰±۳۸/۷۲ سال (در محدوده ۲۱ تا ۵۷ سال) بود. نتایج شیوع HPV براساس گروه های سنی مطابق جدول شماره ۱ بود.

جدول شماره ۱-نتایج شیوع HPV بر اساس گروههای سنی

گروه سنی	تعداد (درصد)	HPV^+	درصد ابتلا به HPV در گروه سنی مربوطه
<۲۵	۵ (٪۱۰)	۱ (٪۱۶/۷)	۲۰
۲۶-۳۰	۸ (٪۱۶)	۲ (٪۳۳/۳)	۲۵
۳۱-۳۵	۸ (٪۱۶)	۱ (٪۱۶/۷)	۱۲/۵
۳۶-۴۰	۷ (٪۱۴)	۱ (٪۱۶/۷)	۱۴/۳
۴۱-۴۵	۷ (٪۱۴)	۱ (٪۱۶/۷)	۱۴/۳
۴۶-۵۰	۷ (٪۱۴)	۰ (٪۰)	۰
۵۱-۵۵	۷ (٪۱۴)	۰ (٪۰)	۰
>۵۵	۱ (٪۲)	۰ (٪۰)	۰
تعداد کل	۵۰	۶	

تغییرات مورفولوژیک مشاهده شده در این مطالعه: آتیپی کویلوسیتی ۴۴٪ (۲۲ مورد، شامل ۱۴ مورد آتیپی کویلوسیتی خفیف و ۸ مورد کویلوسیتوز بارز)، آکانتوزیس ۵۸٪ (۲۹ مورد)، پاپیلوماتوز ۶٪ (۳ مورد)، پاراکراتوز ۸٪ (۴ مورد)، سلول دیسکراتوتیک ۱۴٪ (۷ مورد)، میتوز در یک سوم تحتانی اپیدرم ۲۴٪ (۱۲ مورد)، هیپرپلازی لایه بازال ۳۶٪ (۱۸ مورد)، آتیپی سلولی ۴۶٪ (۲۳ مورد)، دیسپلازی ۲۶٪ (شامل ۶ مورد خفیف، ۵ مورد متوسط و ۲ مورد شدید). التهاب در تمامی موارد به درجاتی مشاهده شد، که براساس شدت ۳۰٪ خفیف، ۵۲٪ متوسط و ۱۸٪ شدید بود. هیچ موردی از چندهسته‌ای شدن در نمونه های مورد بررسی مشاهده نشد.

تغییرات هیستوپاتولوژیک مشاهده شده بر اساس نتایج آزمون PCR مطابق جدول ۲ بود.

جدول شماره ۲-تغییرات هیستوپاتولوژیک مشاهده شده بر اساس نتیجه HPV PCR

HPV (PCR)	دیسپلازی	آتیپی	هایپرپلازی	میتوز	سلول دیس کراتوتیک	پاراکراتوز	پاپیلوماتوز	آکانتوز	چند هسته‌ای	کیلوسایت
منفی	۹	۱۸	۱۴	۹	۶	۴	۳	۲۴	۰	۱۴
مثبت	۴	۵	۴	۳	۱	۰	۰	۵	۰	۷

جدول شماره ۳-میزان موارد HPV مثبت بر اساس تشخیص

تشخیص	HPV DNA (PCR)		جمع
	عدم وجود	وجود	
Chronic Cervicitis	۳۵ (٪۹۴/۶)	۲ (٪۵/۴)	۳۷
CIN I	۴ (٪۶۶/۷)	۲ (٪۳۳/۳)	۶
CIN II	۳ (٪۶۰)	۲ (٪۴۰)	۵
CIN III	۲ (٪۱۰۰)	۰٪۹	۲
Total	۴۴ (٪۸۸)	۶ (٪۱۲)	۵۰ (٪۱۰۰)

در تمامی موارد HPV مثبت براساس تست PCR آتیپی کویلوسیتی مشاهده گردید. معیارهایی که با حضور DNAی HPV براساس آزمون PCR ارتباط نشان میدادند، آتیپی کویلوسیتی ($P=۰/۰۰۳$) و وجود آتیپی سلولی ($P=۰/۰۳$) بودند. البته در همه موارد تطابق بین معیار هیستوپاتولوژیک مشاهده شده با نتیجه تست PCR پایین بود (به ترتیب $Kappa=۰/۲۹۶$ برای آتیپی کویلوسیتی و $Kappa=۰/۱۹۱$ برای وجود آتیپی سلولی).

با حذف مواردی که تغییرات کویلوسیتی خفیف را نشان می‌دادند، میزان تطابق کویلوسیتوز با نتیجه تست PCR افزایش پیدا کرد ($Kappa=۰/۶۶۹$).

با کنترل تأثیر التهاب مزمن و آتیپی کویلوسیتی بر مشاهده آتیپی سلولی، ارتباط بین آتیپی سلولی و وجود DNAی HPV از بین رفت (به ترتیب ۰/۱۶۱ و $P=۰/۰۵۳$).

تشخیص پاتولوژی نمونه‌های مورد بررسی شامل ۳۷ مورد سرویسیت مزمن (۷۴٪)، ۶ مورد CIN I (۱۲٪)، ۵ مورد CIN

II (۱۰٪)، و ۲ مورد CIN II (۴٪) بود. نتایج تست PCR براساس تشخیص پاتولوژی مطابق جدول شماره ۳ بود.

براساس این مطالعه بین دیسپلازی و وجود DNAی HPV ارتباط وجود دارد (P=۰/۰۴۴)، اما این ارتباط ضعیف می‌باشد (Kappa=۰/۲۲۲).

براساس این مطالعه، برخی از موارد سرویسیت مزمن می‌توانند ناشی از HPV باشند، اما ارتباطی بین شدت التهاب و عفونت HPV یافت نشد.

بحث و نتیجه‌گیری:

در این مطالعه آتیپی کویلوسیتی، آتیپی سلولی و وجود دیسپلازی ارتباط معنی‌داری با حضور DNAی HPV نشان دادند؛ که در تمامی این موارد این ارتباط ضعیف بود. پس از حذف اثرات وجود همزمان آتیپی کویلوسیتی و دیسپلازی بر مشاهده آتیپی سلولی در نمونه بیوپسی با استفاده از آزمونهای آماری Partial correlations این ارتباط از بین رفت. این نتایج با نتایج حاصله از تحقیق P.N.D Salvia و همکارانش در برزیل و مطالعه Cabibi و همکارانش هم‌خوانی دارد.

در زمینه ارتباط بین وجود سلولهای دوهسته‌ای با حضور DNAی HPV در مطالعات سالویا و کابیبی و همکارانشان، به علت عدم مشاهده این تغییر هیستولوژیک در نمونه‌های مورد بررسی در این مطالعه این ارزیابی امکان‌پذیر نبود. این اختلاف ممکن است به علت اختلاف در نحوه انتخاب موارد مورد مطالعه باشد.

تنها معیار تشخیصی قابل اطمینان در این مطالعه وجود آتیپی کویلوسیتی بود (با حساسیت بالا (۱۰۰٪) و ویژگی نسبتاً پایین (۶۳/۶٪) و ارزش اخباری مثبت ۲۷/۳٪ و ارزش اخباری منفی ۱۰۰٪). با در نظر گرفتن موارد قطعی کویلوسیتوز (پس از حذف موارد با تغییر کویلوسیتی خفیف) حساسیت و ویژگی قابل قبولی به دست آمد (حساسیت ۸۳/۳٪ و ویژگی ۹۳/۲٪؛ با ارزش اخباری مثبت ۶۲/۵٪ و ارزش اخباری منفی ۹۷/۶٪). در نتیجه با توجه به شیوع نسبتاً پایین عفونت HPV سرویکس در ایران (۹)، به نظر می‌رسد برخلاف مناطق با شیوع بالای عفونت همانند آمریکای لاتین (۲) می‌توان از موارد تغییر کویلوسیتی خفیف جهت ارزیابی نمونه از نظر وجود DNAی HPV صرف نظر نمود و تنها بر مواردی که کویلوسیتوز بارز را نشان می‌دهند، تکیه کرد. نتایج حاصله از ارزش تشخیصی کویلوسیتوز در این مطالعه بالاتر از مطالعه Cabibi و همکارانش می‌باشد اما این اختلاف قابل ملاحظه نمی‌باشد.

در این مطالعه وجود عفونت HPV براساس تشخیص هیستوپاتولوژیک نمونه بیوپسی سرویکس در ۵/۴٪ موارد سرویسیت مزمن و ۳۰/۸٪ موارد دیسپلازی سرویکس نشان داد. این نتایج در مقایسه با نتایج حاصل از مطالعه انجام شده در استان مازندران که بر روی نمونه‌های پارافینه انجام شده (۱۱) پایین‌تر می‌باشد؛ همچنین اختلاف کاملاً معنی‌داری با نتایج مطالعات Tae Sook Hwang و همکارانش در کره جنوبی (۶) و P.N.D Salvia و همکارانش در برزیل (۲) دارد.

این اختلاف از دو جنبه قابل ارزیابی می‌باشد: اول از دیدگاه نوع منبع نمونه DNA مورد بررسی و روشهای ارزیابی وجود DNA؛ و دوم اختلاف در شیوع عفونت HPV سرویکس در مناطق مختلف.

از آنجایی که در برخی از مطالعات مشکلاتی در زمینه حصول نتیجه از آزمون PCR با نمونه‌های حاصل از بلوکهای پارافینی بافتهای فیکس شده در فرمالین گزارش شده است، احتمال دارد که در صورت استفاده از نمونه‌های یخ‌زده یا تازه، به علت عدم وجود اثر بازدارنده فرمالین در مرحله امپلیفیکاسیون، نتیجه آزمون HPV PCR در تعداد بیشتری از نمونه‌ها مثبت گردد (۱۲). Tae Sook Hwang و همکارانش و نیز P.N.D Salvia و همکارانش در مطالعات خود از نمونه تازه (cytobrush) جهت ارزیابی وجود DNAی HPV استفاده کردند. همچنین هر دو از دو روش جهت تأیید وجود DNAی HPV در مطالعه خود استفاده نمودند (ارزیابی به روش PCR-RFLP و میکروآرایه‌های الیگونوکلئوتیدی در مطالعه تائه سوک هوانگ و استفاده از دو پرایمر GP05/06+ و MY09/11 در مطالعه سالویا). در نتیجه احتمال دارد برخی از موارد آزمون HPV PCR به صورت کاذب منفی شده باشد.

از سوی دیگر، با توجه به اختلاف شیوع عفونت HPV در مناطق مختلف جهان (شیوع بالا در آمریکای لاتین و شیوع پایین در منطقه مدیترانه) این اختلاف می‌تواند ناشی از اختلاف شیوع عفونت HPV سرویکس باشد (۱۰).

با توجه به نتایج این مطالعه و مطالعات قبلی، با توجه به وجود شواهد فزاینده در زمینه نقش عفونت HPV در ایجاد دیسپلازی و ضایعات پیش ساز کارسینوم سرویکس و احتمال وجود انواع HR-HPV (High Risk-HPV) در سنین بالاتر،

توصیه می‌شود در مواردی کـه تغییـرات کویلوسـیتی بـارز یـا دیسپلازی سـرویکس در نمونـه بیوپسـی سـرویکس مشـاهده می‌گردد، جهت تأییـد حضـور DNAی HPV و تایپینـگ آن از روش سریع و دقیق Real time PCR روی نمونـه هـای تـازه (Cytobrush) به منظور پیش‌بینی احتمال پیشـرفت ضـایعه بـه ضایعات با درجه بالاتر استفاده گردد.

References منابع

1. Cabibi DF, Giovannelli L, Cacciatore M, Tripodo C, Ammatuna F, Aragona F, et al. Histological Features and ki-67 Index In Cervical Atypical Lesions. *American Journal of Infectious Diseases*. 2008;4:193-199.
2. Salvia PN, Bergo SM, Bonesso-Sabadini PI, Tagliarini EB, Hackel C, DE Angelo Andrade LA. Correlation between histological criteria and human papillomavirus presence based on PCR assay in cervical biopsies. *Int J Gynecol Cancer*. 2004;14:126-132.
3. Nobbenhuis MA, Walboomers JM, Helmerhorst TJ, Rozendaal L, Remmink AJ, Risse EK, et al. Relation of human papilloma virus status to cervical lesions and consequences for cervical-cancer screening: a prospective study. *Lancet*. 1999;354:20-25.
4. Solomon D, Davey D, Kurman R, Moriarty A, O'connor D, Prey M, et al. The 2001 Bethesda system: terminology for reporting results of cervical cytology. *JAMA*. 2002;287:2114-2119.
5. Cricca M, Bonvicini F, Venturoli S, Ambretti S, Gallinella G, Gentilomi G, et al. Efficient treatment of paraffin-embedded cervical tissue for HPV DNA testing by HC-II and PCR assays. J Clin Virol. 2004;29:137-140.
6. Hwang TS, Jeong JK, Park M, Han HS, Choi HK, Park TS. Detection and typing of HPV genotypes in various cervical lesions by HPV oligonucleotide microarray. *Gynecol Oncol*. 2003;90:51-56.
7. Barger MP, BAAY MF, Quint WG, Koudstaal J, Hollema H, Duk JM, et al. Comprehensive Study of Several General and Type-Specific Primer Pairs for Detection of Human Papillomavirus DNA by PCR in Paraffin-Embedded Cervical Carcinomas. *Journal of Clinical Microbiology*. 1996;34:745-747.
8. Sadeghi A, Sobhani AR, Etaati Z, Jahanlu A, Shiroodi M. Prevalence of Human Papilloma Virus among Women with Cervical Intraepithelial Neoplasia III and Invasive Cervical Cancer from 2001 to 2006 in Bandarabas. *Iranian Journal of Pathology*. 2008;3:183-185.
9. Hindryckx P, Garcia A, Claeys P, Gonzalez C, Velasquez R, Bogers J, et al. Prevalence of high risk human papilloma virus types among Nicaraguan women with histological proved preneoplastic and neoplastic lesions of the cervix. *Sex Iran SM Infect*. 2006;82:334-336.
10. Xavier Bosch F, Qiao YL, Castellsagué X. The epidemiology of human papillomavirus infection and its association with cervical cancer. *International Journal of Gynecology and Obstetrics*. 2006;94:8-21.
11. Hamkar R, Azad TM, Mahmoodi M, Seyedirashti S, Severini A, Nategh R. Prevalence of human papilloma virus in Mazandaran province, Islamic Republic of Iran. *East Mediterr Health J*. 2002;8:265-271.
12. Rabelo-Santos SH, Zeferino L, Villa LL, Sobrinho JP, Amarial RG, Magalhaes AV. Human papilloma virus prevalence among women with cervical intraepithelial neoplasia III and invasive cervical cancer from Goiania, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2003;98:181-184.