ارزیابی کارآیی آزمون ایمونوفلورسانس غیرمستقیم در تشخیص ناراحتی‌های گوارشی ناشی از هلیکوباکترپیلوری

دکتر نادر علیپور قربانی، عضو هیأت علمی گروه میکروبشناسی انستیتوپاستور ایران
دکتر عبدالفتاح صراف نژاد، استادیار گروه ایمونولوژی دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران
دکتر اکبر میرصالحیان، استادیار و مدیرگروه میکروبشناسی دانشکده پزشکی،دانشگاه علوم پزشکی تهران
دکتر رضا ملک‌زاده، استاد و مدیر گروه گاستروانترولوژی بیمارستان شریعتی، دانشگاه علوم پزشکی تهران
دکتر زهره جدلی ، عضو هیأت علمی گروه ایمونولوژی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران
دکتر قربانعلی بهزادیان، استادیار و مدیر گروه میکروبشناسی دانشگاه تربیت مدرس
دکتر مرتضی ستاری، استادیار گروه میکروبشناسی دانشگاه تربیت مدرس

Evaluation of Indirect Immunofloresance (IFA) in Detection of Gastric Disorders Due to H.Pylori Infection

ABSTRACT

Helicobacter pylori (H.pylori) is the most common human infection in the world. This agent has a strong role in pathogenesis of chronic gastritis and peptic ulcers. Therefore introducing of simple and cost effective and non invasive tests are important for diagnosis of H.pylori infections.

In this study 215 patients suffering from different gastrointestinal disorders referred to GI endoscopy department of Dr. Ali Shariati Hospital were selected as case and another 50 as control group, which were evaluated for H.pylori infection. Direct smear (staining with Giemsa) and urease tests were used as gold standard tests compared with IFA-IgG and culture.

Sensitivity and specificity and accuracy for IFA were 94%, 86% and 90%, respectively.

Absorption with campylobacter jejoni did not change the level of IgG against H.pylori.

Negativity of urease test does not show the eradication or absence of bacteria, but shows the low number of bacteria in biopsy materials.

This report suggests that IFA is an advantagous, sensitive and reliable test in diagnosis of H.pylori infection.

Key Words: Helicobacter Pylori; IFA; Peptic ulcer serological diagnosis

چکیده

هلیکوباکتر پیلوری میکروارگانیسمی است که بعنوان یکی از عوامل اتیولوژیک ناراحتیهای دستگاه گوارش نظیر زخمهای معده و دوازدهه و گاستریتهای مزمن در دهه اخیر مطرح شده است. با توجه به شیوع بالایی که این بیماریها در جامعه دارند، معرفی روش‌های تشخیصی آسان، کم‌هزینه و غیرتهاجمی که در عین حال از حساسیت و کارآیی کافی هم برخوردار باشند، ضروری بنظر می‌رسد.

بهمین دلیل مطالعه‌ای بر روی ۲۱۵ نفر از بیماران مراجعه کننده به بخش آندوسکوپی بیمارستان دکتر علی شریعتی و ۵۰ نفر داوطلب سالم که آزمون تنفسی آنها منفی بود، انجام گرفت. پس از بررسی‌های اولیه و آندوسکوپی از بیماران، جهت انجام آزمایش‌های میکروبشناسی، بافت‌شناسی و سرولوژی نمونه بیوپسی و خون تهیه گردید.

در این مطالعه، روش ایمونوفلورسانس غیرمستقیم جهت

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-10-04]

تشخیص بیماری، اجرا و راه‌اندازی شد و با روش رنگ‌آمیزی گیمسا و اوره‌آز بعنوان روشهای استاندارد، مورد مقایسه قرار گرفته است. در این تحقیق حساسیت، ویژگی و دقت ایمونوفلورسانس غیرمستقیم به ترتیب ۹۴٪ ، ۸۶٪، ۹۰٪ محاسبه شده است. ضمناً روش کشت باکتری از نمونه‌های بیوپسی شده نیز با روشهای فوق مورد مقایسه قرار گرفته است.

همچنین با توجه به گزارشاتی که در مورد احتمال وجود واکنش متقاطع بین کمپیلوباکتر ژژونی (فلور نرمال طیور) و هلیکوباکترپیلوری در دست می‌باشد، بخش دیگری از مطالعه حاضر، به آزمون جذب آنتی‌بادیهای غیراختصاصی توسط کمپیلوباکترژژونی اختصاص داده شد و نتایج حاصله نشان داد که قبل و بعد از جذب، تغییر محسوسی در تیتر آنتی‌بادی برعلیه هلیکوباکترپیلوری بوجود نمی‌آید. به این ترتیب بنظر می‌رسد که روش ایمونوفلورسانس غیرمستقیم یک روش غیرتهاجمی با ارزش، حساس، سریع و مناسب در تشخیص عفونت هلیکوباکترپیلوری می‌باشد.

ضمناً مشخص گردید که منفی بودن جواب آزمون اوره‌آز سریع نشانهٔ ریشه‌کنی یا نبود باکتری در نمونه‌های بیوپسی نمی‌باشد، بلکه در اکثر موارد مؤید مقدار اندک باکتری در نمونه بیوپسی می‌باشد که توسط آزمون اوره‌آز قابل ردیابی نمی‌باشد.

واژه‌های کلیدی : هلیکوباکترپیلوری؛ تشخیص سرولوژیک زخمهای معده و اثنی‌عشر؛ ایمونوفلورسانس غیرمستقیم

مقدمه

اختلالات دستگاه گوارش از جمله بیماریهایی است، که بشر سالیان متمادی از آن رنج برده است و تا مدتها علت آن ناشناخته باقی مانده بود. زمانی علت سوءهاضمه و ناراحتی‌های مربوط به معده و اثنی‌عشر را، سایکوسوماتیک می‌دانستند و به درمان عصبی بیماران مبادرت می‌کردند. گاهی توسط داروهای آنتی‌اسید و H_2 بلوکر به درمان معلولی اقدام می‌کردند، تا اینکه در سال ۱۹۸۳ هلیکوباکترپیلوری بعنوان یکی از عوامل اتیولوژیک این نوع از ناراحتیها توسط مارشال شناسایی شد و اصول کخ در مورد آن باثبات رسید(۱۶). به این ترتیب استراتژی درمان این گونه عوارض و ناراحتی‌ها چهره جدیدی بخود گرفت، بنحوی که امروزه، با درمان ضدمیکروبی به مداوای اینگونه بیماران می‌پردازند(۲،۴،۵).

تشخیص عفونت ناشی از هلیکوباکترپیلوری امروزه به دو روش تهاجمی و غیرتهاجمی صورت می‌گیرد. روشهای تهاجمی بر آندوسکوپی و نمونه‌برداری از نسج معده مبتنی است. از آنجایی که انجام آندوسکوپی برای بیمار ناراحت‌کننده بوده و امکان سرایت بیماری توسط وسایل مورد استفاده نیز وجود دارد، لذا امروزه روشهای غیرتهاجمی نظیر آزمون تنفسی با اوره نشاندار و آزمونهای سرولوژیک نیز بکار گرفته می‌شوند(۴،۵،۶).

به جهت خطرات ناشی از مواد رادیواکتیو و گرانقیمت بودن، روش اوره نشاندار در حال حاضر بطور محدودی مورد بهره‌برداری قرار می‌گیرد و روشهای سرولوژی بدلیل سرعت، دقت عمل و پائین بودن هزینه انجام آن مورد توجه بیشتری قرار گرفته است(۱۲).

از بین آزمونهای مختلف سرولوژی (الایزا، ایمونوفلورسانس، ثبوت مکمل و ...) که برای تشخیص این عفونت بکار گرفته می‌شود. آزمون الایزا[1] و IFA[2] به لحاظ حساسیت و ویژگی بالا بصورت گسترده‌تری مورد استفاده قرار می‌گیرند(۱۲).

برای انجام آزمون الایزا می‌توان از سه دسته آنتی‌ژن استفاده کرد که شامل آنتی‌ژن خام (نظیر کل پیکر باکتری یا باکتری سونیکه شده) یا آنتی‌ژن نسبتاً خالص (نظیر آنتی‌ژنهای استخراج شده از اسید و گلیسین و آنتی‌ژنهای پایدار در برابر حرارت) و آنتی‌ژنهای خالص (نظیر پروتئین ۱۲۰ کیلودالتونی یا اوره‌آز باکتری و ...) می‌باشد که سازندگان کیت‌های تشخیصی بترتیب با نامهای کیت‌های نسل اول، دوم و سوم از آنها یاد می‌کنند(۱۲) و برای انجام IFA از پیکرهٔ کامل باکتری استفاده می‌شود.

با توجه به گزارشات متعددی که در مورد حساسیت و ویژگی بالای آزمون IFA در دسترس می‌باشد(۱۲،۱۴،۱۵)، تحقیق حاضر بمنظور ارزیابی کارآیی این آزمون سرولوژیک در مقایسه با روشهای کشت، اوره‌آز آزمایش هیستولوژی نمونه نسج بیوپسی با رنگ‌آمیزی گیمسا انجام گرفت.

روش و مواد

شامل محیط ترانسپورت Campythio (تیوگلیکولات + ۰/۱۶ درصد آگار)، محیط کشت کلمبیا آگار به همراه ۱۰٪ خون گوسفند و مکمل‌های انتخابی شامل آنتی‌بیوتیکهای وانکومایسین،

1- Eliza

2- Immuno Flouresance Assay

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-10-04]

تری‌متوپریم، سفالکسین و پلی‌میکسین.

محیط اوره براث کریستنسن، محیط نیترات، معرفهای اکسیداز ـ کاتالاز ـ دیسکهای ۳۰ میکروگرمی سفالوتین و نالیدیکسیک اسید، grinder جهت خرد کردن نسوج و آزاد کردن باکتری، انکوباتور CO_2 (یا جارو گاز یک C میکروآئروفیل مرک) مواد مصرفی در امر تهیه لام مستقیم و رنگ‌آمیزی گیمسا، بلودومتیلن و گرم.

مواد لازم جهت آزمون ایمونوفلورسانس

کونژوگه FITC[1] Anti-IgG ساخت کارخانه DAKO با شماره کاتالوگ Code No FO202، بافر مونته پس از حل کردن ۲۸/۴ گرم Na_2HPO_4 (دی‌سدیم مونوهیدروژن فسفات) در آب مقطر حجم محلول را به یک لیتر رسانده و pH آن در حد ۹ تنظیم می‌شود. یک حجم از محلول فوق را با ۹ حجم گلیسیرین مخلوط نموده و جهت شفاف‌تر شدن واکنش و چسباندن لام و لامل به همدیگر مورد استفاده قرار می‌گیرد. این محلول که توسط CDC امریکا توصیه شده است کمک شایانی به تشخیص وجود یا عدم وجود واکنش در رقتهای بالا، به فرد آزمایش کننده می‌نماید و چنانکه ذکر نموده‌اند ماکزیمم تحریک (excitation) فلوروسئین در pH = ۸/۵-۹ صورت می‌پذیرد. اکثر آزمایشگاهها از این مسأله بی‌اطلاع می‌باشند و با PBS دارای pH=۷/۲ این کار را انجام می‌دهند(۱۸).

بافر فسفات نمکی ۰/۱۵ مولار (PBS) با pH = ۷/۲ : ۱/۱۵ گرم فسفات دی‌سدیک Na_2HPO_4 و ۰/۲ گرم دی‌هیدروژن مونوپتاسیک فسفات (KH_2PO_4) و ۸ گرم کلرید سرم (NaCl) و ۰/۲ گرم کلرید پتاسیم (KCl) را در آب مقطر حل نموده و حجم محلول به یک لیتر رسانده می‌شود. pH محلول را در ۷/۲ تنظیم می‌نماییم.

محلول اوانس بلو آب مقطر، اطاقک مرطوب، سرمهای کنترل مثبت و کنترل منفی ـ لامهای ۱۲ خانه بهرینگ جهت آزمایش ایمونوفلورسانس.

آنتی‌ژن آزمون ایمونوفلورسانس : آنتی‌ژن مورد نیاز جهت این آزمون مطابق روش فاد و همکاران(۱۴) با رقت ۶۰ باکتری در هر میدان میکروسکوپی با درشت‌نمایی ۴۰ تهیه و میزان ۱۰ μl از این آنتی‌ژن روی لام مخصوص برده شده پس از خشک شدن مورد استفاده قرار گرفت و یا در فریزر ۲۰- تا زمان استفاده نگهداری شد.

شاهدان سالم : بدلیل عدم همکاری افراد سالم جهت اندوسکوپی و نیز معرفی آزمون تنفسی بعنوان یک آزمون استاندارد در جهان(۱۲،۶)، سرم ۵۰ نفر از افراد داوطلبی که از نظر بالینی سالم بوده و آزمون تنفسی همگی آنها منفی بوده بعنوان سرمهای شاهد جهت مقایسه و تعیین تیتر بیماران و راه‌اندازی آزمون مورد استفاده قرار گرفت.

بیماران : ۲۱۵ نفر بیمار با ناراحتیهای مختلف معدی ـ روده‌ای (جدول ۱) مورد بررسی آندوسکوپی قرار گرفتند. بمنظور مقایسه نتایج کشت، سرولوژی میکروبشناسی درتشخیص عفونت هلیکوبکترپیلوری، دو نمونه بیوپسی از آنتروم معده (که محل اصلی کلونیزاسیون باکتری در دستگاه گوارش می‌باشد) و ۵ ml نمونه خون گرفته شد. نمونه اول به محیط ترانسپورت campythio جهت کشت باکتری انتقال یافت و نمونه دوم بمنظور آزمایش اوره‌آز سریع در محیط حاوی اوره‌کریستنسن قرارگرفت. خون بیماران مذکور نیز پس از لخته شدن، سانتریفوژ و سرم آن جهت آزمایش ایمونوفلورسانس در فریزر ۲۰- °C نگهداری شد.

جهت کشت باکتری نمونه بیوپسی موجود در محیط تیوگلیکولات توسط grinder به شیرابه یکنواختی تبدیل و در محیط کشت جامد کلمبیا آگار حاوی ۱۰٪ خون گوسفند و ۰/۱ درصد ملح تترازولیوم و آنتی‌بیوتیکهای وانکومایسین، آمفوتریسین B تری متوپریم و پلی‌میکسین (بمنظور حذف فلور نرمال دهان) کشت داده شد و به مدت ۵-۳ روز در شرایط میکروآئروفیل در انکوباتور ۳۷ °C و یا جارباگازپک C میکروآئروفیل همراه با رطوبت نسبی ۱۰٪ قرار داده می‌شد. پس از این مدت در صورت وجود کلنی‌های شفاف شبنمی، که در مجاورت املاح تترازولیوم منظره طلایی رنگ بخود می‌گرفت، مراحل بعدی که شامل انجام آزمایشات کاتالاز، اکسیداز، اوره‌آز، احیا نیترات، حساسیت به نالیدیکسیک اسید و سفالوتین و هیدرولیز هیپورات و احیا نیترات بود، در مورد کلنی‌های مورد نظر انجام می‌شد(۱۴،۲،۱).

برای انجام آزمون ایمونوفلورسانس، رقتهای مختلفی از سرم بیماران و افراد شاهد را با آنتی‌ژن مجاور نموده و پس از انکوباسیون درگرمخانه ۳۷ °C (در اتاقک مرطوب) با بافر PBS شستشو داده می‌شد. بعد از خشک کردن لامها رقت مناسب کونژوگه Anti-IgG ساخت کارخانه DAKO به آن اضافه می‌شد و مجدداً در گرمخانه ۳۷ °C قرا رمی‌گرفت. در این هنگام پس از تکرار مراحل شستشو و خشک کردن، بافر مونته بر روی لام اضافه شده و با قرار دادن لامل بر روی حفره‌های محتوی آنتی‌ژن در زیر میکروسکوپ فلورسانس

1- Flourocein Iso Thiocyanate

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-10-04]

(با سیستم پارالنز بکتون دیکسون) مشاهده می‌شدند(۱۵،۱۴).

بر اساس روش توصیه شده توسط مقالات برای جذب آنتی‌بادیهای غیراختصاصی، سوسپانسیونی از کمپیلوباکتر ژژونی با کدورت لوله شماره ۲ مک‌فارلن تهیه گردید. سپس یک حجم از سرم رقیق شده با دو حجم سوسپانسیون فوق‌الذکر مخلوط شد و پس از انکوباسیون به مدت نیم ساعت، در $37^{\circ}C$ سرم مورد استفاده قرارگرفت و جواب آزمونهای ایمونوفلورسانس قبل و بعد از جذب سرم با هم مقایسه شد(۱۵،۱۴).

یافته‌ها

در این بررسی ۲۱۵ بیمار (۱۱۵ نفر مرد و ۱۰۰ نفر زن) با (۱۴ ± ۳۶) مورد مطالعه قرارگرفت که وضعیت بیماری در بین آنها به شرح جدول ۱ می‌باشد.

جدول ۱ـ نتایج بدست آمده از آزمایشات مختلف انجام یافته

تشخیص آندوسکوپی	حساسیت	سرولوژی (IFA)		حساسیت	لامل مستقیم		حساسیت	کشت		اوره‌آز فوق‌سریع		حساسیت	تعداد
		−	+		−	+		−	+	−	+		
*NUD	٪۹۳	۲۹	۱۵		۲۲	۲۱		۳۷	۷	۲۵	۲۱		۴۶
زخم عثنی‌عشر	٪۹۴	۶	۹۰	٪۹۷	۲	۹۰	٪۷۸	۲۱	۷۵	۱۰	۸۶	٪۸۹	۹۶
زخم معده	٪۸۵	۱	۶	٪۸۸	۱	۸	٪۴۲	۴	۳	۰	۹	٪۱۰۰	۹
گاستریت شدید	٪۹۵	۱	۱۹	٪۹۵	۱	۱۸	٪۵۲	۹	۱۰	۱	۲۱	٪۹۵	۲۲
دئودنیت	٪۱۰۰	۰	۲	٪۱۰۰	۰	۲	٪۱۰۰	۰	۴	۰	۴	٪۱۰۰	۴
گاستریت اروزیو	٪۱۰۰	۰	۹	٪۹۱	۱	۱۰	٪۷۲	۳	۸	۱	۱۱	٪۹۱	۱۲
گاستریت و دئودنیت	٪۱۰۰	۰	۵	٪۸۰	۱	۴	٪۷۱	۲	۵	۰	۸	٪۱۰۰	۸
بهبود یافته	٪۸۳	۳	۱۵	٪۷۲	۵	۱۳	٪۵۰	۸	۸	۷	۱۱	٪۶۱	۱۸
جمع		۳۹	۱۶۱		۳۳	۱۶۸		۱۸۲	۱۲۰	۴۴	۱۷۱		۲۱۵

* Non ulcer dyspepsia

خلاصه نتایج بررسیهای میکروبیولوژیک و سرولوژیک افراد نامبرده در جدول ۱و ۲ و نمودارهای ۱، ۲ و ۳ نشان داده شده است.

جدول ۲ـ تیتر آنتی‌بادی در بیماران مختلف

تشخیص آندوسکوپی	تعداد	تیتر IFA							
		کمتر از $\frac{1}{32}$	$\frac{1}{32}$	$\frac{1}{64}$	$\frac{1}{128}$	$\frac{1}{256}$	$\frac{1}{512}$	$\frac{1}{1024}$
*NUD	۲۶	۲	۱۱	۱۶	۴	۹	۲	
زخم اثنی عشر	۹۶	۳	۰	۳	۱۴	۵۲	۲۲	۳
زخم معده	۹	۹	۰	۰	۳	۲	۱	
گاستریت شدید	۲۲	۰	۰	۱	۵	۹	۵	
دئودنیت	۴	۰	۰	۰	۲	۱	۱	
گاستریت اروزیو	۱۲	۰	۰	۰	۱	۲	۶	
گاستریت و دئودنیت	۸	۰	۰	۰	۲	۱	۲	
بهبود یافته	۱۸	۰	۰	۶	۶	۳	۶	
جمع	۲۱۵							

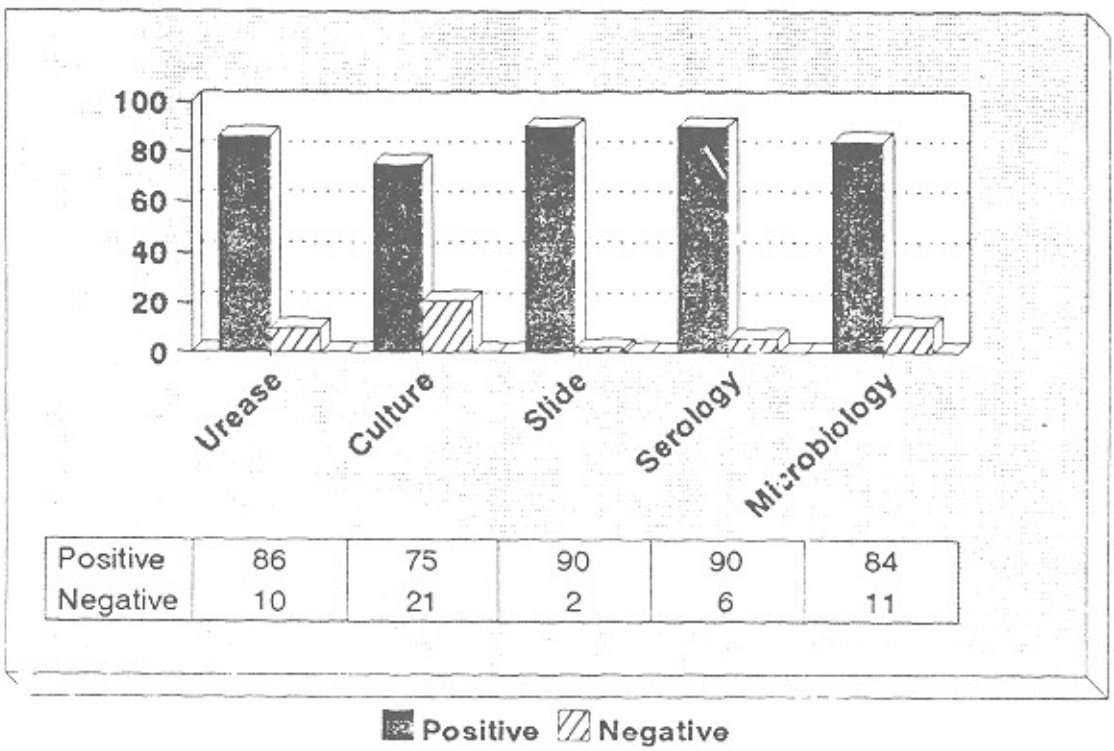
* Non ulcer dyspepsia

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-10-04]

براساس جداول فوق، آزمون ایمونوفلورسانس بطور متوسط با حساسیت ۹۴٪، ویژگی ۸۶٪ و دقت ۹۰٪ همپای روشهای استاندارد میکروبشناسی میتواند عفونت را تشخیص دهد.

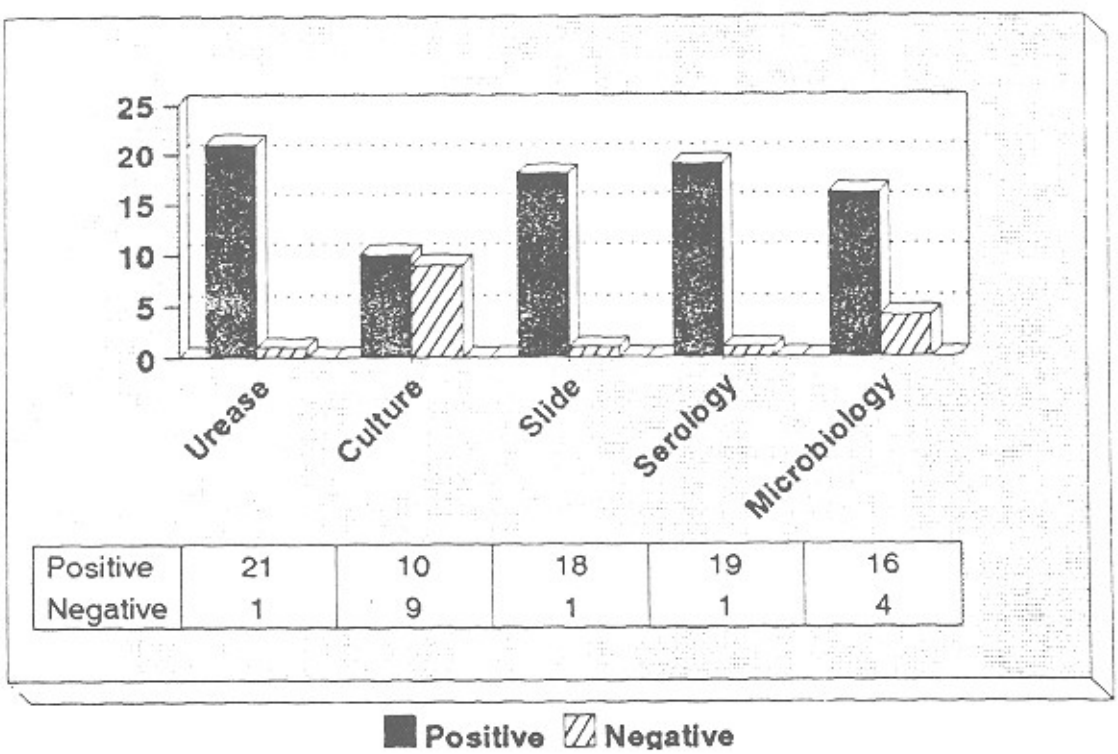
میانگین تیتر IgG بر ضد باکتری در افراد شاهد و بیمار به

نمودار ۱ـ مقایسه نتایج آزمونها و روشهای مختلف برای تشخیص زخم اثنی‌عشر



Positive	86	75	90	90	84
Negative	10	21	2	6	11

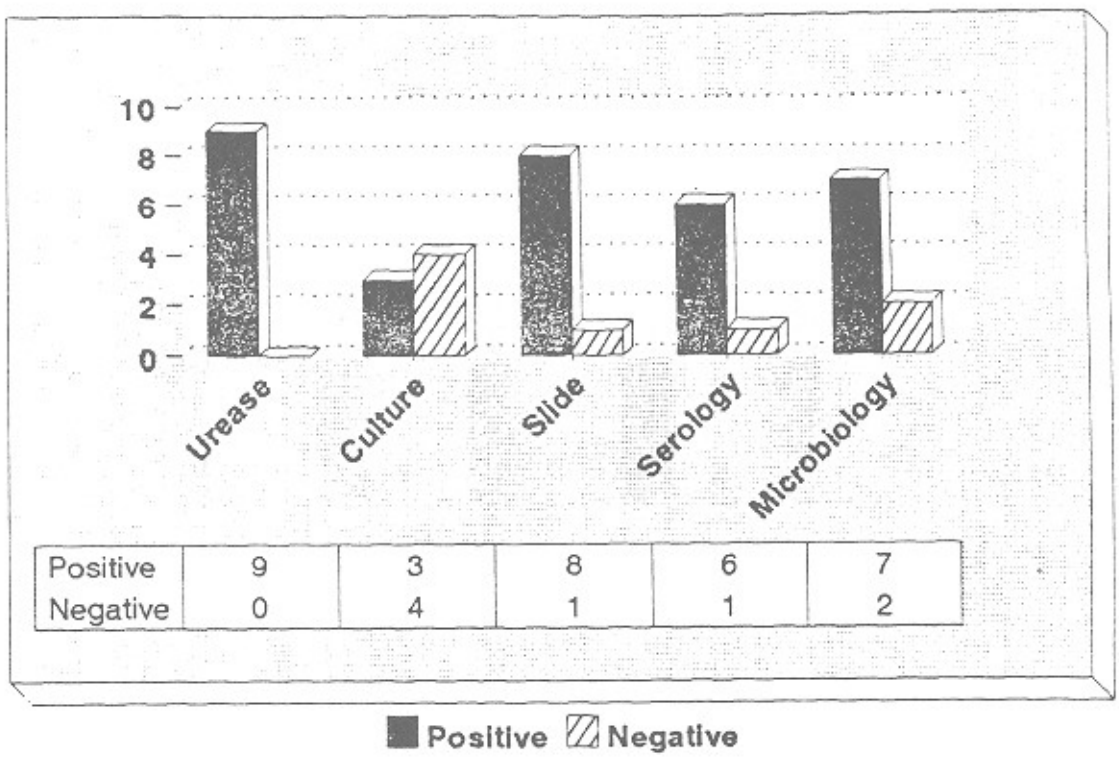
نمودار ۲ـ مقایسه نتایج آزمونها و روشهای مختلف برای تشخیص گاستریت شدید



Positive	21	10	18	19	16
Negative	1	9	1	1	4

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-10-04]

نمودار ۳ـ مقایسه نتایج آزمونها و روشهای مختلف برای تشخیص زخم معده



ترتیب $\frac{1}{58}$ و $\frac{1}{150}$ بوده است که مؤید اختلاف آماری معنی‌دار بین این دو گروه می‌باشد و این اختلاف توسط آزمون t-test با $P<0/05$ و درجه اطمینان ۹۹/۵٪ تائید میگردد، لذا تیتر بیشتر از $\frac{1}{128}$ بعنوان تیتر مثبت و تیتر کمتر از $\frac{1}{64}$ بعنوان تیتر منفی در نظر گرفته شد.

بحث

روشهای مختلفی بعنوان آزمایش استاندارد از طرف محققان مختلف اعلام شده است (۱۶،۱۲). برای مثال در اتاق اندوسکوپی آزمون اوره‌آز سریع بعنوان آزمون استاندارد در نظر گرفته می‌شود(۱۶،۱۲،۴)، در حالیکه در آزمایشگاه بر مشاهده باکتری و جداسازی آن تأکید می‌نمایند.

آزمون پاتولوژی در صورتی می‌تواند بعنوان استاندارد مورد استفاده قرار گیرد که نمونه بیوپسی با رنگ‌آمیزی نقره warttin starry مورد رنگ‌آمیزی قرار گرفته باشد(۱۶) و از آنجایی که H.pylori رنگ H & E را بخود نمی‌گیرد(۱۶)، چندین دهه این باکتری در نسج قابل شناسایی نبوده است. با توجه به گران بودن رنگ‌آمیزی نقره، در صورتی که شرایط اینگونه رنگ‌آمیزی فراهم نباشد رنگ‌آمیزی گیمسا بعنوان روش جایگزین پیشنهاد می‌شود و لذا در مطالعه حاضر نیز، این رنگ‌آمیزی مورد استفاده قرار گرفت.

همانگونه که قبلاً هم بیان شد در عفونتهای میکروبی، کشت باکتری بعنوان روش استاندارد طلایی پیشنهاد می‌شود و لیکن در مورد هلیکوباکترپیلوری تأخیر در رشد باکتری و در بعضی از مواقع رشد بیش از حد فلور نرمال، بخصوص در هنگام کاهش اسیدیته معده و اشکالات تکنیکی مربوط به نمونه‌برداری و ... اهمیت این روش تشخیصی را بسیار کاهش داده است. لذا اکثر محققین کشت را بعنوان روش استاندارد توصیه نمی‌نمایند(۱۶،۱۲). در صورتی که از کشت باکتری به عنوان روش استاندارد استفاده شود، جواب آزمون IFA و کشت در برخی موارد با یکدیگر مغایرت خواهند داشت. با توجه به اینکه حساسیت این روش بین ۸۰-۵۰ درصد می‌باشد در صورت استفاده از کشت بعنوان روش استاندارد، بسیاری از جوابهای سرولوژی مغایر با جواب‌های کشت خواهد بود(۱۶،۱۲).

آزمون اوره‌آز نیز با تعداد باکتری‌های موجود در نسج ارتباط مستقیم دارد. در موارد استفاده از دارو، که این باکتری به فرم کوکوئید تبدیل شده باشد و یا میزان تولید آنزیم کم باشد، جواب این آزمون منفی یا با تأخیر مثبت خواهد گردید(۱۶،۱۲،۴). لذا اکثر محققان در حال حاضر ترجیح می‌دهند از چندین روش بصورت توأم استفاده نمایند.

در این مطالعه نتایج بدست آمده از آزمون IFA بطور مجزا با روش

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-10-04]

اوره‌آز سریع و رنگ‌آمیزی گیمسا مورد مقایسه قرار گرفته است. در مورد مبتلایان به زخمهای اثنی‌عشر و دئودنیت و گاستریتهای شدید و عفونتهای مخلوط تست، ایمونوفلورسانس همپای روشهای میکروبیولوژی و اوره‌آز عمل می‌کند و حتی در مواردی با در نظر گرفتن مزایای روش سرولوژی، جوابهای بهتری بدست آمده است و به عبارت دیگر حساس‌تر از آنها عمل می‌کند.

در مورد گاستریت اروزیو[1] اختلاف قابل ملاحظه‌ای بین موارد تشخیص میکروبیولوژی و سرولوژی مشاهده نمی‌شود. از بین ۱۲ فرد مورد مطالعه، روشهای میکروبیولوژیک و سرولوژیک بترتیب ۱۰ و ۹ مورد را بعنوان بیمار نشان داده‌اند (بطور کلی نظر براینکه گاستریت اروزیو موارد حاد عفونت هلیکو باکتر را نشان میدهد و ممکن است بیمار قبل از زمان Serocoversion time مراجعه کرده باشد، لذا در مورد این بیماران نیز باید توصیه نمود که در فاصله زمانی معین جهت انجام آزمایش مجدد سرولوژیک مراجعه نمایند).

در مورد افراد درمان شده همانگونه که ملاحظه می‌شود از ۱۸ فردی که مورد آزمایش قرار گرفتند آزمایش اوره آز، کشت و لام مستقیم بترتیب در ۱۱، ۸ و ۱۳ نفر مثبت بوده است، در حالیکه ایمونوفلورسانس قادر به شناسائی ۱۵ بیمار می‌باشد(جداول ۱ و ۲). نظر براینکه کاهش تیتر IgG (به جهت نیمه عمر بیشترش نسبت به IgA ...) در زمان طولانی‌تری بوقوع می‌پیوندد، اندازه‌گیری و مقایسه تیتر IgA، گاسترین و پپسینوژن سرم را قبل و بعد از درمان بعنوان معیاری برای موفقیت درمان ذکر می‌کنند (۳ و ۱۱).

بعلاوه با توجه باینکه جذب دارو از سطح آنتر مخاط معده نسبت به سایر نقاط بیشتر است، ممکن است که دارو موجب از بین بردن باکتری در آنتر، کاهش مقدار آن و یا تبدیل باکتری به فرم کوکوئید بشود. از طرف دیگر دارو ممکن است موجب مهاجرت هلیکوباکتر به قسمتهای بالاتر تنه و فوندوس معده بشود. از آنجایی که انتشار باکتری در آنتر معده بصورت لکه‌ای و پراکنده می‌باشد، لذا احتمال برداشت بیوپسی حاوی هلیکوباکترپیلوری براساس قوانین احتمالات کم می‌شود(۵،۶،۱۲). به این ترتیب ملاحظه می‌شود که در چنین مواردی سرولوژی، ابزار تشخیص مناسبی را در اختیار قرار می‌دهد.

در مورد زخمهای معده باید اذعان داشت که اگر چه نمونه‌های مورد مطالعه، نمونه‌های تیپیک و مناسبی بوده‌اند ولی در اکثر موارد به علت گاستریت آتروفیک و مهاجرت باکتری از آنتروم به قسمتهای بالاتر معده، امکان جداسازی و تشخیص باکتری از تنه معده بسختی صورت می‌گیرد. بهمین منظور برای تشخیص از روشهای دیگر نظیر پاتولوژی استفاده می‌شود. لکن یکی دیگر از راههای پیگیری و شناسائی اینگونه بیماران، استفاده از آزمایشات سرولوژیک است که در مقایسه با روشهای میکروبیولوژیک پاسخ بهتری را فراهم می‌کنند. البته با توجه به این موضوع که بیماران مذکور معمولاً در سنین بالا بسر می‌برند، بخاطر کهولت سن ممکن است پاسخ ایمنی آنان کاهش یافته باشد. لذا در مورد افراد بالای ۶۰ سال دارای ریسک بالای ابتلا به سرطان، توصیه می‌شود که حتی در صورت منفی بودن آزمایشات سرولوژی و تنفسی، حتماً این افراد مورد آزمایش آندوسکپی قرار گیرند(۱۴،۱۵).

یکی دیگر از اهداف تحقیق حاضر بررسی تیتر آنتی‌بادی علیه هلیکوباکترپیلوری پس از جذب سرم بیماران با کمپیلوباکتر ژژونی بود. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که قبل و بعد از جذب، تغییر محسوسی در تیتر آنتی‌بادی بر علیه هلیکوباکترپیلوری بوجود نمی‌آید که با مشاهدات روچا و همکاران مطابقت دارد.

از آنجایی که محققان مذکور تنها بر روی تعداد محدودی از مبتلایان به زخمهای اثنی‌عشر آزمون خود را انجام داده‌اند، لذا از دو عدد Cut off بالا و پایین برای بررسی حساسیت و ویژگی استفاده شده است. شایان ذکر است که در مطالعه حاضر با توجه به حجم بالای نمونه، نقطه Cut off با دقت بیشتر و نسبت به شرایط اقلیمی ایران سنجیده شده است و لزومی به استفاده از دوتیتر احساس نمی‌شود.

پیشنهادات

نظر به اینکه بیشتر افراد مورد بررسی در این تحقیق را افراد بزرگسال تشکیل داده‌اند، لذا Cut off تشخیصی در مورد بزرگسالان تعیین شده است و برای تعمیم کاربرد این آزمون در مورد کودکان، مطالعه مجزایی جهت تعیین Cut off ضروری بنظر می‌رسد.

برخی از محققین در افرادی که تیتر آنتی‌بادی یکسان دارند بر اساس شدت واکنش (شدت درخشندگی) فلورسانس، اقدام به درجه‌بندی شدت بیماری نموده‌اند(۱۷). در اینجا نیز بر اساس شدت درخشندگی می‌توان شدت ضایعات هلیکوباکتر را در ۴ طبقه دسته‌بندی نمود، ولی با توجه به نکات مبهمی که در این زمینه وجود دارد، بنظر می‌رسد در صورتی که تیتر آنتی‌بادی در تعداد کافی بیماران مبتلا به اشکال مختلف بالینی (اختلالات گوارشی) با روشهای الایزا و RIA اندازه‌گیری شود امکان تبیین ارتباط شدت

1- Erosive gastritis

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-10-04]

درخشندگی فلورسانس و شدت بیماری بطور مستدل‌تری فراهم شود.

بالاخره با توجه به اهمیت تعیین تیتر IgA (۱۱)، استاندارد کردن آزمون ایمونوفلورسانس برای تعیین این آنتی‌بادی حائز اهمیت می‌باشد. قدم بعدی در این رابطه تهیه کیتهای مناسب الایزا در کشور است تا نیاز آزمایشگاهها از نظر ورود کیت‌های وارداتی برطرف شود.

تشکر و قدردانی

انجام این تحقیق با حمایت مالی دانشگاه تربیت مدرس صورت پذیرفته است. بدینوسیله از همکاری و زحمات تمامی اساتید و پزشکان و همکاران محترم شاغل در بخش اندوسکوپی بیمارستان دکتر علی شریعتی و بیمارستان مهر، بخش میکروبشناسی دانشکده پزشکی و ایمونولوژی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشگاه علوم پزشکی ایران و بیمارستان امام خمینی که مرا در این تحقیق یاری فرمودند، صمیمانه قدردانی می‌نمایم.

منابع

۱) دکتر میرصالحیان، اکبر. دکتر ادیب قر، پرویز. بررسی کمپیلوباکتری پیلوری. مجله دارو درمان، شماره مسلسل ۱۰۱، خرداد ۷۱، سال نهم، صفحه ۱۷-۱۱

۲) دکتر فتح‌الله‌زاده بهرام و همکاران. بررسی مقایسه‌ای شیوه‌های درمانی جدید در زخمهای معده و دوازدهه، مجله دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران، شماره ۲، سال پنجاه و ششم، سال ۱۳۷۷، صفحه ۹۶-۹۳.

3) Khoshkholgh M, Malekzadeh R, et al. Pepsin activity and gastrin in sera as markers of eradication of Helicobacter pylori. Iranian J of Medical Sciences. 1994, Vol 19, No. 3, p 106–8

4) Mamel I J Use of endoscopy in peptic ulcer disease. Med. Clin North Am. 1991. 75. 841.

5) Marshal J B. Helicobacter pyori. The American Journal of Gastroentrology, 1994, Vol. 89, No. 8.

6) Lee et al. Helicobacter pylori (Review). Gastroentrology Clinic North America, 1993. March.

7) Graham D Y, Malaty H M Epidemiology of H. pylori in an asymptomatic populatron in the USA, effect of age, race & socioeconomic status. Gastroentrology, 1991. 100. 1495.

8) Andersen I P, Blom J, and Nielsen. H. Survival and ultrastructural changes of H. pylori after phagocytosis by human PMN Leukocytes and Monocytes APMIS, 1991.

9) Peden N R, Calachan H, Shepered D M. Gastric mucosal histamin & Histamin Methyl transferase in patients with duodenal ulcer. Gut, 1982, 23, 58.

10) Tosi M F, and Gzinn. S J. Opsonic activity of specific human IgG against H. pylori, J. Infect Dis. 1990, 162. 158.

11) Alan Culter et al. Role of Helicobacter serology in evaluating treatment success. Digestive Disease & Science 1993 Dec. vol 38. no 12. p 2262–6.

12) Stewart Goodwin, Helicobacter pylori biology & practice ... CRC.

13) Warren Strober, Michael. Lamm, et al. Mucosal immunity and infections at mucosal surfaces. Oxford university press 1988.

14) Michael Faulde, et al. Evaluation of immunoflouresance assay for specific detection of IgG directed against H.pylori.J Clin. Microbiology. 1991 Feb. P323-7.

15) Andreia Maria Rocha de Oliverira, et al. Serodiagnosis of H.pylori infection in children by IFA. J Pediatric Gastro-Nutrition. 1993.16:247-51.

16) James S Barthel and E Dale Everott. Diagnosis of campylobacter pylori : The gold standard & alternatives. Review of Infection Disease Vol 12. Supl 2. Jan-Feb 1990. p. S107-114.

17) Judith A Kjelstrom and Blaine L Beaman. Development of a serologic panel for the recognition of infections in a marine model. Diagn Microbiol Infect Dis. 1993. 16. 291-301

18) Akiyoshi Kawamura Jr and Yuzo Aoyma. Immunofluoresence in medical science University of Tokyo press. 1983, p 88-89.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-10-04]