

بررسی و مقایسه حساسیت روش‌های شیمیایی رایج در تشخیص خون مخفی در مدفوع

چکیده

مدفوع غیرطبیعی دلیل مهمی برای بیماری‌های کولون است. خون‌ریزی مخفی که توسط یک آزمون جستجوی خون مخفی در مدفوع (Occult blood test) جهت پراکسیداز هموگلوبین تعیین می‌شود روشی مهم جهت شناسایی نئوپلاسم کولورکتال در مراحل اولیه و قابل درمان است. عدم مصرف مواد غذایی شامل گوشت قرمز و ماهی، سبزیجات، داروها به خصوص ویتامین C، ترکیبات آهن‌دار و داروهای ضدالتهابی غیراستروئیدی به مدت ۳ روز قبل از آزمایش ضروری است. روش‌های شیمیایی رایج برای آزمایش OB عبارتند از: روش میر (Meyer)، روش گایاک (Guaiac)، روش اوتولیدین (O-Tolidine)، روش الکل پیرامیدین (Alcohol pyrimidine) و کیت‌های تجارتي. اساس آزمایش در این روش‌ها، اکسید شدن کروموژن موجود در هر یک به دنبال اثر اکسیژن آزاد شده از اثر فعالیت پراکسیداز هموگلوبین روی پراکسید هیدروژن و ایجاد رنگ (واکنش مثبت) می‌باشد. به منظور بررسی و مقایسه حساسیت هر یک از روش‌های ذکر شده، خون در مقادیر مختلف به مدفوع اضافه شد که براساس نتایج به دست آمده حساس‌ترین روش، روش میر بود. این روش می‌تواند خون‌ریزی‌های پاتولوژیک دستگاه گوارش را در میزان ۱۰-۵ میلی‌لیتر شناسایی کند. بعد از این روش حساس‌ترین روش‌ها به ترتیب گایاک، الکل پیرامیدین و هماتیپ بوده‌اند. روش هماتیپ دارای حداقل حساسیت بوده و خون‌ریزی کمتر از ۸۱/۵ میلی‌لیتر در روز را نمی‌تواند تشخیص بدهد. هدف از انجام دادن این پژوهش ارزیابی تست‌های متداول شیمیایی در تشخیص خون مخفی در مدفوع و در نتیجه انتخاب و معرفی یک روش حساس و مناسب جهت آزمایشگاه‌های بالینی کشور بوده است.

*دکتر لامع اخلاقی I

دکتر هرمزد اورمزدی II

دکتر محسن فیروززای III

دکتر پدram صدر IV

کلیدواژه‌ها: ۱- خون مخفی در مدفوع ۲- حساسیت ۳- روش‌های شیمیایی

مقدمه

ایمونولوژیکی، روش آنتی‌گلوبین، روش فلوریمتری آزمون هماکانت را انتخاب کردند و به عنوان حساس‌ترین روش‌ها معرفی نمودند (۱). در سال ۱۹۹۶ Alison و همکاران تست خون مخفی در مدفوع را برای تشخیص سرطان‌های کولون

مطالعات زیادی در رابطه با تعیین حساسیت تست‌های تشخیص خون در مدفوع در نقاط مختلف دنیا انجام شده است به طوری که Alhqusit و همکاران در سال ۱۹۸۸ از میان آزمون‌های شیمیایی، تست گایاک (Guaiac)،

این مقاله خلاصه‌ای است از پایان نامه دکتر پدram صدر جهت دریافت درجه دکترای علوم آزمایشگاهی به راهنمایی دکتر لامع اخلاقی و مشاوره دکتر هرمزد اورمزدی و دکتر محسن فیروززای سال ۷۷-۱۳۷۶.

(I) استادیار گروه انگل‌شناسی، دانشکده پزشکی، بزرگراه همت، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی ایران (*مؤلف مسئول).

(II) استاد گروه انگل‌شناسی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی ایران.

(III) دانشیار گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، بزرگراه همت، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی ایران.

(IV) دکتری علوم آزمایشگاهی

دیورتیکولوزیس، آنژیودیسیپلازیا، زخم، التهاب، سرطان و پولیپ کولون، بیماری کرون (Crohn's Disease) و ... می‌باشد (۴).

ج - منشا خون مخفی از قسمت آخر لوله گوارش یا رکتوم است (Rectum): منشا این خون‌ریزی‌ها هموروئید، شقاق، فیشر، التهاب، پولیپ، سرطان رکتوم، یا خروج خون تازه از رکتوم (Hematochesia) و ... می‌باشد.

از مهم‌ترین علل خون مخفی می‌توان به ویروس‌ها، باکتری‌ها، انگل‌ها و برخی از داروها و ترکیبات التهاب‌آور اشاره کرد (۳).

با توجه به مطالب یاد شده، خون مخفی در مدفوع که یکی از نشانه‌های خون‌ریزی مداوم و مزمن از لوله گوارش است بدین شکل تعریف می‌شود: دفع خون از طریق مدفوع با مقادیر کم و به صورت ناپیدا که تنها با روش‌های حساس آزمایشگاهی قابل تشخیص است (۲).

در اغلب بیماری‌های ذکر شده، به خصوص بدخیمی‌های روده‌ای که با نشانگان خون مخفی در مدفوع همراه هستند، تشخیص زود هنگام از نظر پیش‌آگهی و درمان به موقع و عدم تحمیل هزینه‌های گزاف پاراکلینیکی و بیمارستانی به بیمار، از اهمیت زیادی برخوردار می‌باشد.

با توجه به اهمیت موضوع و هم‌چنین مسئولیتی که در امر نظارت بر امور آزمایشگاه‌ها وجود دارد بر آن شدیم تا با بررسی چگونگی انجام دادن تست OB در آزمایشگاه‌های تحت نظارت دانشگاه ایران، از دیدگاه پژوهشی، معرفی‌ها، کیت‌ها و روش‌های مورد استفاده، حساس‌ترین، دقیق‌ترین و مقرون به صرفه‌ترین آن‌ها را در شرایط کشوری انتخاب و به پزشکان و مسئولان آزمایشگاه معرفی کنیم تا در معاینات دوره‌ای بیماران به کار گرفته شود.

در سطح جهانی برای انجام دادن آزمایش خون مخفی در مدفوع از ۳ روش کلی روش‌های شیمیایی، ایمونولوژیکی و فلوریمتری استفاده می‌شود اما از آن جا که روش‌های شیمیایی آسان‌تر بوده و مواد آن بیشتر در دسترس است و اقتصادی نیز می‌باشد (۲)، در تمام آزمایشگاه‌های کشور به کار گرفته می‌شوند، همراه با رایج‌ترین کیت‌های تجارتي

مورد ارزیابی قرار دادند و حساسیت تست‌ها را ۵۴٪ و اختصاصی بودن آن‌ها را ۹۸٪ گزارش نمودند (۲). سایر محققان نیز در مورد اختصاصی بودن و حساسیت روش‌های تشخیص خون مخفی در مدفوع، پژوهش‌های زیادی را انجام دادند. با توجه به متداول بودن روش‌های شیمیایی تشخیص خون مخفی در مدفوع در آزمایشگاه‌های بالینی کشور و عدم حساسیت و اختصاصی بودن کیت‌های تجارتي، این مطالعه به منظور ارزیابی روش‌های شیمیایی که به طور سلیقه‌ای در آزمایشگاه‌های بالینی مورد استفاده قرار می‌گیرند، صورت گرفت. اهمیت آزمون خون مخفی مدفوع (Fecal Occult Blood=OB) در آزمایشگاه‌های تشخیص طبی، در آن است که بدانیم بیش از نیمی از سرطان‌هایی که انسان به آن مبتلا می‌شود (غیر از انواع پوستی) مربوط به لوله گوارش است (۱).

از این رو ضروری به نظر می‌رسد که به نشانگان‌های خون‌ریزی در لوله گوارش (Gastro Intestinal bleeding Syndromes) که به آزمایش OB نیازمند هستند و تقسیم‌بندی مختصر آن‌ها توجه شود. منشا خون در مدفوع می‌تواند از دهان تا رکتوم باشد که برحسب موارد و اهمیت می‌توان سراسر لوله گوارش را از نظر خون‌ریزی به ۳ بخش تقسیم‌بندی کرد (۳). این ۳ بخش عبارتند از: الف - منشا خون مخفی از قسمت بالای لوله گوارش است (Upper GI Tract=UGIT): در این بخش غیر از استفراغ خون (هماتمز=Hematemesis) که به صورت خروج خون تازه یا رگه‌های قهوه‌ای رنگ از دهان می‌باشد، منشا خون مخفی از UGIT گاهی در حدی زیاد است که موجب تیره رنگ شدن مدفوع (Tarry Stool) می‌گردد که به آن ملنا (Melena) گفته می‌شود.

منشا این خون‌ریزی‌ها ممکن است ضایعات دهان، بینی، مری، واریس، سرطان و التهاب مری، زخم معده، التهاب، سرطان معده، واریس این ناحیه و زخم اثنی‌عشر باشد.

ب - منشا خون مخفی از قسمت پایین لوله گوارش است (Lower GI Tract=LGIT): منشا این خون‌ریزی‌ها

موجود در این زمینه برای مطالعه حاضر مورد استفاده قرار گرفتند.

این مطالعه با توجه به اهمیت موضوع هدف پژوهشی در ارزیابی تست‌های متداول شیمیایی برای تشخیص خون مخفی در مدفوع انجام شد تا یک تست حساس و مناسب، انتخاب و به آزمایشگاه‌های بالینی کشور معرفی گردد.

روش بررسی

در این تحقیق که به صورت مقطعی و توصیفی به مدت ۱ سال و در مرکز تحقیقات علوم آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی ایران انجام شد، ۲ گروه از افراد بالغ، با سن متوسط ۴۰ سال بدون در نظر گرفتن جنسیت مورد مطالعه قرار گرفتند.

گروه اول (کنترل) شامل ۵۰ فرد سالم بود که به تشخیص پزشکان مشاور، فاقد ناهنجاری‌های قابل تشخیص لوله گوارش بودند.

گروه دوم شامل ۵۰ فرد بیمار بود که ۳۰ نفر از آن‌ها به تشخیص پزشکان نیاز به انجام دادن آزمایش خون مخفی داشتند و در ۲۰ نفر دیگر به علت احتمال وجود ناهنجاری‌های کولورکتال تست OB درخواست شده بود تا در صورت مثبت بودن، از طریق آندوسکوپی و تصویر برداری مورد بررسی بیشتری قرار گیرند.

به هر یک از افراد ۲ گروه ۳ لیوان پلاستیکی ۱ بار مصرف رایج برای نمونه‌گیری مدفوع همراه با آپلیکاتور مربوطه، بدون هر گونه آلودگی تحویل داده شد تا در ۳ نوبت جداگانه در هفته از مدفوع صبحگاهی خود نمونه برداری کنند و خیلی سریع به آزمایشگاه تحویل دهند تا شماره‌گذاری شده و مشخصات ظاهری هر نمونه از نظر خون واضح ثبت گردد.

به تمام افراد توصیه شده بود که ۳ روز قبل از آغاز نمونه‌گیری از غذاها و داروهای حاوی یون آهن و ویتامین C و آنتی‌اکسیدان‌ها استفاده نکنند. همچنین به آن‌ها گفته شد تا در هنگام نمونه‌برداری مدفوع، با آب، ادرار و دیگر

مواد خارجی احتمالی آمیخته نشود تا از اثر عوامل مداخله‌گر در آزمایش جلوگیری به عمل آید.

اگر چه اغلب نمونه‌های مدفوع پس از دریافت در مدت ۲ ساعت مورد آزمایش قرار می‌گرفتند، در موارد نادر که انجام دادن سریع آزمایش امکان‌پذیر نبود، نمونه‌ها در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در یخچال نگهداری می‌شدند تا در اولین فرصت مورد آزمایش قرار گیرند.

ذکر این نکته لازم است که تست OB را می‌توان تا ۶ روز پس از جمع‌آوری نمونه‌های مدفوع انجام داد به شرط آن که در این مدت نمونه‌ها در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در یخچال نگهداری شوند.

همان‌طور که قبلاً اشاره شد هدف از آزمایش خون مخفی با معرف‌های شیمیایی، ارزیابی کیفی فعالیت پراکسیداز هموگلوبین برای خون نامریی در مدفوع است (۵).

مکانیسم کار این معرف‌ها تغییر رنگ ترکیبات شیمیایی کروموژن توسط پراکسیداز خون مدفوع است. بدین ترتیب که با اضافه کردن هیدروژن پراکسید (H₂O₂) به نمونه مدفوع، در صورت وجود خون، آنزیم پراکسیداز آن سبب تجزیه هیدروژن پراکسید و آزاد شدن اکسیژن نوزاد می‌شود که با اضافه کردن معرف‌های شیمیایی کروموژن اکسید شونده (معرف‌های میر، گایاک، الکل پیرامیدین، اوتولیدین و کیت‌ها) اکسید می‌گردند و تغییر رنگ (معمولاً آبی تا ارغوانی) ایجاد می‌شود.

شدت تغییر رنگ رابطه مستقیم با فعالیت آنزیم پراکسیداز یا مقدار خون در مدفوع دارد که شدت آن از صفر، +۱ تا +۴ نشان داده شده است.

اگر در نمونه مدفوع خون نباشد یا مقدار آن در حدی نباشد که بتوان پراکسیداز آن را اندازه‌گیری نمود، شدت صفر و اگر تغییر رنگ مختصر باشد Trace در نظر گرفته می‌شد و تغییر رنگ‌های غلیظ بر حسب غلظت به روش ذکر شده گزارش می‌گردید.

یون آهن موجود در هم (Heme) هموگلوبین نقش کاتالیزور تشدید کننده دارد.

بدین منظور با در نظر گرفتن این که در افراد سالم روزانه در حدود ۲۰۰-۱۰۰ گرم مدفوع با ۲-۳ میلی لیتر خون دفع می شود، این مقدار خون معادل ۲-۳ میلی گرم هموگلوبین به ازای هر گرم مدفوع است. پراکسیداز موجود در این مقدار هموگلوبین قادر به تغییر رنگ معرفها و کیت های یاد شده نمی باشد.

با کسب تجربه از طریق اضافه کردن خون تدریجی به مدفوع های OB منفی و محاسبه مقدار هموگلوبین در هر گرم از مدفوع معادلات زیر به دست آمد:

۱۵۰ میلی گرم در دسی لیتر Hb = ۱ میلی لیتر خون مخفی،

۱۵ میلی گرم در دسی لیتر Hb = ۰/۱ میلی لیتر خون مخفی،
۱/۵ میلی گرم در دسی لیتر Hb = ۰/۰۱ میلی لیتر خون مخفی،

۰/۵ میلی گرم Hb → ۱ گرم مدفوع در شرایط طبیعی.

۴ گرم Hb = ۱/۵ میلی گرم Hb در مدفوع + ۲/۵ میلی گرم Hb = ۰/۰۱ میلی لیتر خون + ۱ گرم مدفوع سالم.

همان طور که در معادله فوق مشاهده می شود به ازای هر ۰/۰۱ میلی لیتر خون تازه که به هر گرم مدفوع سالم اضافه شود، مقدار هموگلوبین آن به ۴ میلی گرم در هر گرم مدفوع می رسد. بدین ترتیب با افزودن ۰/۰۲ میلی لیتر خون به هر گرم مدفوع و در واقع معادل ۳ میلی گرم هموگلوبین و با احتساب وجود ۲/۵ میلی گرم هموگلوبین مقدار آن به ۵/۵ میلی گرم هموگلوبین در هر گرم از مدفوع می رسد. رعایت این محاسبه برای تعیین آستانه تغییر رنگ و محاسبه درصد حساسیت معرفها و کیتها از اهمیت زیادی برخوردار می باشد.

خصوصیات خون انسانی مورد استفاده علاوه بر تازه بودن عبارت بود از: ۱۵ میلی گرم در دسی لیتر هموگلوبین، ۴۵٪ هماتوکریت، ۶-۵/۵ میلی متر مکعب = شمارش RBC.

در عمل و در رابطه با هر معرف ابتدا با ترازو ۱ گرم مدفوع کشیده شده سپس ۰/۰۱ میلی لیتر خون با شرایط

با توجه به این که ترکیبات آهن دار سبب افزایش فعالیت پراکسیداز و ویتامین C و آنتی اکسیدانها از طریق ممانعت و کند نمودن فرآیند اکسیداسیون و احیا می شوند پاسخ منفی کاذب ایجاد می کنند بنابراین سعی شد تا از حضور عوامل مداخله گر ذکر شده در نمونه های مدفوع جلوگیری به عمل آید.

مکانیسم عمل آنزیم پراکسیداز در هموگلوبین در مدفوع به طور خلاصه عبارت است: هموگلوبین + H₂O₂ ← آب + اکسیژن نوزاد. معرف کروموژن بی رنگ + اکسیژن نوزاد ← کروموژن اکسید شده رنگی آب (معمولاً آبی تا ارغوانی رنگ).

در این پژوهش کنترل منفی شامل مدفوع گروه سالم بود که در ۳ نوبت آزمایش با معرف های شیمیایی و کیت تجارتي، OB آنها منفی بوده است.

کنترل مثبت شامل مدفوع های OB منفی بود که با اضافه کردن خون با رقت های مختلف، OB آنها مثبت شده بود.

در مسیر آزمایشها با قراردادن یک لوله حاوی ۱ میلی لیتر آب مقطر به عنوان کنترل منفی و یک لوله حاوی ۱ میلی لیتر آب مقطر و خون نشانگر کنترل مثبت، آزمایشها کنترل می گردید.

در آزمایشگاه های تابعه دانشگاه های علوم پزشکی از معرف های شیمیایی میر (Meyer)، الکل پیرامیدین، اوتولیدین، گایاک و کیت های تجارتي برای تشخیص خون مخفی در مدفوع استفاده می شود.

میزان شدت یا ضعف در تغییر رنگ توسط این معرفها معیار گزارش آزمایشگاهها و اقدام پزشک برای درمان بیماران می باشد.

برای مشخص کردن این که کدام یک از معرف های یاد شده و کیتها در کمترین غلظت خون مخفی بیشترین حساسیت را از طریق تغییر رنگ دارد، اقدام به تهیه استاندارد تجربی شد.

پیرامیدین و کیت‌های تجارتي موجود، به طور کلی ۱۱۶۰۰ آزمایش OB انجام شد.

در هر گروه ۵۰ نفر تحت مطالعه قرار گرفتند.

از ۵۰ نفر گروه بیمار، ۳۰ نفر از آنها بیمارانی بودند که پزشک برای معاینات دوره‌ای (Check up) درخواست تست OB کرده بود و در ۲۰ نفر دیگر به علت مشکوک بودن به ضایعات کولون و رکتوم تست OB درخواست شده بود و برای پی‌گیری روش‌های آندوسکوپی و تصویربرداری نیز مورد استفاده قرار گرفته بود.

در جدول و نمودار شماره ۱ درصد حساسیت معرف‌های ذکر شده و آستانه تغییر رنگ آن‌ها با اضافه کردن خون دستی (غلظت‌های مختلف هموگلوبین) نشان داده شده است.

جدول شماره ۱- درصد حساسیت و نتایج کیفی تست OB با ۵۰ نمونه مدفوع افراد سالم OB منفی که با اضافه نمودن خون دستی تازه، غلظت هموگلوبین آن‌ها افزوده شده و موجب تغییر رنگ معرف‌ها شده بود.

معرف‌ها غلظت هموگلوبین (میلی‌گرم/درصد)	میر	گایاک	اتولیدین	الکل	کیت پیرامیدین
۱/۵	۰	۰	۰	۰	۰
۳	۴۰	۲۰	۳	۰	۰
۶	۹۰	۵۰	۳۵	۲۰	۰
۷/۵	۱۰۰	۶۵	۶۰	۵۵	۰
۹	۱۰۰	۸۸	۸۸	۸۸	۰
۱۲	۱۰۰	۹۲	۱۰۰	۹۰	۰
۴۹/۵	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰

همان طور که در جدول شماره ۱ مشاهده می‌شود آستانه تغییر رنگ و درصد حساسیت معرف‌ها به ترتیب عبارت بودند از: میر در حداقل ۳ میلی‌گرم در دسی‌لیتر هموگلوبین، تا ۴۰٪، گایاک در این غلظت ۲۰٪ و الکل پیرامیدین و کیت‌ها نیز فاقد حساسیت بودند (۰٪).

ذکر شده به آن اضافه و به هم زده می‌شد تا نمونه یکنواختی به دست آید.

با هر یک از معرف‌ها و کیت‌ها و این نمونه مدفوع تست OB انجام می‌شد و حساسیت یا عدم حساسیت هر یک از آن‌ها ثبت می‌گردید. سپس عمل اضافه کردن خون در حدی ادامه می‌یافت تا درصد حساسیت در مورد هر یک از معرف‌ها به دست آید.

با هر معرف ۲ تست یکی در لوله و دیگری روی کاغذ واتمن انجام می‌شد. البته تست روی تیغه شیشه‌ای (اسلاید) نیز گهگاه صورت می‌گرفت اما از آن جا که روش لوله و کاغذ معمول‌تر است، روش اسلاید پی‌گیری نشد.

تست OB با روش لوله: مقداری از مدفوع به اندازه یک نخود با ۵ میلی‌لیتر آب مقطر در یک لوله آزمایش به صورت هموژن در آورده می‌شد سپس ۲-۳ قطره از معرف کروموژن، ۲-۳ قطره از اسید استیک گلاسیال، ۲-۳ قطره آب اکسیژنه تازه ۱٪ به آن اضافه می‌گردید و پس از مخلوط شدن با آپلیکاتور چوبی بزرگ، بروز تغییر رنگ پس از ۶۰ تا ۹۰ ثانیه ثبت می‌شد.

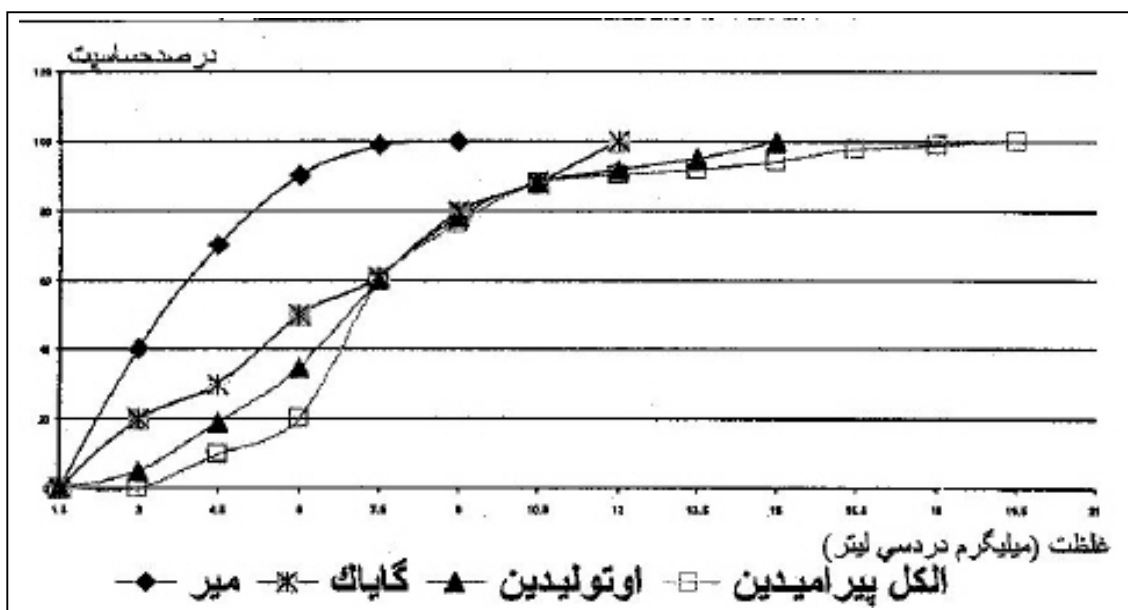
کیت‌ها طبق راهنمای کارخانه سازنده آن‌ها مورد استفاده قرار می‌گرفتند.

- تست OB با روش کاغذ: ابتدا از سوسپانسیون تهیه شده از مدفوع با روش فوق ۱-۲ قطره برداشته شده و روی کاغذ واتمن ریخته می‌شد سپس با ترتیب ذکر شده یک قطره از معرف، اسید استیک و آب اکسیژنه اضافه می‌گردید و نتیجه پس از ۶۰ تا ۹۰ ثانیه ثبت می‌شد.

ذکر این نکته لازم است که در روش استفاده از معرف میر نیازی به اضافه کردن اسید استیک نمی‌باشد.

نتایج

در بررسی نتایج OB در مدفوع ۲ گروه سالم و بیمار با به کارگیری ۴ معرف شیمیایی، میر، گایاک، اتولیدین، الکل



نمودار شماره ۱- بررسی مقایسه‌ای درصد حساسیت ۴ معرف شیمیایی میر، گایاک، اوتولیدین و الکل پیرامیدین نسبت به غلظت‌های مختلف هموگلوبین

از ۲۰ نفر بیمار مشکوک به ناهنجاری‌های کولون و رکتوم، ۳ نفر از آن‌ها در تست OB با معرف میر و ۲ نفر از این ۳ نفر با سایر تست‌ها و کیت مثبت بودند که در پی‌گیری از طریق آندوسکوپی و تصویربرداری ۳ بیماری که با تست میر، OB مثبت بودند دیورتیکولوزیس مشاهده شد.

با استفاده از آزمون آماری کای دو، معرف‌های شیمیایی و در راس آن‌ها معرف میر از نظر حساسیت نسبت به کیت به طور چشم‌گیری ($P=0/05$) متمایز بودند و حساسیت سایر معرف‌ها به ترتیب عبارت بود از:

میر ← گایاک ← اوتولیدین ← الکل پیرامیدین ← کیت (نمودار شماره ۲).

اگر چه اختلاف معنی‌داری در نتایج تست OB با ۲ روش لوله و کاغذ واتمن مشاهده نشد، تست در لوله دقیق‌تر، شفاف‌تر و در قضاوت نمودن و پاسخ‌گویی مشخص‌تر بود.

در غلظت ۷/۵ میلی‌گرم در دسی‌لیتر هموگلوبین در مدفوع تنها معرف میر ۱۰۰٪ حساسیت نشان داد و گایاک، اوتولیدین و الکل پیرامیدین در ردیف‌های بعد قرار گرفتند.

باید به این نکته اشاره کرد که کیت‌ها در این غلظت نیز فاقد حساسیت بودند.

در غلظت ۴۹ میلی‌گرم در دسی‌لیتر هموگلوبین، تمام معرف‌ها و از جمله کیت‌ها دارای حساسیت ۱۰۰٪ بودند.

چهار معرف شیمیایی حداکثر تا غلظت ۱۲ میلی‌گرم در دسی‌لیتر حساسیت کامل (۱۰۰٪) را نشان دادند.

نتایج مقایسه‌ای واکنش معرف‌ها و کیت‌ها نسبت به نمونه‌های مدفوع افراد سالم (کنترل) و بیمار در جدول شماره ۲ نشان داده شده است.

با توجه به این که قضاوت در تغییر رنگ معرف‌ها کیفی بوده است، شدت این تغییر رنگ با (+) و از ۱+ تا ۴+ نشان داده شده است.

جدول شماره ۲- نتایج مقایسه‌ای تست OB با معرف‌ها و کیت‌ها با نمونه‌های مدفوع گروه‌های بیمار و سالم (کنترل)

گروه	معرف‌ها	میر	گایاک	اوتولیدین	الکل پیرامیدین	کیت
سالم	۵۰	-	-	-	-	-
بیمار	۵۰	%۲۰++	%۱۵++	%۱۰++	%۱۰++	%۲++

که در آزمایش OB با روش‌های شیمیایی و تشخیص کیفی قابل تشخیص نمی‌باشد اما در صورت وجود خون روی گوارشی مزمن و مستمر که مقدار هموگلوبین دفع شده بیش از حد طبیعی باشد قابل تشخیص است (۶).

در بین معرف‌های شیمیایی رایج یا کیت‌های تجارتي تشخیص OB، معرف یا کیتی که بتواند خون‌ریزی بیش از ۱۰-۵ میلی‌لیتر یا ۱۰-۵ میلی‌گرم هموگلوبین را در هر گرم از مدفوع مشخص کند، دارای حساسیت و ویژگی بسیار خوبی است.

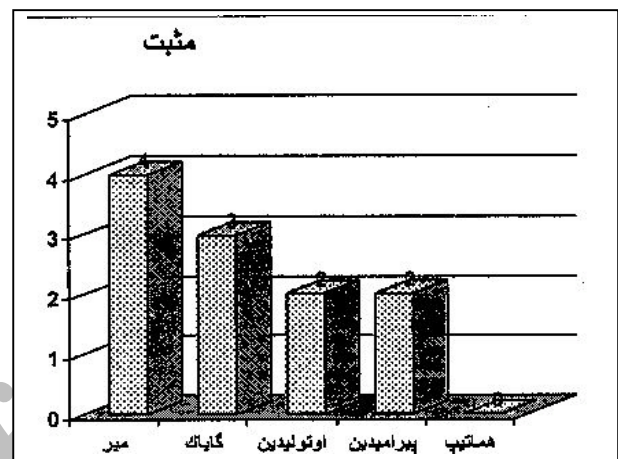
این تعریف در مواردی که بیمار در مراحل اولیه و بدون علامت (Asymptomatic) بدخیمی‌های قسمت پایین لوله گوارش به خصوص کولون و رکتوم می‌باشد، دارای اهمیت است (۲).

در این مطالعه از ۲۰ بیماری که پزشکان از نظر وجود ناهنجاری‌های کولون و رکتوم برای آن‌ها تست OB درخواست کرده بودند، ۳ نفر تست OB مثبت داشتند که این ۳ بیمار در آندوسکوپی و در روش‌های تصویربرداری نیز مثبت بودند.

این یافته با سایر گزارش‌ها که تست OB را به طریق ایمونولوژیکی انجام داده بودند هم‌خوانی دارد (۵). هم چنین این یافته‌ها دلیلی بر این ادعا هستند که صحت و دقت روش‌های تشخیص OB به روش شیمیایی با روش‌های ایمونولوژیکی مطابقت دارد (۲).

از عمده‌ترین اهداف این پژوهش تعیین درصد حساسیت و توانایی تشخیص هر یک از معرف‌های به کار گرفته شده بود.

همان طور که در جدول‌های شماره ۱ و ۲ دیده می‌شود معرف شیمیایی میر قادر است میزان ۶ میلی‌گرم هموگلوبین



نمودار شماره ۲- نتایج آزمون جست‌وجوی خون مخفی در مدفوع به صورت نمودار نرده‌ای روی ۳۰ نفر از گروه بیمار با ۵ روش شیمیایی، میر، گایاک،

بحث

نتایج حاصل از این پژوهش که برای اولین بار به این شکل مورد مطالعه قرار گرفته است، نشان دهنده آن بود که جست و جوی خون مخفی در مدفوع (OB) در افرادی که از سوی پزشک برای آن‌ها این آزمایش درخواست می‌شود، چنانچه در آزمایشگاه به طور صحیح و با یک معرف حساس و با رعایت دقیق رژیم غذایی و دارویی توسط بیمار انجام شود، نتایج حاصل از آن کم‌تر از نتایج آندوسکوپی و تصویربرداری نیست. هم چنین تست OB از نظر هزینه بسیار مقرون به صرفه بوده و از نظر اجرا ساده و سریع می‌باشد.

همان طور که قبلاً ذکر شد یک انسان بالغ در حالت سلامت روزانه ۲-۳ میلی‌لیتر خون با ۱۰۰-۲۰۰ گرم مدفوع دفع می‌کند که با محاسبات انجام شده به طور میانگین هر گرم از این مدفوع حاوی ۲-۳ میلی‌گرم هموگلوبین می‌باشد

با توجه به حساسیت معرفهای شیمیایی به یون آهن در تست OB ضروری است تا پزشکان از بیماران خود بخواهند از ۳ روز قبل از مراجعه به آزمایشگاه، رژیمهای غذایی و دارویی را رعایت نمایند.

از آن جا که ویتامین C و آنتی اکسیدانتها تاثیر وقفه‌ای در فعل و انفعالات شیمیایی تست OB ایجاد می‌کنند و موجب پیدایش پاسخ منفی کاذب می‌شوند، باید به طور جدی بیماران را نسبت به پرهیز از این گونه داروها و غذاها آگاه نمود.

با توجه به این که آزمایشهای OB با روشهای ایمونولوژیکی و فلوریمتری مزیت خاصی نسبت به روشهای شیمیایی ندارند (۲ و ۴) و از سوی دیگر در کشور ما امکان استفاده از معرفهای شیمیایی عملی‌تر است، انجام دادن آن به آزمایشگاهها توصیه می‌شود. در این زمینه معرف میر نسبت به سایر معرفها ترجیح داده می‌شود، به خصوص با درصد حساسیت نزدیک به ۱۰۰٪ و مواد تشکیل دهنده آن که فاقد اثر سرطان زایی می‌باشد.

در به کار گیری معرفهای شیمیایی باید کوشش شود تا مواد ترکیب کننده آنها در حد امکان خالص باشد و از کارخانه‌های معتبر تهیه گردد و در تهیه آنها به تاریخ انقضا توجه شود. بهتر است تا هر معرف هر ۶ ماه ۱ بار ساخته شود و در دوران تاریخ اعتبار، در یخچال و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردد.

با توجه به این که آب اکسیژنه تازه در تست OB نقش اساسی دارد، در تهیه و نگهداری آن اقدامات موثر و لازم باید به کار گرفته شود تا در حین آزمایش از بروز پاسخهای کاذب جلوگیری گردد. از این رو کنترل کیفی روزانه آب اکسیژنه و قرار دادن کنترل‌های مثبت و منفی در مسیر آزمایشهای روزانه ضروری می‌باشد.

برای کارکنان آزمایشگاه در صورت استفاده از معرفهای شیمیایی دیگر، غیر از آن چه که در این پژوهش به کار گرفته شده است، این نکته ضروری می‌باشد تا قبل از مصرف به درصد حساسیت و ویژگی آنها توجه کرده و

به بالا را در هر گرم از مدفوع از ۹۰ تا ۱۰۰٪ جست‌وجو نماید در حالی که این غلظت برای معرفهای گایاک، اوتولیدین و الکل پیرامیدین از ۹ میلی‌گرم به بالا است و برای کیت‌های تجارتي در صورتی که ۴۹/۵ میلی‌گرم هموگلوبین در هر گرم مدفوع وجود داشته باشد تا ۱۰۰٪ می‌توانند تشخیص دهنده باشند.

بدین ترتیب حساس‌ترین معرفها میر و ضعیف‌ترین آنها همراه با پاسخهای کاذب مثبت و منفی کیت‌های تجارتي بودند.

معرف گایاک ساخت کارخانه مرک آلمان (Merk) را می‌توان در ردیف معرف میر یا بعد از آن در نظر گرفت و معرفهای اوتولیدین و الکل پیرامیدین از نظر حساسیت و دقت در ردیف گایاک قرار دارند.

این معرفها می‌توانند از میزان ۹ میلی‌گرم هموگلوبین در هر گرم مدفوع را از ۸۰ تا ۹۰٪ و از ۱۲ میلی‌گرم به بالا را تا ۱۰۰٪ تشخیص دهند.

با توجه به این که در تهیه کیتها اصول فنی لازم و نیز مواد اولیه استاندارد استفاده نمی‌شود، کارایی قابل انتظار را نداشته و نیاز به ارتقای حساسیت دارند (۴). با وجود این در تشخیص دیورتیکولوزیس، پولیپ‌های آدنوماتوز و بدخیمی‌های قسمت پایین لوله گوارش تا ۸۰٪، تشخیصی هستند.

چنانچه مقدار خون روی از ۴۹/۵ میلی‌لیتر در هر گرم مدفوع بیش‌تر باشد تا ۱۰۰٪ می‌توانند تشخیص دهنده باشند (۷).

با توجه به نتایج این پژوهش می‌توان نتیجه‌گیری کرد که لازم است تا پزشکان در معاینات دوره‌ای از بیماران خود (Check up) به خصوص افراد ۵۰ سال به بالا و بیمارانی که مشکوک به آنمی‌های هیپوکرومیک ناشی از خون‌روی‌های مزمن یا اولسر پپتیک و بیماری‌های نئوپلاستیک لوله گوارش هستند، تست OB را ۳ بار در هفته درخواست نمایند تا در صورت مثبت بودن اقدامات موثر و به موقع صورت گیرد.

مطمئن شوند که برای کارکنان بی‌زیان است و سلامتی آنها را تهدید نمی‌کند.

منابع

- 1- Alhquist DA., Schwartz S., Isaacson J., Elletson M. A stool collection devices the first step in occult blood testing, *Ann Intern Med*, 1988 Apr, 108(4): 609-12.
- 2- Allison JB., Takawa IS., Ransom LJ., Adrian AL. A comparison of fecal occult blood tests for colorectal-cancer screening, *N Engl J Med*, 1996, 334: 155-159.
- 3- Henry JB. Clinical diagnosis and management by laboratory methods. 18 th ed, NewYork, Saunders, 1991, PP: 542-44.
- 4- Gilberston VA., McHugh RB., Schuman LM., Williams SE. The early detection of colorectal cancers: preliminary report of results of the occult blood study, *Cancer*, 1980, 45: 2899-2902.
- 5- Gopalswamy N., Stelling HP. A comparative study of eight fecal blood tests and hemoquant in patient in whom colonoscopy in indicated, *Am Fam Med*, 1994, 3: 1043-1048.
- 6- Levin B., Hess K., Johnson C. Screening for colorectal cancer, a comparison of 3 fecal occult blood tests, *Arch Intern Med*, 1997, 12(57): 970-976.
- 7- Jacques W. Interpretation of diagnostic tests, th ed, New York, Little, Brown, 1992, P: 154.

Study and Comparison of Sensitivity Rates among Current Chemical Methods for Detecting Occult Blood in Stool

^I
***L. Akhlaghi, Ph.D.** ^{II}
H. Ourmazdi, Ph.D. ^{III}
M. Firooz Rai, Ph.D.
^{IV}
P. Sadr, Ph.D.

Abstract

Any abnormality in stool compounds can be an indication of colon disfunction or diseases. Occult bleeding which is determined by means of occult blood test (peroxidase activity) is the most valuable diagnostic test for primary stage of colorectal neoplasia which can be fully prevented. Considering dietary precautions, foods such as red meat, fish, vegetables, vitamin C and iron containing anti-inflammatory non-steroidal drugs should not be consumed at least three days prior to doing the test. Common techniques for conducting the occult blood test are the Meyer, Guaiac, O-Tolidine, Pyrimidine alcohol methods and a few commercial kits such as Hematape. The principle behind all of these methods are the oxidation of the chromogen reagents, by O₂ released of H₂O₂ due to the peroxidase activity present in RBC hemoglobin with the subsequent induction of color. In order to determine the sensitivity of each of these methods, blood was added in different amounts to human stool samples. The Meyer method was found to be the most sensitive way of conducting the occult blood test and it can detect pathologic bleeding of GI tract within the range of 5-10ml of bleeding per day. The other methods, in terms of their relative sensitivity were: the Guaiac method, O-Tolidine method, Pyrimidine alcohol and Hematape, respectively. Hematape kit showed the least sensitivity and it can detect bleeding less than 81.5ml per day. The main purpose of conducting this study was to determine conventional occult blood tests (OB tests) and choose the best one in order to be presented and introduced to clinical pathology laboratories in all over the country.

Key Words: 1) Occult Blood 2) Sensitivity 3) Chemical Methods

This article is a summary of the thesis by P. Sadr, for Ph.D. degree in Laboratory Sciences under supervision of L. Akhlaghi, Ph.D. and H. Ourmazdi, Ph.D. and M. Firooz Rai, Ph.D., 1997-1998.

I) Assistant Professor of Parasitology. Faculty of Medicine. Iran University of medical Sciences and Health Services. Tehran, Iran (*Corresponding Author).

II) Professor of Parasitology. Iran University of medical Sciences and Health Services. Tehran, Iran.

III) Associate Professor of Biochemistry. Faculty of Medicine. Iran University of Medical Sciences and Health Services. Tehran, Iran.

IV) Ph.D. in Laboratory Sciences.