

Floresan In Situ Hibridizasyon Yöntemiyle *Helicobacter pylori* Tanısında Gözlemciler Arasında Fark Var mı?

İhsan Hakkı ÇİFTÇİ *, Fatma Hüsniye DİLEK **, Birol ŞAFAK ***, Gülşah AŞIK ****, Gürsel ACARTÜRK *****

Sakarya Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji* ve Tıbbi Patoloji** Anabilim Dalları, Balıkesir Devlet Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı***, Afyon Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji**** ve Gastroenteroloji***** Anabilim Dalları

ÖZET

Amaç: *Helicobacter pylori*'nin keşfinden bu yana, enfeksiyonunu değerlendirmek için çeşitli tanı yöntemleri gündeme gelmiştir. *H. pylori* enfeksiyonunun tanısında ve eradikasyon tedavisinin takibinde halen biyopsiye dayalı testler referans yöntem olarak kabul edilmektedir. Bu çalışma, biyopsi örneklerinde floresan in situ hibridizasyon (FISH) yöntemini kullanarak *H. pylori* tanısında gözlemciler arasındaki tekrarlanabilirliği araştırmak için tasarlandı.

Gereç ve Yöntem: *H. pylori* tanısı bağımsız iki gözlemci tarafından kör olarak değerlendirildi. Formalin ile fikse edilmiş parafin bloklu 100 adet gastrik biyopsi örneği FISH yöntemi ile değerlendirildi. Biyopsi kesitleri hava ile kurutuldu ve ticari olarak mevcut Seafast® *H. pylori* Combi kitiyle (Izinta, Hungary), üreticinin talimatları doğrultusunda hibridize edildi. Bu yöntemde *H. pylori* yeşil floresan ile işaretlenmektedir. Örnekler standart bir floresan filtre seti ile donatılmış Nikon Eclips 80i mikroskobu ile incelendi. Minör değişimlerin değerlendirilmesinde istatistik analizi için sayısal veriler de sağlanan detaylı bir histopatolojik sınıflama kullanıldı. *H. pylori* yoğunluğu 0 yok; 1 hafif; 2 orta; 3 şiddetli olarak derecelendirildi. Uygun değerlendirme için mukoza kalınlığı yetersiz olan örnekler dışlandı.

Bulgular: Gözlemcilerden biri tarafından 59 ve diğeri tarafından 48 hastada bakteri saptandı. *H. pylori* değerlendirmesinde iyi bir uyumluluk sağlandı ve κ değeri 0.65 (95% CI 0.31-0.75) olarak bulundu. Bununla birlikte, örneklerin %11'inde gözlemciler arasında uyum yoktu. Semikantitatif skorlama ile *H. pylori* düzeyinin test edilmesi orta derecede tekrarlanabilirliğe ulaştı. Ancak, *H. pylori* yoğunluğu düşük olduğunda gözlemci uyumu da düşüktü ve κ değeri 0.14 olarak belirlendi (95% CI, anlamsız fark).

Sonuç: FISH yöntemi gastrik doku örneklerinde *H. pylori* tanısı için doğru, ucuz, hızlı bir test olup gelecekte alternatif bir araç gibi görünmektedir. Ancak, örneklerin değerlendirilmesinde deneyimin önemli olduğu ve kişiler arasında fark oluşabileceği unutulmamalıdır.

Anahtar kelimeler: *Helicobacter pylori*, floresan in situ hibridizasyon, tanı

SUMMARY

Is There any Interobserver Difference in the Detection of *Helicobacter pylori* by Fluorescent In Situ Hybridization Method?

Objective: Since the discovery of *Helicobacter pylori* strains several diagnostic methods have become available to assess the relevant infection. Biopsy-based tests are still considered to be the reference method for diagnosing *H. pylori* infection and monitoring eradication treatment. This study was designed to test the reproducibility of the results among observers for reporting presence of *H. pylori* in biopsy samples by fluorescence in situ hybridization (FISH) method.

Materials and Methods: Two Independent observers blinded to the study tried to detect strains of *H. pylori* species. A total of 100 formalin-fixed paraffin-embedded gastric biopsies were used to test the presence of *H. pylori* by FISH method. Sectioned biopsies were air dried and hybridized using commercially available test system Seafast® *H. pylori* Combi Kit (Izinta, Hungary) according to the manufacturer's instructions. This test kit labels *H. pylori* with the green fluorescent stain and the slides were examined with a Nikon Eclips 80i microscope equipped with a standard fluorescence filter set. In order to improve assessment of minor degrees of alteration, a detailed histopathological classification which also provided numerical data for statistical analysis was used. The density of *H. pylori* colonization was graded as follows: 0, none; 1, mild; 2, moderate; 3, severe. The specimens which were insufficient in mucosal thickness for proper assessment were excluded from the study.

Results: *H. pylori* was detected in 59 and 48 patients by two different observers, respectively. The level of agreement in the assessment of *H. pylori* by FISH method was good with a κ value of 0.65 (95% CI 0.31-0.75). However, in 11% of our samples there was disagreement between the observers. Semiquantitative scoring of *H. pylori* revealed moderate reproducibility. The observer agreement was lower with κ 0.14 (95% CI non-significant) for specimens with mild *H. pylori* density.

Conclusion: FISH seems to be a reliable, cheap and rapid method for the alternative diagnosis of *H. pylori* in gastric biopsy specimens. However, evaluation of the slides under microscopy is subjective and requires experience.

Key words: *Helicobacter pylori*, fluorescence in situ hybridization, diagnosis

Alındığı tarih: 01.05.2012

Kabul tarihi: 01.06.2012

Yazışma adresi: İhsan Hakkı Çiftçi, Sakarya Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Korucuk/Sakarya e-posta: ihciftci@hotmail.com

GİRİŞ

Helicobacter pylori insanların midesine yerleştiğinde tedavi edilmediği sürece varlığını devam ettirebilen, lokal enflamasyon ve bağışık yanıtı neden olabilen patojen bir mikroorganizmadır ⁽¹⁾. *H. pylori* enfeksiyonlarında tedaviye yönelik tanı uygulamaları çok değerli olmakla birlikte pahalı ve zaman alıcı olması sebebi ile invazif yöntem olan üst gastrointestinal sistem (GİS) endoskopi yerine, dışkıda antijenlerin aranması veya üre nefes testleri gibi non-invazif testler önerilmektedir ⁽²⁾. Ancak, bakteriyolojik tanımlama ve direnç çalışmaları için kültür; *H. pylori* varlığının gösterilmesinde ise histopatolojik inceleme altın standart olarak kabul edilmektedir. Histopatolojik inceleme duyarlılığı (%95) ve özgüllüğü (%98) yüksek, farklı boyama protokollerinin kullanılabildiği invazif bir tanı yöntemidir ⁽³⁾.

Floresan in-situ hibridizasyon (FISH) teknolojisi, *H. pylori* bakterisine özgü ribozomal RNA problemleri kullanarak dokularda bakteriyi saptayan bir yöntemdir. FISH yönteminin *H. pylori*'nin varlığını tespit etmede hızlı, doğru ve uygun maliyetli bir yöntem olduğu bildirilmektedir. *H. pylori* varlığının belirlen-

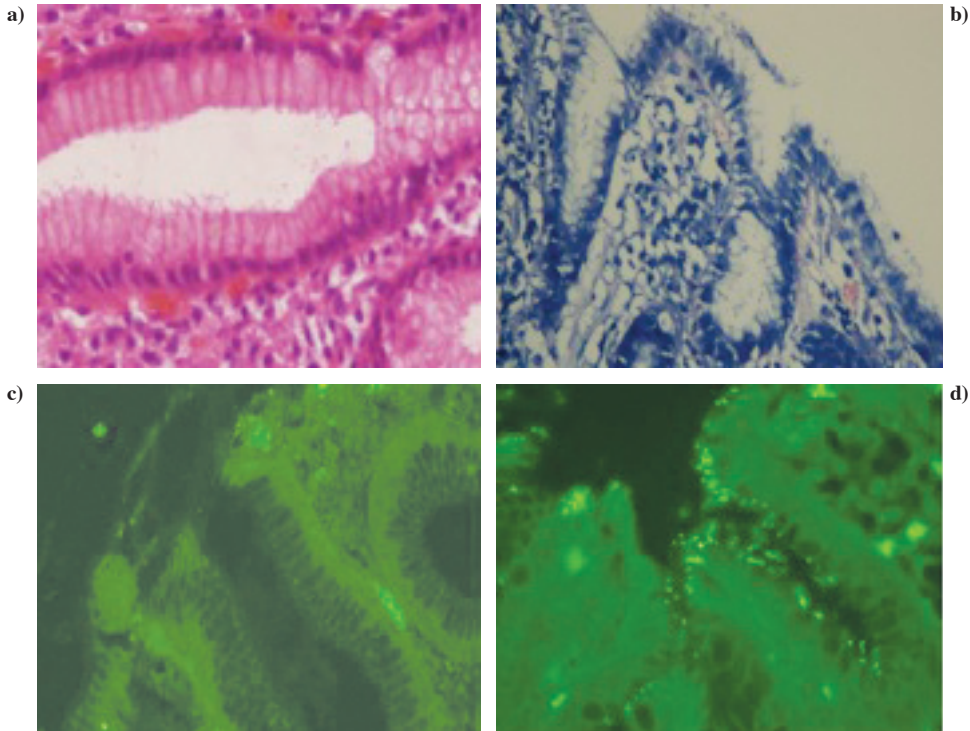
mesinde hem parafinize hem de taze dokudan çalışma olanağı sağlayan FISH yöntemi, biyopsi örneklerinden alınan kesitlerde bakteriyolojik tanıyı sağlamaktadır ^(4,5). Geleneksel bakteriyolojik boyama yöntemleri dışında olan bu yöntem için sınırlı bilgi ve tecrübeye sahip olduğundan deneyim gerektirmektedir.

Bu çalışmada, *H. pylori* varlığının gösterilmesi için FISH uygulanan biyopsi örneklerinde iki bağımsız gözlemci tarafından gerçekleştirilen floresan mikroskopisi sonuçlarının karşılaştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Histopatolojik inceleme: Bu çalışmada, formalin fikse parafin gömme ile blok haline getirilmiş 100 mide biyopsi örneği kullanılmıştır. Örnekler hematoxilen eozin (HE) ve ek boyama yöntemleriyle (Giemsa, Wright, akridin oranj ve gümüşleme) incelenmiştir (Resim 1a ve Resim 1b).

FISH yöntemi: Histopatolojik inceleme için hazırlanmış aynı örneklerden alınan kesitlerde bakteri varlığı, "Seafast® *H. pylori* Combi" kitiyle (Izinta, Hungary) FIHS yöntemi kullanılarak aranmıştır.



Resim 1. Doku örneklerinde *H. pylori* tanısı için kullanılan yöntemlere ait mikroskopik görüntüler; 1a: *H. pylori* pozitif HE (100X), 1b: *H. pylori* pozitif giemsa (100X) 1c: *H. pylori* negatif FISH (40X), 1d: *H. pylori* pozitif FISH (40X).

Örneklerin hazırlanması: Çalışma kapsamında irdelenen tüm parafinize örneklerden mikrotom aracılığıyla 4µm kalınlığında kesitler alınmıştır. Deparafinizasyon için kesitler 30dk ksilen, 30dk %96 etanol ile muamele edilmiş daha sonra 10dk 400 W mikrodalga fırında bekletilmiştir. Oda ısısına kadar soğutulan kesitler distile suyla yıkanıp havada kurutulmuştur.

Reaktiflerin hazırlığı: Liyofilize problemlerin rehidratasyonu, hibridizasyon karışımının hazırlanması, yıkama tamponunun hazırlanması ve hibridizasyon karışımının floresan mikroskopta kontrolü deneyler öncesi yapılan hazırlıklar olup, üretici firmanın önerileri doğrultusunda yapılmıştır.

Hibridizasyon: Hibridizasyon için conta kapaklı lam kutuları kullanılmıştır. İlk olarak 5ml hibridizasyon tamponu ile ıslatılmış steril filtre kağıdı lam kutusu içerisine yerleştirilmiştir. Ardından lam üzerine alınmış olan 4µm kalınlığında kesitin yüzeyini örtecek kadar hibridizasyon karışımı eklenip lamel ile kapatılmıştır. Hazırlanan lamlar conta kapaklı bir lam kutusu içine yerleştirilerek kutunun ağzı sıkıca kapatılmış 46°C'deki su banyosunda 90 dk hibridizasyon için bekletilmiştir. Hibridizasyon sonrası lam kutularından çıkartılan örnekler kit içeriğinde bulunan tampon ile iki kez yıkandıktan sonra +4°C kaldırılmıştır.

Floresan mikroskopik inceleme: Örnekler, hiçbir ön bilgi olmaksızın her iki gözlemci tarafından incelenmiştir. Eclips 80i (Nikon, USA) mikroskopunda yeşil filtreyle (Fluorescein: Absorption 494 nm, Emission 518 nm) yapılan incelemede bakteri morfolojisine uygun yeşil floresan görünüm *H. pylori* varlığı olarak değerlendirilmiştir. Minör değişimlerin değerlendirilmesinde istatistik analizi için sayısal veriler de sağlayan detaylı bir histopatolojik sınıflama kullanılmıştır. *H. pylori* yoğunluğu; 0 yok (Resim

1c), 1 hafif, 2 orta (Resim 1d) ve 3 şiddetli olarak derecelendirilmiştir. Mukoza kalınlığı yetersiz olan örnekler değerlendirme dışı bırakılmıştır. İki gözlemcinin verileri arasındaki uyum Pearson's korelasyon analizi ile değerlendirilmiştir.

Histopatolojik inceleme ve FISH karşılaştırılması: Histopatolojik inceleme bulguları esas alınarak FISH yönteminin özgüllük, duyarlılık, pozitif ve negatif kestirim değerleri ve doğruluk oranı hesaplanmıştır.

BULGULAR

FISH değerlendirmesinde, birinci gözlemci tarafından örneklerin %59'u *H. pylori* pozitif bulunurken, ikinci gözlemci tarafından örneklerin %48'i *H. pylori* pozitif bulunmuştur. Her iki gözlemci arasında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde uyum saptanmıştır ($r=0.801$; $\kappa=0.65$ $p<0.001$).

FISH ile yapılan değerlendirmede birinci gözlemci; 18 hafif, 22 orta ve 19 şiddetli bakteri yoğunluğu bildirirken, ikinci gözlemci; 16 hafif, 15 orta ve 17 şiddetli bakteri yoğunluğu bildirmiştir. Birinci gözlemcinin hafif bakteri yoğunluğu bildirdiği 11 örnek ikinci gözlemci tarafından negatif olarak değerlendirilmiştir (Tablo 1). Orta ve şiddetli *H. pylori* yoğunluğu olan örnekler için yapılan değerlendirmelerde her iki gözlemci arasında %100 uyum saptanmıştır. Ancak, negatif örnekler ve *H. pylori* yoğunluğunun düşük olduğu örnekler için gözlemci uyumu düşük bulunmuştur. Yapılan hesaplamalarda istatistiksel olarak anlamsız korelasyon saptanmıştır ($r=0.277$; $\kappa=0.14$; $p>0.05$).

Histopatolojik inceleme sonuçlarında örneklerin %56'sı *H. pylori* pozitif bulunmuştur. Patoloji laboratuvarı kayıtları temel alınarak yapılan hesaplamalarda duyarlılık ve özgüllük değerlerinin birinci gözlemci için sırasıyla %98.2 ve %90.9, ikinci gözlemci için de sırasıyla %82.1 ve %95.8 olduğu görülmüştür (Tablo 2).

Tablo 1. Gözlemcilerin FISH bakteri yoğunluğu göre oluşturdukları skorlamalar.

I. Gözlemci	II. Gözlemci				Toplam
	Negatif	1+	2+	3+	
Negatif	41	0	0	0	41
1+	11	7	0	0	18
2+	0	9	12	1	22
3+	0	0	3	16	19
Toplam	52	16	15	17	100

Tablo 2. Histopatolojik verilerle FISH yönteminin karşılaştırılması.

	Duyarlılık	Özgüllük	PKD	NKD	Doğruluk oranı
I. Gözlemci	0,9822	0,9093	0,9324	0,9752	0,9501
II. Gözlemci	0,8214	0,9579	0,9584	0,8456	0,9304

TARTIŞMA

Dünya nüfusunun yaklaşık yarısının *H. pylori* ile enfekte olduğu kabul edilmektedir ^(6,7). *H. pylori* ile ilişkisi kesin olarak kanıtlanmış hastalıklarda eradikasyon tedavisi kesinlikle yapılmalıdır ^(8,9). Tanıda bakteriyolojik kültür altın standart olarak kabul edilmekle beraber yeni yöntemler konusunda çalışmalar devam etmektedir. Son yıllarda FISH'in *H. pylori* tanısında hızlı, doğru ve uygun maliyetli bir yöntem olduğu, biyopsi örneklerinden alınan kesitlerde bakteriyi saptayabildiği vurgulanmaktadır. Ayrıca bu yöntemin klaritromisin direncini göstermede de etkin olması bir avantaj sağlamaktadır ⁽⁴⁾.

Histopatolojik kesitlerle *H. pylori* varlığı için yapılan çalışmalarda bakteri yoğunluğu tanıyı etkileyen önemli faktörlerden biridir. Yoğun bakteri varlığında tanı koymak kolaylaşmakta, yoğunluk azaldıkça tanı koymak güçleşmektedir. Patoloji laboratuvarlarında HE ile yapılan boyama sonrası gerçekleştirilen mikroskobik incelemelerde kişiler arasında uyumsuzluk görülebilmekte ve giemsa, wright, akridin oranj ve gümüşleme gibi ek boyama yöntemleri ile bu uyumsuzlukların giderilebileceği ifade edilmektedir ^(10,11).

Yapılan bazı çalışmalarda, kültür pozitif hastaların formalin fikse parafin gömme mide biyopsi örneklerinde FISH yöntemiyle %97 oranında *H. pylori* pozitifliği bildirilmiştir ^(12,13). Ülkemizde dispeptik hasta grubunun formalin fikse parafin gömme preparatlarından yapılan FISH çalışmasında ise %95.5 ve %59.8 oranında pozitiflikler bildirilmiştir ^(14,15). Çalışmamızda birinci gözlemci tarafından yapılan mikroskobik incelemede %59, ikinci gözlemci tarafından gerçekleştirilen incelemelerde %48 oranında *H. pylori* pozitifliği bulunmuştur. Her iki gözlemci arasında duyarlılık, özgüllük, pozitif kestirim, negatif kestirim ve doğruluk oranı değerleri arasında küçük sapmalar olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır. Ancak, ikinci gözlemcinin *H. pylori* tanısı için duyarlılık (0.82) ve negatif kestirim (0.84) değerlerinin daha düşük bulunması dikkat çekicidir. İlk kez histopatolojik kesitlerde FISH yöntemi ile çalışma yapan kişilerin, bakteri yoğunluğu az olan örneklerin bir kısmını negatif olarak değerlendirmesi beklenebilir bir sonuçtur.

Gastrik doku örnekleri ile gerçekleştirilecek olan

histolojik çalışmalarda zaman zaman mukus artıkları sorun oluşturabilmektedir. Mukus varlığının bakterinin tanımlanmasında zorluk ya da yanlışlıklara neden olabileceği özellikle bakteri sayısının az veya negatif olduğu düşünülen örneklerde seri kesitlerin incelenmesinin tanıyı destekleyebileceği akılda tutulmalıdır. Ayrıca FISH yöntemi bakteri varlığı ve skorlama açısından histolojik boyama yöntemlerine oranla avantaj sağlayabileceği düşünülmekte ve konunun geniş kapsamlı çalışmalarla irdelenmesi önerilmektedir.

FISH yönteminin klaritromisin direncini saptaması ayrıca bir avantaj olup, yeni problemler eklenerek başta patojenite faktörlerini de aramak bu yöntemler mümkün görülmektedir. Tedaviye direnç gösteren olgularda tedavi öncesi alınan biyopsi materyallerinde sonradan çalışmalar yapılabilmesi de söz konusu olabilir.

Sonuç olarak, *H. pylori* enfeksiyonunun etkileri göz önüne alındığında doğru, hızlı ve uygun maliyetli tanı önemlidir. FISH yöntemi gastrik doku örneklerinde *H. pylori* tanısı için doğru, ucuz, hızlı bir test olup gelecekte alternatif bir araç gibi görünmektedir. Ayrıca FISH ile direnç çalışmalarının gerçekleştirilebileceği de düşünülmüşse tek bir girişim sonrası elde edilen biyopsi örneğinden pek çok bilgiye ulaşımın sağlanacağına inanılmaktadır. Ancak, örneklerin değerlendirilmesinde deneyimin önemli olduğu ve kişiler arasında fark oluşabileceği unutulmamalıdır.

KAYNAKLAR

1. Cırak MY, Akyön Y, Mégraud F. Diagnosis of *Helicobacter pylori*. *Helicobacter* 2007; 12(Suppl-1):S4-9.
2. Malfertheiner P, Mégraud F, O'Morain C, et al. Current concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection: The Maastricht III Consensus Report. *Gut* 2007; 56:772-81. <http://dx.doi.org/10.1136/gut.2006.101634> PMID:17170018 PMCID:1954853
3. Tepes B, Ferlan-Marolt V, Jutersek A, Kavcic B, Zaletel-Kragelj L. Interobserver agreement in the assessment of gastritis reversibility after *Helicobacter pylori* eradication. *Histopathology* 1999; 34:124-33. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2559.1999.00604.x> PMID:10064391
4. Aktepe OC, Çiftçi İH, Safak B, Usulan I, Dilek FH. Five methods for detection of *Helicobacter pylori* in the Turkish population. *World J Gastroenterol* 2011; 17:5172-6. <http://dx.doi.org/10.3748/wjg.v17.i47.5172> PMID:22215941 PMCID:3243883
5. Tuncer M, Hatemi I. Tests for the diagnosis of *Helicobacter pylori*. *Türkiye Klinikleri J Int Med Sci* 2005; 1:10-3.
6. Lehours P, Yılmaz O. Epidemiology *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* 2007; 12(Suppl):S1-3. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1523-5378.2007.00541.x> PMID:17727452
7. Safak B, Çiftçi İH, Dilek FH, et al. Prevalence of cagA and vacA genotypes of *Helicobacter pylori* isolated from Turkish patients with active or non-active chronic gastritis. *Scand J Infect Dis* 2010; 42:435-8.

- <http://dx.doi.org/10.3109/00365540903563418>
PMid:20136573
8. **Forbes GM, Glaser ME, Cullen DJ, et al.** Duodenal ulcer treated with *Helicobacter pylori* eradication: seven-year follow-up. *Lancet* 1994; 343:258-60.
[http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(94\)91111-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(94)91111-8)
 9. **Graham DY, Malaty HM, Evans DG, Evans DJ, Klein PD, Adam E.** Epidemiology of *Helicobacter pylori* in an asymptomatic population in the United States. Effect of age, race, and socioeconomic status. *Gastroenterology* 1991; 100:1495-501. PMid:2019355
 10. **Aydm O, Eğilmez R, Karabacak T, Kanık A.** Interobserver variation in histopathological assessment of *Helicobacter pylori* gastritis. *World J Gastroenterol* 2003; 9:2232-5. PMid:14562384
 11. **Rotimi O, Cairns A, Gray S, Moayyedi P, Dixon MF.** Histological identification of *Helicobacter pylori*: comparison of staining methods. *J Clin Pathol* 2000; 53:756-9.
<http://dx.doi.org/10.1136/jcp.53.10.756>
PMid:11064668 PMCID:1731087
 12. **Morris JM, Reasonover AL, Bruce MG, et al.** Evaluation of seaFAST; a rapid fluorescence in situ hybridization test for detection of *Helicobacter pylori* and resistance to clarithromycin in paraffin-embedded biopsy sections. *J Clin Microbiol* 2005; 43:3494-6.
<http://dx.doi.org/10.1128/JCM.43.7.3494-3496.2005>
PMid:16000488 PMCID:1169084
 13. **Yılmaz O, Demiray E, Tümer S, et al.** Detection of *Helicobacter pylori* and determination of clarithromycin susceptibility using formalin-fixed, paraffin-embedded gastric biopsy specimens by fluorescence in situ hybridization. *Helicobacter* 2007; 12:136-41.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1523-5378.2007.00483.x>
PMid:17309750
 14. **Bayramiçli OU.** Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *Türkiye Klinikleri J Fam Med-Special Topics* 2011; 2:24-30.
 15. **Can F, Yılmaz Z, Demirbilek M, et al.** Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection and determination of clarithromycin resistance by fluorescence in situ hybridization from formalin-fixed, paraffin-embedded gastric biopsy specimens. *Can J Microbiol* 2005; 51:569-73.
<http://dx.doi.org/10.1139/w05-035>
PMid:16175205