حساسیت و ویژگی آزمون اوره آز سریع در تشخیص عفونت های هلیکوباکتر پیلوری

نویسندگان:
دکتر رضا قوطاسلو*، استادیار گروه میکروب شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز
دکتر بهرام کاظمی ، استادیار گروه بیولوژی مولکولی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
دکتر فرانسیس مگرو، استاد میکروب شناسی دانشگاه بوردو فرانسه , رئیس مرکز مطالعات هلیکوباکتر
دکتر حسین الیاسی ، دانشیار گروه بیماریهای گوارش و کبد دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
دکتر احد زرگری زاده ، استادیار گروه میکروب شناسی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
دکتر محمد رخشان ، استاد پاتولوژی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
دکتر حسین گودرزی، دانشیار گروه میکروب شناسی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

چکیده :

مقدمه : هلیکو باکتر پیلوری یک ارگانیزم گرم منفی مارپیچی شکل است. این باکتری عامل گاستریت مزمن و پپتیک اولسر است و نقش مهمی در ایجاد سرطان معده و لنفوم معده دارد. شیوع عفونت های هلیکو باکتر پیلوری در ایران از نظر سرواپیدمیولوژی ۹۰٪ می باشد، پس تشخیص دقیق و درمان آن اهمیت فراوانی دارد. روش مرسوم در اکثر مراکز آندوسکوپی کشور برای تشخیص عفونت هلیکوباکتر، آزمون اوره از نمونه بیوپسی معده می باشد. هدف اصلی این تحقیق مقایسه آزمون اوره آز با پاتولوژی و آزمون واکنش زنجیره پلی مراز (PCR)می باشد.

مواد وروش تحقیق : تعداد ۱۰۰ بیماریکه با ناراحتی گوارشی در طی ۹ ماه به درمانگاه گوارش بیمارستان طالقانی تهران مراجعه و داوطلب آندوسکوپی بودند بعنوان جامعه مورد مطالعه انتخاب شد. با کمک آندوسکوپی ۳ نمونه بافتی از معده بیماران تهیه و برای بررسی حضور عفونت هلیکوباکتر پیلوری، تحت بررسی با آزمونهای اوره آز نمونه بیوپسی معده و پاتولوژی و آزمون واکنش زنجیره پلی مراز قرار گرفتند. محیط آبگوشت معمولی برای آزمون اوره آز انتخاب شدند. این آزمون بر اساس فعالیت آنزیم اوره آز می باشد. نمونه بیوپسی معده وارد محیط اوره شده و براساس تغییر رنگ محیط از صورتی به ارغوانی مثبت تلقی می شد. در این مطالعه آزمون پاتولوژی، استاندارد طلایی درنظرگرفته شده است . پرایمر مورد نیاز برای PCR قطعهٔ 294bp از ژن Ure-C بود.

یافته ها : نتایج نشان داد که آزمون اوره آز دارای ۶۶/۶ ٪ حساسیت و ۶۹/۷٪ ویژگی می باشد. هم چنین روش آزمون واکنش زنجیره پلی مراز دارای ۹۸/۶٪ حساسیت و ۹۳٪ ویژگی است. چنانچه ملاحظه می شود تفاوت مشخصی بین ویژگی و حساسیت آزمون اوره آز و آزمون واکنش زنجیره پلی مراز وجود دارد و کارایی آزمون اوره آز در تشخیص عفونت های هلیکوباکتر پیلوری پائین است.

نتیجه گیری : این تحقیق نشان داد که آزمون اوره آز، روش حساس و قابل قبولی برای تشخیص عفونت های هلیکوباکتر نمی باشد. به دلیل حساسیت و ویژگی و کارایی پائین آزمون اوره آز، نمی توان آنرا به تنهایی در تشخیص عفونت هلیکوباکتر بکار برد و انجام آزمونهای دیگر همراه با آن توصیه می شود.

واژهای کلیدی : هلیکوباکتر پیلوری- آزمون اوره آز- آزمون واکنش زنجیره پلی مراز

---

* **نویسنده اصلی ، آدرس : تبریز دانشگاه علوم پزشکی تبریز-صندوق پستی ۳۷۹ -۵۱۶۶۵**
تلفن:۰۴۱۱۳۳۷۰۱۵۳

تاریخ دریافت : تاریخ پذیرش:

مقدمه :

تا قبل از دهه اخیر تصور بر این بود که عامل گاستریت، اختلالات ترشحی اسید، عادات غذایی، مصرف دخانیات، عوامل محیطی، استرس و غیره است. محققین فکر می کردند محیط معده بدلیل PH پائین و آنزیم پروتئولیتیک استریل است. برای اولین بار در سال ۱۹۸۳ مارشال و وارن ثابت کردند که می توان ارگانیزم های مارپیچی شکلی را در محیط معده انسان جدا کرد(۱). برای اثبات رابطه میان هلیکوباکتر و گاستریت نظریه کخ را ثابت کردند و با انجام آندوسکوپی و بیوپسی از دیواره معده، موفق به جدا کردن باکتری شدند و در نهایت با استفاده از آنتی بیوتیک، بیماری زخم معده را درمان کردند. امروزه عفونت هلیکوباکترپیلوری شایعترین عامل عفونتهای مزمن دستگاه گوارش در کل جهان محسوب می شود. عفونتهای ناشی از آن معمولا با التهاب مخاط معده همراه است و حدود ۱۰ درصد این افراد دارای زخم معده یا دوازدهه هستند(۲). از نظر میکروبشناسی هلیکوباکتر پیلوری یک نوع باکتری گرم منفی، خمیده است که ۴-۸ عدد فلاژل داشته و متحرک می باشد.

امروزه این باکتری بعنوان عامل گاستریت، زخم معده، زخم دوازدهه ، لنفوم و سرطان معده شناخته شده است. تشخیص سریع و قطعی منجر به درمان موفق به کمک آنتی بیوتیکها می گردد. بنابراین تشخیص و درمان این بیماران حائز اهمیت فراوانی است (۳). روشهای مختلفی برای تشخیص عفونتهای هلیکوباکتر وجود دارد و کلا به دوگروه تقسیم میشود :

۱ – غیر تهاجمی : مانند آزمون اوره آز تنفسی ، سرولوژی

۲- تهاجمی(با کمک آندوسکوپی) : مانند هیستوپاتولوژی ، کشت ، تست اوره آز سریع ، آزمون واکنش زنجیره ای پلی مزار(PCR)[1].

مواد وروش تحقیق:

این مطالعه در طول سالهای ۸۰-۱۳۷۹ با همکاری بخش گوارش بیمارستان آیت الله طالقانی تهران و گروه میکروبیولوژی، پاتولوژی ، بیولوژی مولکولی دانشگاه شهید بهشتی انجام شد.در این تحقیق ابتدا بیماران توسط متخصصین گوارش معاینه می شدند و در صورت داوطلب شدن برای آندوسکوپی در این مطالعه قرار می گرفتند. اکثر این بیماران دیس پپسی داشتند. جامعه مورد مطالعه تعداد ۱۰۰ بیماری بود که در مدت ۹ ماه بصورت مستمر وارد مطالعه می گردیدند. هیچگونه محدودیت سنی و جنسی مطرح نشده بود. در این مطالعه افرادیکه سابقه مصرف داروهای ضد اسید (مانند امپرازول، بیسموت و ..) و مصرف آنتی بیوتیک داشتند از مطالعه خارج شد ند . ابتدا برای تمام بیماران پرسشنامه ای تهیه می شد. سپس توسط متخصص گوارش بیماران مورد نظر آندوسکوپی می گردیدند. در حین آندوسکوپی از هر بیمار ۳ تکه نمونه بیوپسی معده تهیه می شد. نمونه اول در داخل لوله حاوی محیط اوره استریل انداخته می شد و در صورت تغییر رنگ از صورتی به ارغوانی مثبت تلقی می شد. این آزمون در بخش آندوسکوپی انجام می پذیرفت. در اکثر بیماران جواب آزمون ظرف کمتر از یکساعت مشخص می شد.

نمونه دوم داخل لوله حاوی بافر فرمالین ۱۰٪ گذاشته می شد و به بخش پاتولوژی دانشکده پزشکی فرستاده می شد. متخصص پاتولوژی مربوطه آنرا توسط میکروتوم برش داده و رنگ آمیزی بافتی H&E* و یا گیمسا انجام می داد.

نمونه سوم داخل لوله اپندورف حاوی آب مقطر استریل گذاشته شده و به بخش میکروبشناسی ملکولی منتقل و در یخچال فریزر ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری می شد. سپس توسط بافرلیز، مولکولهای DNA آن استخراج و آزمون PCR طبق رفرانس انجام می شد (۵و ۹) .

در زمان نمونه گیری پس از هر بار نمونه گیری لوله آندوسکوپی و پنس بیوپسی با مایع ضد عفونی کننده شستشو میشد , تا از انتقال آلودگی و امکان نتایج مثبت کاذب جلوگیری بعمل آید. داده های جمع آوری شده با استفاده از روشهای آمار توصیفی (در صد ها و نسبت ها- شاخص های اعتبار و اعتماد) و نرم افزار SPSS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

یافته ها :

پاتولوژیست تعداد ۷۰ نمونه از ۱۰۰ بیمار را براساس آمار نمونه های بیوپسی معده، گاستریت مزمن و تعداد ۲۵ بیمار را مبتلا به گاستریت مزمن فعال و هم چنین ۳ بیمار را با تغییرات بدخیمی و ۲ نفر را نرمال گزارش کرد. از مجموع ۱۰۰ نفر۵۷ نفر (۵۷٪) در آزمون پاتولوژی هلیکوباکتر پیلوری مثبت و ۴۳ نفر (۴۳٪) منفی بودند. از آنجائیکه در این مطالعه پاتولوژی استاندارد طلایی می باشد این ۴۳ نفر گروه شاهد محسوب می شوند. پاسخ اوره آز بیوپسی معده در ۵۱ نفر مثبت و در ۴۹ نفر منفی بود. از ۵۷ نفرکه پاتولوژی مثبت داشتند تعداد ۳۸ نفر اوره آز مثبت و ۱۹ نفر اوره آز منفی بودند. از ۴۳ نفر گروه شاهد تعداد ۳۰ نفر اوره آز منفی و ۱۳ نفر اوره آز مثبت بودند. (جدول ۱)

---

* هماتوکسیلین وائوزین

1-ploymerasechair reaction(pcr)

جدول ۱ : نتایج حاصل از پاتولوژی و اوره آز

اوره آز / پاتولوژی	مثبت	منفی	جمع
مثبت	۳۸	۱۹	۵۷
منفی	۱۳	۳۰	۴۳
جمع کل	۵۱	۴۹	۱۰۰

جدول ۲ : نتایج آزمونها و جدول معنی داری

		ا عتبار				اعتماد			جدول معنی داری	
استاندارد	تست	حساسیت	ویژگی	PPV	NPV	کارایی	Po^+	Po^-	کاپا	P_V
پاتولوژی	PCR	۹۸/۶	۹۲/۷	۹۴/۷	۹۸	۹۶/۱	۹۴/۷	۹۸	۰/۹۲	۰/۰۰۰
پاتولوژی	UT	۶۶/۶	۶۹/۷	۷۴	۶۱	۶۸	۲۲/۹	۱۸/۴	۰/۳۰۸	۰/۰۰۰
PCR	UT	۶۴/۵	۶۵/۴	۷۳/۱	۵۵/۷	۶۴/۸	۵۲/۱	۴۳	۰/۲۹۱	۰/۰۰۱

تست اوره آز =UT **ارزش اخباری منفی = NPV** **ارزش اخباری مثبت = PPV**

استحکام منفی = -Po **استحکام مثبت = +Po**

بحث :

امروزه روشهای زیادی برای تشخیص و بررسی هلیکوباکتر وجود دارد و از نظر اکثر محققین روش آندوسکوپی و بیوپسی معده علیرغم تهاجمی بودن و هزینه بالا روش استاندارد تشخیص می باشد. برای اولین بار لانگبرگ و همکارانش گزارش کردند که H.pylori مقادیر زیادی آنزیم اوره آز دارد(۴) نقش اصلی این آنزیم محافظت باکتری در برابر اسید معده است و هم چنین خاصیت کموتاکتیک دارد (۵). بعدها این خصوصیت برای تشخیص هلیکوباکتر بکار برده شد و محققان زیادی روی این آزمون کار کرده و آنرا تغییر دادند.

در ایران در اکثر مراکز آندوسکوپی آزمون اوره آز نمونه بیوپسی معده بعنوان تنها معیار تشخیص عفونت های هلیکوباکتر بکار برده می شود. حساسیت و ویژگی آن بهم مرتبط است و هر دو به زمان بستگی دارد. اگر آزمایش در عرض کمتر از یکساعت انجام شود، ویژگی خیلی خوب اما حساسیت آن کم خواهد بود(۳). هر چه زمان بگذرد خصوصاً بعد از ۲۴ ساعت حساسیت آن افزایش و ویژگی آن کاهش پیدا خواهد کرد. حساسیت آزمون اورهآز بستگی به تعداد باکتریهای موجود در نمونه بیوپسی نیز دارد و حدود ده هزار ارگانیزم برای مثبت شدن ضروری است. به همین دلیل این آزمون برای موارد بعد از درمان مناسب نیست و چهار هفته پس از درمان انجام آزمون توصیه می شود(۶). اگر آزمایش اوره آز در کمتر از یکساعت و قبل از درمان داروئی صورت گیرد حساسیت آن ۸۵–۷۵٪ می باشد. این آزمون در عمل، حساسیت خیلی پائینی داشته و نمی توان آنرا به تنهایی برای تشخیص عفونتهای هلیکوباکتر بکار برد. در موارد منفی انجام آزمونهای دیگر تشخیصی ضروری است(۳). آزمون اوره آز علیرغم سادگی کار و سرعت بالا و هزینه کم متاسفانه در این مطالعه حساسیت و ویژگی پائینی داشت (حساسیت ۶۶/۶ ٪ ویژگی ۶۹/۷٪)..نتایج این تحقیق با مطالعات مگرو ,ویلیامز , ویس و حاذقی کاملا همخوانی دارد(۱۰و۹و۸و۳). برای افزایش حساسیت آزمون اوره آز چه کارهایی می توان انجام داد؟

۱- بهتر است حداقل دو بیوپسی از بیماران اخذ گردد تا شانس مثبت شدن بیشتر شود (۷).

۲- آزمون در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد صورت گیرد(دمای مطلوب آنزیم اوره آز ۳۷ سانتی گراد است). (۸)

۳- توصیه می شود در همان محلی که آندوسکوپی صورت می گیرد آزمون اوره آز انجام شود.

بطور کلی آزمون اوره آز روشی سریع، آسان و ارزانی است ولی یک آزمون تهاجمی محسوب می شود, چون برای بدست آوردن نمونه حتما باید بیوپسی صورت گیرد(۸و۳) . باکتریهای اوره آز مثبت دیگری نیز وجود دارند(مانند کلبسیلا ، پروتئوس و ...) که این امر از ویژگی تست اوره آز می کاهد .بنابر این مثبت شدن تست اوره آز ،همیشه نمی تواند نشانگر هلیکوباکتر باشد .

دلیل پایین بودن حساسیت اوره آز شاید مصرف دارو باشد چون نتیجه آزمون وابستگی زیادی به تعداد باکتریهای موجود در نمونه بیوپسی معده دارد و برای یک پاسخ مبثت وجود حداقل ده هزار سلول باکتری ضروری است. در صورت مصرف آنتی بیوتیک ها و حتی آنتی اسیدها پاسخ منفی کاذب خواهیم داشت. مصرف آنتی بیوتیک طی دو هفته قبل از آندوسکوپی و درمان ضد هلیکوباکتر پیلوری در منفی شدن تست اوره آز موثر می باشد .

کیفیت نمونه ارسالی شاید دلیل احتمالی دیگری برای کاهش حساسیت و ویژگی آزمون اوره آز باشد. بعبارتی کیفیت نمونه بیوپسی فرستاده شده به پاتولوژی و PCR بهتر از نمونه مورد استفاده برای اوره آز بود.شاید نمونه برداری در حین آندوسکوپی از دو محل مختلف از معده انجام شده است. بدلیل توزیع تکه تکه (Patchy) و پراکندگی میکروب در مخاط معده ممکن است دو نمونه بیوپسی از دو محل متفاوت صورت گرفته باشد، به عبارتی یکی حاوی باکتری و دیگری فاقد باکتری باشد. احتمال این موضوع ضعیف است چون حساسیت و ویژگی آزمون PCR که در همان شرایط انجام شده است، بالا است. دلیل اصلی پائین بودن حساسیت آزمون اوره آز در این مطالعه ماهیت خود آزمون می باشد.

چون حساسیت روش پاتولوژی و PCR بالاست این دو روش توانایی تشخیص تعداد کم باکتری را دارند ولی آزمون اوره آز به دلیل حساسیت پائین قادر به تشخیص تعداد کم باکتری نیست.

نتیجه گیری :

از آنجائیکه این مطالعه نشان داد که آزمون اوره آز حساسیت و ویژگی، ارزش اخباری مثبت و منفی، استحکام مثبت و منفی (شاخص های اعتماد و اعتبار) پائینی دارد، پس نمی توان آنرا به تنهایی در تشخیص عفونت هلیکوباکتر پیلوری بکار برد.($P_v=0$) این یافته در مطالعات قبلی در ایران و خارج از کشور هم گزارش شده است (۳و۸و۹و۱۱).

متاسفانه هم اکنون در اکثر مراکز آندوسکوپی کشور آزمون اوره آز به تنهایی برای تشخیص عفونتهای هلیکوباکتر پیلوری استفاده می شود. با توجه به شیوع بالای عفونت های هلیکوباکتر در ایران و نقش اساسی این عفونت در بیماریزایی پپتیک اولسر ، لنفوم و سرطان معده، لزوم بازنگری روشهای تشخیصی هلیکوباکتر در ایران شدیداً احساس می شود. در خاتمه باید به پزشکان محترم تاکید کرد که تنها بر اساس آزمون اوره آز نمی توان پی به وجود یا عدم وجود عفونتهای هلیکوباکتر برد و انجام روشهای دیگر تشخیصی همزمان با آزمون اوره آز توصیه می شود.

تقدیر و تشکر :

بدینوسیله از آقای عبدالصمد صفاتیان ,متخصص آمار که ما را در انجام این تحقیق یاری فرمودند تقدیروتشکرمی شود .

References :

1. Marshal BJ , Warren JR . Unidentified curved Bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration .The Lancet: 1984 ; 1: 1311- 14.
2. Hentscheel E , Brandstatter G , Dragosics B , Hirschl AM , Nemec H , Schutze K, et al . Effect of Ranitidine and Amoxicillin plus Metronidazole on the eradication of Helicobacter pylori and the recurrence of duodenal ulcer. NEJM 1993 : 328 ;(5) : 308-312 .
3. Megraud F. Advantages and disadvantages of current diagnostic tests for the detection of Helicobacter pylori. Scand J Gastroenterol 1996 : 31; (suppl 215) : 57 – 62 .
4. Riegg SJ, Dunn BE, Blaser MJ. Microbiology and pathogenesis of Helicobacter pylori. In : Blaser MJ, smith PD, Ravdin JI, Greenberg HB, Guerrant RL: Infection of Gastrointestinal tract. First ed. New York : Raven press: 1995; 535-50.
5. Nakamura H , Yoshiyama H , Takeuchi H , Mizote T . Okita k , Nakazawa T. Urease plays an important role in the chemotactic motility of Helicobacter pylori in a viscous environment . Infec Immun 1998 : 66; (10) : 4832-37.
6. Gusmao VRD. Mendes EN , Queiroz DM , Rocha GA , Rocha AMC , Ashour AAR , et al . Vac A genotype in Helicobacter pylori strains isolated from children with and without duodenal ulcer in Brazil . J clin Microbiol 2000: 38; (8) : 2853 – 57 .
7. Mcnulty CAM . Dent JC , Uff JS , Gear MWL ,Wilkinson SP. Detection of campylobacter pylori by the biopsy urease test : an assessment in 1445 patients . Gut 1989 :30 ; 1058-62.
8. Williams CL . Helicobacter pylori : Bacteriology and Laboratory diagnosis .J Infection : 1997 ; 34: 1-5 .
9. Weiss J , Mecca J , Silva ED , Gassener D. Comparison of PCR and other diagnostic techniques for detection of Helicobacter pylori infection in dyspeptic patients. J clin microbiol: 1994 ; 32 (7) : 1663- 68.
10. Labigne A , Cussac V, Courcoux P. Shuttle cloning and nucleotide sequences of Helicobacter pylori genes responsible for urease activity . J Bacteriology: 1991 ; 173 (6): 1920-31.

۱۱. حاذقی ک ، فاضلی ع، علیمحمدی ح. جدا سازی و تشخیص هلیکوباکتر پیلوری از نمونه های بیوپسی بیماران مبتلا به ضایعات دستگاه گـوارش فوقـانی در اصـفهان . مجلـه دانشکده پزشکی اصفهان: ۱۳۷۵؛ سال ۱۴ ، شماره ۴۴ : صفحات ۲۵-۳۳ .

Value of Urease Test in the detection of Helicobacter pylori infections

Gottaslou R . (Ph.D)
Kazemi B.(Ph.D)
Megraud F. (Ph.D)
Eliasi H. (MD)
Zargarizadeh A .(Ph.D)
Rakhshan M.MD
Goodarzi H.(Ph.D)

Astract:

Introduction: H. pylori is microaerophilic, garm negative, spiral organism with 4-6 flagella. The bacterium is an etiologic agent for chronic gastritis and plays a major role in effecting peptic ulcer, gastric cancer, lymphoma. H. pylori infection has a high seroprevalence in Iran (> 90%). Thus diagnosis and treatment of H.pylori infection is very important.

Material and Methods : The presence of H. pylori infection was determined in 100 patients undergoing upper gastrointestinal endoscopy over 9 month period. The presence of H. pyolri was detcted in gastric mucosal biopsy specimens by Biopsy Urease Test, PCR and histopathology. A media was used for urease test, Normal Broth Urea. The biopsy is placed in a broth containing urea and a PH indicator. The goldstandard is histopathology examination. We designed a PCR for amplifying the H. pylori gene encoding ure C (294 bp).

Results : The results of urease test were 66.6% sensitivity and 69.7% specefity. The results of PCR assay were 98.6% sensitivity and 93% specifity. There was a significant difference between the specifity and sensitivity of urease test and PCR.

Conclusion : The result of This study showed that urease test was not a sensitive and specific method for accurate detection of the infection. It a level of the sensitivity is too low to be used as the sole method of detection in ordinary practic. In this situation other/ tests should be used.

Key Words : Helicobacter pylori, Urease test, Polymerase chain reaction (PCR)