Archive of SID

تعیین ارزش تشخیصی رنگ‌آمیزی گیمسا و تست اوره‌آز سریع در هلیکوباکتر پیلوری

*دکتر شاهین قاسمی[I]
علی چهرئی[II]
دکتر سلیمان صادقی[III]
دکتر علی ابراهیمی[III]

چکیده

با توجه به شیوع فراوان بیماریهای التهابی دستگاه گوارش فوقانی و اثبات نقش هلیکوباکتر به عنوان یکی از مهمترین عوامل اتیولوژیک بروز بیماریهای اسید ـ پپتیک، این مطالعه جهت ارزیابی نقش روشهای تشخیصی سریع برای این باکتری انجام یافت. این مطالعه به صورت مشاهده‌ای ـ مقطعی بر روی ۱۰۰ بیمار مبتلا به علائم گوارش که در فاصله مهرماه ۱۳۷٦ تا مرداد ۱۳۷۸ به مراکز درمانی دانشگاه علوم‌پزشکی ایران مراجعه نموده‌اند انجام شده است. با اندوسکوپی معده توسط متخصصین داخلی حداقل ۲ نمونه بیوپسی از مخاط معده از هر بیمار تهیه شد. یک نمونه از این بیوپسی‌ها در جهت تشخیص وجود عفونت با هلیکوباکتر و یافته‌های اختصاصی پاتولوژی در رنگ‌آمیزی هماتوکسیلن ائوزین H-E (به عنوان روش مرجع) و مقایسه این یافته‌ها با نتایج بدست آمده در رنگ‌آمیزی اختصاصی گیمسا در جهت تعیین ارزش این رنگ‌آمیزی استفاده شد. بیوپسی دیگر جهت تشخیص سریع (داخل اتاق اندوسکوپی) مبتلایان به این عفونت با انجام تست اوره‌آز یک دقیقه‌ای به کار گرفته شد. در آنالیز نتایج از شاخصهای حساسیت، ویژگی، ارزش اخباری مثبت و منفی و نسبت درشت نمایی مثبت و منفی استفاده گردید.

بر اساس نتایج بدست آمده حساسیت رنگ‌آمیزی گیمسا ۹۵/۹٪ و ویژگی آن ٤٤/٤٪ گزارش شد و برای تست اوره‌آز حساسیت ٦۹/۹٪ و ویژگی ۸۵/۲٪ محاسبه شد. ارزش اخباری مثبت (PPV) برای رنگ‌آمیزی گیمسا و تست سریع اوره‌آز به ترتیب ۸۲/۳٪ و ۹۲/۷٪ محاسبه گردید و ارزش اخباری منفی (NPV) برای این دو تست به ترتیب ۸۰٪ و ۵۱٪ گزارش شد. نسبت درست‌نمایی مثبت (PLR) برای رنگ‌آمیزی گیمسا و تست اوره‌آز به ترتیب ۱/۷ و ٤/۷ بدست آمد و نسبت درست‌نمایی منفی (NLR) برای این دو تست به ترتیب ۰/۰۹ و ۰/۳۵ گزارش شد.

رنگ‌آمیزی گیمسا دارای حساسیت بالایی بوده نتیجه منفی آن دارای ارزش می‌باشد.این در حالی است که تست اوره‌آز تنفسی سریع دارای ویژگی بالایی است و نتایج مثبت آن دارای ارزش می‌باشد اما موارد منفی آن باید با روش مرجع مناسب کنترل گردد.

کلید واژه ها: **۱ – هلیکوباکتر پیلوری** **۲ – رنگ‌آمیزی گیمسا** **۳ – رنگ‌آمیزی H-E** **۴ – تست اوره‌آز سریع**

مقدمه

بیماریهای التهابی دستگاه گوارش فوقانی بسیار شایع بوده و بروز آنها روز به روز در حال افزایش است. این بیماری‌ها باعث ایجاد طیف وسیعی از علائم بالینی می‌شوند که از بین آنها، بیماریهای اسید پپتیک مهمترین و شایعترین

این مقاله خلاصه‌ای است از پایان‌نامه دکترای " ابراهیمی. علی، صادقی. سلیمان، تعیین ارزش تشخیصی رنگ‌آمیزی گیمسا و تست اوره‌آز سریع در هلیکوباکتر پیلوری به راهنمایی دکتر قاسمی. شاهین، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی ایران. ۱۳۷۸".

I) استادیار بیماریهای عفونی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی ایران (*مولف مسؤول)
II) دانشجوی پزشکی و عضو کمیته پژوهشی دانشجویی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی ایران
III) پزشک عمومی

www.SID.ir

Archive of SID

هستند. کشف هلیکوباکتر پیلوری به عنوان عامل عفونی بروز گاستریت و اولسرپپتیک در سال ۱۹۸۳ را می‌توان مهمترین پیشرفت در زمینه فیزیوپاتولوژی این دسته از بیماریها در قرن اخیر دانست(۱). مطالعات اپیدمیولوژیک نشانگر انتشار جهانی این باکتری و شیوع فراوانتر آن در کشورهای در حال توسعه است. اگر چه پاتوفیزیولوژی بروز گاستریت و دئودنیت و ارتباط آنها با ایجاد زخمهای پپتیک و بروز بدخیمی‌ها، هنوز مورد بررسی است. تقریباً می‌توان هلیکوباکتر را عامل اتیولوژیک اصلی بروز زخم دئودنوم و احتمالاً معده دانست(۲،۱). حتی مدارکی دال بر نقش‌آفرینی این باکتری در پاتوژنز بدخیمی معده در دست است که اهمیت این عفونت را روز به روز بیشتر می‌نماید(۳).از طرفی، شیوع آلودگی با این باکتری در مخاط طبیعی معده نیز نسبتاً زیاد است. با توجه به مطالب فوق، اهمیت تشخیص سریع این باکتری و در نتیجه آغاز سریعتر درمان، مشخص می‌گردد. در حال حاضر تشخیص وجود هلیکوباکتر با انجام اندوسکوپی معده، تهیه بیوپسی و بررسی هستوپاتولوژی مخاط با رنگ‌آمیزی روتین یا اختصاصی امکان‌پذیر است. نوعی آزمون تنفسی اوره با استفاده از کربن ۱۳یا ۱۴ جهت تشخیص هلیکوباکتر پیلوری براساس فراورده‌های آنزیم اوره‌آز و آزاد شدن دی‌اکسید کربن نشان‌دار بوجود آمده است که در آن پس از خوردن اوره نشان‌دار در صورت وجود آنزیم اوره‌آز ساخته شده توسط هلیکوباکتر پیلوری، دی‌اکسید کربن نشان‌دار در هوای بازدمی قابل ردیابی است. حساسیت این آزمون ۹۰ تا ۹۵ درصد و ویژگی آن ۹۸ تا ۹۹ درصد می‌باشد. در سرم افراد واجد کولونیزاسیون هلیکوباکتر پیلوری، آنتی‌بادی‌هایی (IgG,IgA) علیه این باکتری یافت می‌شود که امروزه به شکل وسیعی از آزمونهای سرولوژی جهت کشف هلیکوباکتر پیلوری استفاده می‌شود. آزمون ELIZA و ثبوت کمپلمان دو روش شایع سرولوژی می‌باشد که حساسیتی به ترتیب معادل ۹۵٪ و ۷۵٪ دارند(۵،۴). همچنین روشهای هیستولوژی دارای حساسیتی بین ۹۰-۷۰٪ خواهد بود و توجه به این نکته لازم است که این روش نیازمند اندوسکوپی است و همچنین امکان دارد به رنگ‌آمیزی اختصاصی نیاز داشته باشد(۶).

یکی دیگر از راه‌های تشخیص کشت می‌باشد که شرایط بسیار ویژه‌ای را می‌طلبد و در صورت وجود مقاومت آنتی‌بیوتیکی ممکن است ضروری باشد و دارای حساسیتی معادل ۷۰ تا ۹۵٪ می‌باشد.با توجه به اینکه هلیکوباکتر مقادیر زیادی اوره‌آز می‌سازد یک روش ساده جهت کشف این باکتری آزمون سریع اوره‌آز می‌باشد(۷).

هدف از انجام این مطالعه تعیین ارزش روشهای تشخیص سریع (رنگ‌آمیزی اختصاصی و اوره‌آز تنفسی سریع) در مقایسه با یافته‌های پاتولوژی بیوپسی معده و در نهایت امکان تشخیص هلیکوباکتر در اتاق آندوسکوپی می‌باشد.

روش بررسی

در این مطالعه در فاصله زمانی ۱۳ ماه تعداد ۱۱۸ بیمار دارای علائم گوارشی که در دو بیمارستان حضرت رسول‌اکرم(ص) و شهدای هفتم تیر، تحت آندوسکوپی دستگاه گوارش فوقانی واقع شدند، مورد بررسی قرار گرفتند. از هر بیمار حداقل دو نمونه بیوپسی معده (آنترال) تهیه شد، که یکی جهت بررسی هیستوپاتولوژی و دیگری برای تست اوره‌آز سریع یک دقیقه‌ای مورد استفاده قرار گرفته است. نمونه اول در فرمالین ۱۰٪ ثابت (Fixed) شد و پس از Processing، دو لام از آنها تهیه شد، یکی برای رنگ‌آمیزی روتین هماتوکسیلین ـ ائوزین(H-E) و دیگری جهت رنگ‌آمیزی اختصاصی گیمسا مورد استفاده قرار گرفت. نمونه دوم جهت بررسی تولید اوره‌آز، بلافاصله در اتاق آندوسکوپی در محلول اوره‌آز قرار گرفت. این محلول حاوی ۱ سی‌سی محلول اوره W/V ۱۰٪ تازه تهیه شده و در آب دیونیزه (PH: ۶/۸) همراه با دو قطره فنل قرمز ۱٪ بوده است که در ظرفهای دربدار Eppenddort به حجم ۱/۵ سی‌سی قرار داشت و تغییر رنگ محلول از زرد به صورتی ـ بنفش در عرض یک دقیقه یا کمتر، بیانگر وجود هلیکوباکتر و عملکرد آنزیم اوره‌آز بود.

تمام اسلایدهایی که با روشهای (H-E)و گیمسا رنگ‌آمیزی شده بودند، با میکروسکوپ نوری و بزرگ‌نمایی

www.SID.ir

Archive of SID

۱۰۰۰ برابر، توسط پاتولوژیست مجرب، مورد مطالعه قرار گرفتند. مقاطع میکروسکوپی قبل از اینکه از نظر وجود باکتری شبیه هلیکوباکتر منفی گزارش شوند، حداقل ۷ دقیقه دقیقاً جستجو شده و ارزیابی تمامی آنها بدون اطلاع از نتایج آندوسکوپی با تست اوره‌آز و به صورت کاملاً کور (blind) بود. در نهایت، ۱۸ مورد به‌دلایل گوناگون از جمله ناکافی یا نامناسب بودن نمونه یا اثبات وجود بدخیمی در نمونه بیوپسی حذف شده و بررسی نهایی بر روی ۱۰۰ بیمار باقی‌مانده صورت گرفت.

در مطالعه اسلایدهایی که با (H-E)رنگ شده بودند، با در نظر گرفتن دستورالعمل Sydney system (۸،۹)، این پارامترها مورد توجه و ارزیابی قرار گرفته‌اند:

۱ – درجه‌بندی شدت عفونت با هلیکوباکتر که به ٦ درجه (۰ تا ٥) تقسیم شده است(٦a).

۲ – وجود و شدت انفیلتراسیون سلولهای تک هسته‌ای (لنفوسیت و Plasma cell) که مبین وجود گاستریت مزمن بوده‌اند.

۳ – وجود یا عدم وجود فولیکولهای لنفاوی

٤ – شدت حضور یا عدم وجود PMN و تهاجم غددی که مبین وجود گاستریت فعال بوده‌اند.

٥ – وجود یا عدم وجود erosion مخاطی، آتروفی غددی، متاپلازی روده‌ای و دیسپلازی سلولی.

در مطالعه اسلایدهایی که با گیمسا رنگ شده بودند، شدت عفونت با هلیکوباکتر (درجه ۰ تا٥) مد نظر بوده است. نتیجه تست اوره‌آز به صورت مثبت یا منفی بودن در نظر گرفتن شدت آن و احتساب حداکثر زمان ٦۰ ثانیه جهت تفسیر تست، در نظر گرفته شده است. در آنالیز نهایی، از آنجایی که بررسی درجه عفونت هلیکوباکتر در این مطالعه مد نظر نبوده است، تنها حضور یا عدم حضور باکتری (به صورت + یا –)ثبت شده است. از آنجایی که امکانات کشت باکتری در اختیار نبود، Gold standard در این مطالعه، رنگ‌آمیزی (H-E) در نظر گرفته شده است و رنگ‌آمیزی اختصاصی گیمسا و تست اوره‌آز، با توجه به نتایج حاصل از این روش در نرم‌افزارهای آماری EPI info مورد آنالیز قرار گرفته است. در آنالیز نتایج برای تعیین ارزش تشخیصی هر یک از تستها از شاخصهای حساسیت (sensitivity) ((Tp/(Tp+FN))، ویژگی (specificity) ((TN/(TN+Fp)) ارزش اخباری مثبت (positive Predictive Value) ((Tp/(Tp + Fp))، ارزش اخباری منفی (Negative Predictive Value) ((TN/(TN+ FN)) و نسبت درستنمایی مثبت و منفی (positive & Negative likelyhood ratio) به ترتیب با فرمولهای ((sen/(1-sp)) و ((1-sen)/sp)) و تست chi-squar استفاده گردید.

نتایج

در مجموع ۱۰۰ بیمار مورد مطالعه، توزیع جنسی به نسبت مساوی بوده ۵۰٪ افراد مورد پژوهش مرد و ۵۰٪ آنان زن بودند. به لحاظ سنی بیشترین تعداد مبتلایان در گروه سنی ۵۰ ـ ٤۰ سال قرار داشتند که ۳۰ مورد آن مؤنث ۲۲ مورد آن مذکر بودند.

جهت تعیین ارزش تشخیصی رنگ‌آمیزی گیمسا نتایج بدست آمده از این تست با روش مرجع این مطالعه که رنگ‌آمیزی(H-E) بود مقایسه گردید وحساسیت آن ۹۵/۹٪ (۹۸/۹٪ – ۸۷/۷٪) و ویژگی آن ٤٤/٤٪ (٦٤/٤٪ – ۲٦٪) بدست آمد همچنین ارزش اخباری مثبت (PPV) تست گیمسا در تشخیص هلیکوباکتر پیلوری ۸۲/٤٪(۸۹/٥٪– ۷۲/۲٪) و ارزش اخباری منفی (NPV) آن جهت تشخیص هلیکوباکتر پیلوری ۸۰٪ (۹٤/۷٪–٥۱/٤٪) محاسبه شد. همچین نسبت درستنمایی مثبت (pos.Likelyhood Ratio) گیمسا برای تشخیص هلیکوباکتر ۱/۷۱ محاسبه شد و نسبت درستنمایی منفی (NLR) آن برای تشخیص هلیکوباکتر ۰/۰۹ محاسبه گردید.

جهت تعیین ارزش تشخیصی تست اوره‌آز تنفسی سریع، نتایج بدست آمده از این تست با روش مرجع این مطالعه (رنگ‌آمیزی H-E) مقایسه گردید، که حساسیت آن ٦۹/۹٪(۷۹/۸٪ – ٥۷/۹٪) و ویژگی آن ۸٥/۲٪(۹٥/۱٪–٦٥/٤٪) بدست آمد. همچنین ارزش اخباری مثبت (PPV) تست اوره‌آز سریع در تشخیص هلیکوباکتر ۹۲/۷٪(۹۷/٦٪–۸۱/٦٪) و ارزش اخباری منفی آن (NPV)

www.SID.ir

Archive of SID

۵۱/۱٪(۶۶/۱٪-۳۶٪) محاسبه شد. نسبت درست‌نمایی مثبت (PLR) تست اوره‌آز سریع برای تشخیص هلیکوباکتر پیلوری ۴/۷ و نسبت درست‌نمایی منفی (NLR) آن ۰/۳۵ محاسبه گردید.

براساس معیارهای ذکر شده برای (H-E) در روش کار از مجموع ۱۰۰ نفر ۸۸ نفر دچار گاستریت مزمن بودند که از این تعداد ۶۸ نفر آنها دارای باکتری هلیکوباکتر پیلوری بوده‌اند و همچنین ۵۲ نفر از افراد مورد پژوهش مبتلا به گاستریت فعال بوده‌اند که از این تعداد ۴۷ نفر آنها (۹۰/۳٪) باکتری هلیکوباکتر پیلوری داشته‌اند و همچنین در ۴۹ نفر از افراد مورد پژوهش فولیکول لنفاوی دیده شد که از این تعداد، ۳۹ نفر (۷۹٪) دارای هلیکوباکتر پیلوری بودند. در دو گروه گاستریت مزمن و گاستریت فعال تعداد افراد واجد هلیکوباکتر و فاقد هلیکوباکتر اختلاف معنی‌داری داشتند در حالیکه در مورد فولیکول لنفاوی تعداد افراد واجد و فاقد هلیکوباکتر اختلاف آماری معنی‌داری نداشت(جدول ۱).

بحث

با توجه به نتایج بدست آمده در این تحقیق روش گیمسا در تشخیص هلیکوباکتر روشی حساس می‌باشد اما از ویژگی بالایی برخوردار نیست و این بدان معنی است که موراد منفی کاذب آن بسیار اندک می‌باشد و چنانچه نتیجه تست گیمسا منفی گردد احتمال عدم وجود هلیکوباکتر زیاد می‌باشدولی نتایج مثبت آن باید با تست مطمئن دیگری تأیید گردد. گرچه در این تحقیق ویژگی گیمسا پایین است(۴۴٪) اما در تحقیقات مشابه ویژگی در حد ۱۰۰-۹۷٪ گزارش گردیده است (۱۰،۶). پایین بودن ویژگی رنگ‌آمیزی گیمسا در این تحقیق بدین معناست که درصدی از موارد مثبت در رنگ‌آمیزی گیمسا با (H-E) به عنوان روش مرجع تأیید نشده‌اند که علت این امر می‌تواند استفاده ازرنگ‌آمیزی (H-E) به عنوان روش مرجع تشخیص در این مطالعه باشد. علیرغم‌اینکه "gold standard " برای تشخیص موارد مثبت و منفی هلیکوباکتر، کشت می‌باشد، در این مطالعه به دلیل محدودیت امکانات از روش (H-E) به عنوان روش جایگزین استفاده گردید و با توجه به کاستیهای این روش اختلاف میان ویژگی آن در این مطالعه ومطالعات دیگر قابل توجیه می‌باشد. اما تست اوره‌آز سریع براساس نتایج این تحقیق در تشخیص مبتلایان به عفونت هلیکوباکتر پیلوری خیلی حساس نیست یعنی موارد منفی کاذب (FN) آن نسبتاً زیاد است اما چون ویژگی آن مناسب است، موراد مثبت کاذب (FP) آن کم بوده و نتیجه مثبت آن اهمیت بیشتری دارد ولی چنانچه نتیجه تست اوره‌آز سریع منفی گردد باید با تست مطمئن دیگری آزمایش تکرار گردد. در مطالعات دیگر انجام یافته نیز مانند این مطالعه تست اوره‌آز سریع را به عنوان یک تست با ویژگی بالا معرفی کرده‌اند در واقع این تست مجموعاً بیشتر اختصاصی است تا حساس(۱۰،۱۱).تخریب محیط دراثرماندن بیش ازحد، نمونه‌گیری ناکافی ومصرف آنتی ـ بیوتیک ازدلایل ایجادمنفی کاذب(FN) می‌باشد(۱۱).

در یک نگاه کلی با توجه به بیشتر بودن PLR اوره‌آز سریع نسبت به گیمسا، تست اوره‌آز سریع بیشتر می‌تواند جهت اثبات وجود عفونت هلیکوباکتر به کار رود و با توجه به کمتر بودن NLR رنگ‌آمیزی گیمسا، این تست جهت رد (Rule out) بیماری کاربرد بیشتری دارد.

در کل می‌توان گفت که رنگ‌آمیزی گیمسا را می‌توان به عنوان وسیله‌ای در جهت رفع نیاز روزانه پذیرفت و تست اوره‌آز با توجه به ویژگی نسبتاً بالایی که دارد و سرعت تشخیص و تکنیک ساده آن و عدم نیاز به تکنسین مجرب، می‌توان در جهت تشخیص عفونت هلیکوباکتر بکار رود اما موارد منفی آن باید با روش مرجع مناسب کنترل گردد.

یافته پاتولوژی	تعداد موارد هلیکوباکتر مثبت	تعداد موراد بدون هلیکوباکتر	P Value
گاستریت مزمن	۶۸	۲۰	۰/۰۲
گاستریت فعال	۴۷	۵	۰/۰۰۰۴
فولیکول لنفاوی	۳۹	۱۰	۰/۱

جدول ۱- یافته‌های پاتولوژی بر حسب وجود یا عدم وجود هلیکوباکتر

www.SID.ir

Archive of SID

منابع

1-Dick, James, Helicobacter: A new Twist to An old Disease, Annual Rev. Microbiology, 1990; 44: 249-69

2-Laffeld R.J.L.F. "Presence of Helicobacter Pylori in patients with non–ulcer dyspepsia revealing normal antral histological characteristics", Digestion, 1990; 47: 29-34

3-Aska-m, Kimura-T, Kato-M et al "Possible role of helicobacter pylori infection in early gastric cancer development", Cancer, 1994; 73(11): 2691-94

4-Goossens-H., Glueczynski-Y., Burettle-A., et al, "Evaluation of a commercially available complement Fixation test for diagnosis of Helicobacter pylori Infection", Journal of clinical Micribiology, 1992; 30(12): 3230-3

5-Grawmill M, Harrison's principles of internal medicine, 14th ed., 1998

6-Madan-E., Kemp-S., Westblom-P et al, "Evalution of staining methods for identifying campilobacter pylori", A.J.C.P., 1988; 9(4):450-3

7-Westblom-B., Madan-E., Kemp-S. et al, "Evalution of a rapid urease test to detect campylobacter pylori infection", Journal of clinical microbiology, 1988; 26(7):1393-4

8-Dixon-MF, Genta-RM, Yardley-JH et al, "Classification and grading of gastritis, the updated sydneysystem", American Journal of surgical pathology, 1996,20(10):1161-81

9- Alhomsi – MF., Adeymi – EO "Grading helicobacter pylori gastritis in dyspeptic patients", Comp-Immunol-Microbiol-Infect-Dis, 1996: 19(2): 197-54

10-Simor-AF, "Camparison of four stains and urease test for rapid detection of helicobacter pylori in gastric biopsies", European Journal clin. Microbial. Infect. Dis., 1990;9:350-2.

11-Sleisenger MH., Fordtran JF. "Gastrointestinal disease: Pathology, diagnosis, management", 5th ed. Philadelphia, W.B. saunders, 1993,1:551-5

www.SID.ir