

# تعیین ارزش تشخیصی رنگ آمیزی گیمسا و تست اوره آز سریع در هلیکوباکتر پیلوری

## 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 - پپتیک، این مطالعه جهت ارزیابی نقش روشهای تشخیصی سریع برای این باکتری انجام یافت. این مطالعه به صورت مشاهده‌ای - مقطعی بر روی ۱۰۰ بیمار مبتلا به علائم گوارش که در فاصله مهرماه ۱۳۷۶ تا مرداد ۱۳۷۸ به مراکز درمانی دانشگاه علوم پزشکی 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 رنگ آمیزی هماتوکسین ائوزین H-E (به عنوان روش مرجع) و مقایسه این یافته‌ها با نتایج بدست آمده در رنگ آمیزی اختصاصی گیمسا در جهت تعیین ارزش این رنگ آمیزی استفاده شد. بیوپسی دیگر جهت تشخیص سریع (داخل اتاق اندوسکوپی) مبتلایان به این عفونت با انجام تست اوره آز 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 رنگ آمیزی گیمسا ۹۵/۹٪ و ویژگی آن ۴۴/۴٪ گزارش شد و برای تست اوره آز حساسیت ۶۹/۹٪ و ویژگی ۸۵/۲٪ محاسبه شد. ارزش اخباری مثبت (PPV) برای رنگ آمیزی گیمسا و تست سریع اوره آز 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 رنگ آمیزی گیمسا و تست اوره آز به ترتیب ۱/۷ و ۴/۷ بدست آمد و نسبت درست‌نمایی منفی (NLR) برای این دو تست به ترتیب ۰/۰۹ و ۰/۳۵ گزارش شد.

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

\*دکتر شاهین قاسمی I

علی چهرئی II

دکتر سلیمان صادقی III

دکتر علی ابراهیمی III

کلید واژه ها: ۱ - هلیکوباکتر پیلوری ۲ - رنگ آمیزی گیمسا ۳ - رنگ آمیزی H-E ۴ - تست اوره آز 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 رنگ آمیزی گیمسا و تست اوره آز سریع در هلیکوباکتر پیلوری به راهنمایی دکتر قاسمی. شاهین، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی ایران. ۱۳۷۸".

(I) استادیار بیماریهای عفونی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی ایران (\*مؤلف مسؤول)

(II) دانشجوی پزشکی و عضو کمیته پژوهشی دانشجویی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی ایران

(III) پزشک عمومی

امکان دارد به رنگ آمیزی 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 (رنگ آمیزی 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 رسول اکرم (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 رنگ آمیزی روتین هماتوکسیلین - اتوزین (H-E) و دیگری جهت رنگ آمیزی 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 - بنفش در عرض یک دقیقه یا کمتر، بیانگر وجود هلیکوباکتر و عملکرد آنزیم اوره‌آز بود.

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

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 نقش آفرینی 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 آندوسکوپی معده، تهیه بیوپسی و بررسی هستوپاتولوژی مخاط با رنگ آمیزی روتین یا اختصاصی امکان پذیر است. نوعی آزمون تنفسی اوره‌آز با استفاده از کربن ۱۳ یا 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 (۴، ۵). همچنین روش‌های هیستولوژی دارای حساسیتی بین ۷۰-۹۰٪ خواهد بود و توجه به این نکته لازم است که این روش نیازمند آندوسکوپی است و همچنین

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 - ۴۰ 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 و حساسیت آن ۹۵/۹٪  $(95.9\% - 98.8/9 - 87.7\%)$  و ویژگی آن ۴۴/۴٪  $(44.4\% - 64/4 - 26\%)$  بدست آمد همچنین ارزش اخباری مثبت (PPV) تست گیمسا در تشخیص هلیکوباکتر پیلوری  $(82/4\%)$   $(82.4\% - 89/5 - 72/2\%)$  و ارزش اخباری منفی (NPV) آن جهت تشخیص هلیکوباکتر پیلوری ۸۰٪  $(80\% - 94/7 - 51/4\%)$  محاسبه شد. همچنین 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 ۶۹/۹٪  $(69.9\% - 79/8 - 57/9\%)$  و ویژگی آن ۸۵/۲٪  $(85.2\% - 95/1 - 65/4\%)$  بدست آمد. همچنین ارزش اخباری مثبت (PPV) تست اوره‌آز سریع در تشخیص هلیکوباکتر  $(92/7\%)$   $(92.7\% - 97/6 - 81/6\%)$  و ارزش اخباری منفی آن (NPV)

۱۰۰ 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 به دلایل 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 ۶ درجه (۰ تا ۵) تقسیم شده است (۶a).

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

۴ - شدت حضور یا عدم وجود PMN و تهاجم غددی که مبین وجود گاستریت فعال بوده‌اند.

۵ - 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 تا ۵) مد نظر بوده است. نتیجه تست اوره‌آز به صورت مثبت یا منفی بودن در نظر گرفتن شدت آن و احتساب حداکثر زمان ۶۰ 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 امکان 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

(H-E) به عنوان روش مرجع تشخیص در این مطالعه باشد. علیرغم اینکه "gold standard" برای تشخیص موارد مثبت و منفی هلیکوباکتر، کشت می باشد، 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 و مطالعات دیگر قابل توجهی می باشد. اما تست اوره آز 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، موارد مثبت کاذب (FP) آن کم بوده و نتیجه مثبت آن اهمیت بیشتری دارد ولی چنانچه نتیجه تست اوره آز سریع منفی گردد باید با تست مطمئن دیگری آزمایش تکرار گردد. در مطالعات دیگر انجام یافته نیز مانند این مطالعه تست اوره آز سریع را به عنوان یک تست با ویژگی بالا معرفی کرده اند در واقع این تست مجموعاً بیشتر اختصاصی است تا حساس (۱۰،۱۱). تخریب محیط در اثر ماندن بیش از حد، نمونه گیری ناکافی و مصرف آنتی - بیوتیک از دلایل ایجاد منفی کاذب (FN) می باشد (۱۱).

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

در کل می توان گفت که رنگ آمیزی گیمسا را می توان به عنوان وسیله ای در جهت رفع نیاز روزانه پذیرفت و تست اوره آز با توجه به ویژگی نسبتاً بالایی که دارد و سرعت تشخیص و تکنیک ساده آن و عدم نیاز به تکنسین مجرب، می توان در جهت تشخیص عفونت هلیکوباکتر بکار رود اما موارد منفی آن باید با روش مرجع مناسب کنترل گردد.

۵۱/۱٪ (۶۶/۱-۳۶٪) محاسبه شد. نسبت درست نمایی مثبت (PLR) تست اوره آز سریع برای تشخیص هلیکوباکتر پیلوری ۴/۷ و نسبت درست نمایی 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 بوده اند و همچنین ۵۲ نفر از افراد مورد پژوهش مبتلا به گاستریت فعال بوده اند که از این تعداد ۴۷ نفر آنها (۹۰/۳٪) باکتری هلیکوباکتر پیلوری داشته اند 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 معنی داری داشتند در حالیکه در مورد فولیکول لنفاوی تعداد افراد واجد و فاقد هلیکوباکتر اختلاف آماری معنی داری نداشت (جدول ۱).

#### بحث

با توجه به نتایج بدست آمده در این تحقیق روش گیمسا در تشخیص هلیکوباکتر روشی حساس می باشد اما از ویژگی بالایی برخوردار نیست و این بدان معنی است که موارد منفی کاذب آن بسیار اندک می باشد و چنانچه نتیجه تست گیمسا منفی گردد احتمال عدم وجود هلیکوباکتر زیاد می باشد ولی 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 ۹۷-۱۰۰٪ گزارش گردیده است (۱۰،۶). پایین بودن ویژگی رنگ آمیزی گیمسا در این تحقیق بدین معناست که درصدی از موارد مثبت در رنگ آمیزی گیمسا با (H-E) به عنوان روش مرجع تأیید نشده اند که علت این امر می تواند استفاده از رنگ آمیزی

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

جدول ۱- یافته های پاتولوژی بر حسب وجود یا عدم وجود هلیکوباکتر

## 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., Burette-A., et al, "Evaluation of a commercially available complement Fixation test for diagnosis of Helicobacter pylori Infection", Journal of clinical Microbiology, 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, "Evaluation 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, "Evaluation 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 sydney system", American Journal of surgical pathology, 1996,20(10):1161-81
- 9- Alhomsy – 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

## EVALUATION OF DIAGNOSTIC VALUE OF GIEMSA STAINING AND RAPID UREASE TEST IN HELICOBACTER PYLORI

<sup>I</sup> \*Sh. Ghasemi MD    <sup>II</sup> A. Chehrei    <sup>III</sup> S. Sadeghi MD    <sup>III</sup> A. Ebrahimi MD

### ABSTRACT

Attention to high prevalence of inflammatory disease of upper gastrointestinal system and determination of Helicobacter pylori, “a great importance etiology of gastric disorders”, this study was performed for rapid diagnostic evaluation of Helicobacter pylori.

This observational & cross-sectional study was performed in 100 cases who suffered from upper gastrointestinal symptoms. By an internist, at least two gastric biopsies with endoscope (From antrum region) were taken, one of the biopsies was used in H-E staining (reference for gold standard method) and its results compared with Giemsa stain result for determination of validity if Giemsa staining. Other biopsy was used in one minute rapid urease for rapid diagnosis in patient with H.Pylori infection and in statistical analysis of the results sensitivity, specificity, positive and negative predictive Values (PPV,NPV) and positive and negative likelihood ratio (PLR,NLR) were used.

In Giemsa staining sensitivity was reported to be 95.9% and specificity was 44.4% and for rapid urease test sensitivity was 69.9% and specificity 85.2% PPV of Giemsa staining and rapid urease test were 82.3% and 92.7% respectively, and NPV of were 80% and 51% respectively. PLR in Giemsa staining and rapid urease test were 1.7 and 4.7 respectively and NLR were 0.09 and 0.35 respectively.

Giemsa staining has a high sensitivity; and its negative results is Valuable. Rapid Urease test has a high specificity, and its positive results are valuable but its negative results must be controlled with a suitable reference test.

**Key Words:** 1) Helicobacter Pylori 2) Giemsa staining 3) H-E staining 4) Rapid urease test

---

*I) Assistant professor of infectious diseases, Iran University of Medical Sciences and Health Services, Tehran, Iran (\*Corresponding author)*

*II) Medical Student member of student research committee of Iran University of Medical Sciences and Health Services*

*III) General physician*