

## مقایسه کاربرد کشت خون و اندازه گیری آندوتوکسین در تشخیص عفونت های

### ناشی از میکروارگانیزم های گرم منفی

دکتر پرویز ایازی\* دکتر محمدمهدی دانشی\*\*

## Comparison of blood cultures and endotoxin measurements in diagnosis of gram negative bacterial infections

P.Ayazi M.Daneshi

### Abstract

**Background:** Gram negative bacterial infections continue to cause mortality due to unavailability of new methods for rapid diagnosis and appropriate treatment.

**Objective:** To evaluate and compare blood culture results with endotoxin measurements in diagnosis of gram negative bacterial infections.

**Methods:** This research was conducted on 100 hospitalized patients with clinical signs and symptoms compatible with septicemia. Blood cultures and endotoxin measurements (limulus amebocyte lysate, LAL test) were carried out on blood samples of all patients.

**Findings:** Blood cultures were positive in 16(16%) patients. Sensitivity and specificity of blood cultures were 18% and 100%, respectively. LAL tests were positive in 20(20%) patients. Sensitivity and specificity of LAL test were 100% and 96% respectively.

**Conclusion:** LAL test as a diagnostic assay for gram negative bacterial infections is more sensitive than blood culture. In addition, it takes only a few minutes to be performed, comparing blood culture that takes days.

**Keywords:** Limulus Amebocyte Lysate, Blood Culture, Gram Negative Bacteria

### چکیده

**زمینه:** عفونت ناشی از میکروارگانیزم های گرم منفی، با توجه به عدم وجود آزمون های تشخیصی سریع و دارای کارایی و در نتیجه عدم درمان مناسب، باعث مرگ بیماران می شود.

**هدف:** مطالعه به منظور مقایسه کشت خون و آزمایش LAL در تشخیص عفونت ناشی از میکروارگانیزم های گرم منفی انجام شد.

**مواد و روش ها:** در این تحقیق توصیفی تحلیلی برای ۱۰۰ بیمار مشکوک به سپتی سمی یا شوک عفونی بستری در بیمارستان های قدس و کوثر شهرستان قزوین در سال های ۱۳۷۷ و ۱۳۷۸ نمونه گیری انجام شد کشت خون و آزمایش LAL انجام شد. مطابقت دو روش با استفاده از ضریب کاپا مورد ارزیابی قرار گرفت.

**یافته ها:** از ۱۰۰ نمونه کشت خون، ۱۶ کشت خون مثبت وجود داشت که حساسیت و ویژگی آن به ترتیب ۱۸٪ و ۱۰۰٪ بود. آزمایش LAL در ۲۰ بیمار مثبت شد که حساسیت و ویژگی آن به ترتیب ۱۰۰٪ و ۹۶٪ بود.

**نتیجه گیری:** آزمایش LAL در تشخیص عفونت های گرم منفی و شوک عفونی بسیار با ارزش است.

**کلید واژه ها:** آزمایش لیمولوس، کشت خون، باکتری های گرم منفی

\* استادیار دانشگاه علوم پزشکی قزوین

\*\* دکترای علوم آزمایشگاهی

این تحقیق در یازدهمین همایش بین المللی بیماری های کودکان (تهران، ۱۳۷۸) ارائه شده است.

**۱. مقدمه :**

به آلودگی مشخص و از مطالعه حذف شوند. کشت های خون در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شدند و در فواصل زمانی ۱۶ ساعت، ۴۸ ساعت و یک هفته بر روی محیط های کشت بلاد آگار و Mac Conkey agar پاساژ داده شدند. به دنبال انکوباسیون پلیت های کشت ذکر شده به مدت ۲۴ ساعت، از کلونی های ایجاد شده جهت تشخیص نوع میکروارگانیسم ها، لام مستقیم تهیه شد. براساس شکل میکروارگانیسم ها (کوکسی یا باسیل) از آزمون های تشخیصی کوآگولاز، کاتالاز، اپتوشین، اکسیداز، ایندول، اوره و غیره استفاده شد. پس از تشخیص هویت میکروارگانیسم ها، حساسیت باکتری ها تعیین شد. جهت انجام تست LAL از کیت سیگما ساخت کشور آمریکا با شماره D-210 استفاده شد. طبق دستورکار کیت، نمونه های خون بیماران به لوله های استریل حاوی هپارین اضافه شدند که قبلاً از مواد پیوژن و آندوتوکسین عاری شده بودند. پلاسمای خون بیماران با رعایت شرایط آسپتیک جدا و در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد ذخیره می شد. پس از پایان نمونه برداری، نمونه های پلاسمای انجماد خارج شده و پس از تهیه استانداردهای آندوتوکسین با غلظت های ۰/۰۱۵ تا ۴۰۰۰ Eu در ۱ میلی لیتر، آزمایش مطابق دستورکار کیت و پس از رقیق کردن نمونه ها انجام شد. با توجه به محدودیت کیت، آزمایش نیمه کمی انجام نشد و آزمایش فقط به صورت منفرد انجام و نتایج به صورت مثبت و منفی گزارش شد. چگونگی مطابقت دو روش کشت خون و آزمایش LAL با استفاده از ضریب کاپا مورد ارزیابی قرار گرفت.

**۱. یافته ها :**

از ۱۰۰ بیمار مورد مطالعه ۶۵ نفر مؤنث و ۳۵ نفر مذکر بودند. ۷۰ نفر در گروه سنی کمتر از یک ماه و ۳۰ نفر در گروه سنی بالاتر از یک ماه قرار داشتند. از ۱۰۰ نمونه کشت خون، ۱۶ مورد مثبت شد که عبارت بود از: ۳ مورد باکتری های گرم منفی

سپتی سمی و شوک عفونی یکی از علل مرگ و میر نوزادان و کودکان است و اغلب ناشی از عفونت با میکروارگانیسم های گرم منفی است. مطالعه های اخیر نشان داده اند که تشخیص سریع علت سپتی سمی و شوک عفونی و درمان فوری و به موقع آن با داروهای مناسب موجب کاهش مرگ و میر می شود.<sup>(۴و۶)</sup> در تحقیقی که توسط ناکوی و همکاران صورت گرفت، ۱۳ درصد بیماران متعاقب عفونت با هموفیلوس انفلوانزا نوع b، دچار شوک عفونی شدند که باعث مرگ ۶۰ درصد بیماران شد.<sup>(۷)</sup> در تحقیق ونگ و همکاران نیز ۱۱ تا ۴۰ درصد بیماران مبتلا به عفونت مننگوککی، دچار کاهش فشار خون و علائم بالینی دال بر شروع شوک عفونی شدند.<sup>(۸)</sup>

در ایران روش های تشخیص سریع عوامل ایجاد کننده بیماری های عفونی کمتر در دسترس هستند. در حالی که با توجه به مرگ و میر فراوان متعاقب شوک عفونی ناشی از میکروارگانیسم ها، به خصوص باکتری های گرم منفی، روش های تشخیص سریع باید جزء امکانات اولیه آزمایشگاه های تشخیصی بیمارستان ها، به خصوص بیمارستان های آموزشی باشند که یکی از این روش ها آزمایش LAL است.<sup>(۴و۶و۷)</sup>

این بررسی به منظور مشخص نمودن توانایی آزمایش LAL در تشخیص سریع عفونت های ناشی از باکتری های گرم منفی و مقایسه آن با کشت خون انجام شد.

**۱. مواد و روش ها :**

در این مطالعه تحلیلی که از آذرماه ۱۳۷۷ شروع و در خردادماه ۱۳۷۸ پایان یافت، از ۱۰۰ بیمار مشکوک به سپتی سمی و یا شوک عفونی بستری در بیمارستان های قدس و کوثر قزوین نمونه گیری انجام شد. از هر یک از بیماران ۱ میلی لیتر خون اخذ و به ویال های حاوی ۱۰ میلی لیتر محلول کشت خون اضافه شد. تمام کشت های خون به صورت مضاعف انجام شد تا موارد مشکوک

آزمایش های LAL و کشت خون ممکن است به دلایل زیر باشد: اکثر بیمارانی که با نشانه های مشخص سپتی سمی یا شوک عفونی در بیمارستان بستری می شوند، در مراجعه قبلی به پزشکان با آنتی بیوتیک هایی درمان می شوند که از نظر نوع و مقدار دارو و طول درمان مناسب نیستند. دیگر این که سپتی سمی یا شوک عفونی ممکن است از باکتری های گرم منفی بی هوازی ناشی شده باشند که به محیط کشت اختصاصی نیاز دارند و در محیط های معمولی کشت خون رشد نمی کنند.<sup>(۱)</sup>

تحقیقات مختلف نشان داده اند که شایع ترین علت سپتی سمی باکتریایی در دهه های اخیر، باکتری های گرم منفی هستند.<sup>(۵،۴)</sup>

با توجه به علل مختلف و به خصوص عدم تکامل سیستم ایمنی، شیوع سپسیس با سن نسبت عکس دارد.<sup>(۴)</sup> نظر به این که خطر ناشی از آندوتوکسین باکتری های گرم منفی بیش تر از توکسین باکتری های گرم مثبت است، لذا بهره گیری از روش های تشخیصی سریع از اهمیت به سزایی برخوردار است.<sup>(۱)</sup>

در مطالعه ای که توسط مهیار در بیمارستان قدس قزوین انجام شد، از ۱۴۶ کشت خون مثبت، ۱۱ درصد باکتری های گرم منفی بودند که با توجه به شیوع این میکروارگانیسم ها در بیماری های عفونی کودکان، لزوم استفاده از محیط های کشت خون اختصاصی جهت میکروارگانیسم های گرم منفی به خصوص بی هوازی ها و همچنین آزمایش های تشخیصی سریع آشکارتر می شود.<sup>(۳،۱)</sup>

حساسیت آزمایش LAL در این تحقیق ۱۰۰ درصد و ویژگی آن ۹۶ درصد بود. در بررسی که توسط عمادی در دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی انجام شد، حساسیت LAL با روش کمی ۱۰۰ درصد و با روش کیفی ۹۶ درصد و ویژگی آن ۹۷ درصد بود.<sup>(۲)</sup> در تحقیق دیگری که توسط حقی آشتیانی و همکاران در سال ۱۳۶۹ در دانشگاه تهران انجام شد، حساسیت آزمایش LAL ۹۶

(انتروباکتر، E.coli و کلبسیلا هر کدام یک مورد) و ۱۳ مورد باکتری های گرم مثبت (۵ مورد استافیلوکوک کوآگولاز منفی، ۴ مورد استافیلوکوک کوآگولاز مثبت، ۳ مورد استرپتوکوک بتاهمولیتیک گروه A و ۱ مورد استرپتوکوک آلفاهمولیتیک).

از ۱۰۰ آزمایش LAL که بر روی نمونه ها انجام شد، در ۲۰ بیمار (۲۰ درصد) نتیجه مثبت بود.

در ۲۰ موردی که آزمایش LAL مثبت بود، ۳ مورد کشت خون مثبت وجود داشت که ۲ مورد آن گرم منفی (انتروباکتر و E.coli) و ۱ مورد آن گرم مثبت بود (استافیلوکوک کوآگولاز منفی). در ۸۰ موردی که آزمایش LAL منفی بود، ۱۳ مورد کشت خون مثبت وجود داشت که ۱ مورد آن گرم منفی (کلبسیلا) و ۱۲ مورد آن گرم مثبت بود (۴ مورد استافیلوکوک کوآگولاز منفی، ۴ مورد استافیلوکوک کوآگولاز مثبت، ۳ مورد استرپتوکوک بتاهمولیتیک گروه A و ۱ مورد استرپتوکوک آلفاهمولیتیک).

در نمونه هایی که آزمایش LAL مثبت بود، کشت مثبت دیگری بر روی نمونه هایی غیر از خون وجود داشت که عبارت بودند از: ۱ مورد هموفیلوس آنفلوانزا از کشت CSF، ۲ مورد کلبسیلا از کشت ترشحات چشم و ۱ مورد کلبسیلا از کشت ادرار. بیمارانی که آزمایش LAL آنها مثبت بود، در ۵۷ درصد موارد ESR بیش تر از ۱۰ میلی متر داشتند که ارزش اخباری مثبت آزمایش ۸۵ درصد بود.

#### ۱. بحث و نتیجه گیری:

براساس نتایج این تحقیق ۱۶ مورد از ۱۰۰ بیمار مشکوک به سپتی سمی و شوک عفونی دارای کشت خون مثبت بودند که فقط سه مورد آنها باکتری های گرم منفی بودند. در حالی که در آزمایش LAL ۲۰ نمونه مثبت بود. با توجه به این که آزمایش LAL مخصوص تشخیص آندوتوکسین باکتری های گرم منفی است، لذا نتایج کشت خون و اندازه گیری آندوتوکسین با یکدیگر همسو نیستند (ضریب KAPPA کمتر از ۰/۲). عدم توافق میان

مرگ و میرها و هزینه های بیمارستانی قدم های مؤثری برداشت.<sup>(۱)</sup>

### ۱. سپاسگزاری :

بدین وسیله از شورای پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی قزوین در تأمین هزینه طرح و همچنین آقایان دکتر حسن جهانی هاشمی و دکتر مجتبی معینی سپاسگزاری می شود.

### ۱. مراجع :

۱. حقی آشتیانی محمد تقی و همکاران. ارزش اندازه گیری آندوتوکسین در تشخیص بیماران مبتلا به سپتی سمی و مقایسه آن با کشت خون. مجله بیماری های کودکان ایران، بهمن ۱۳۷۹، سال چهارم، شماره ۱، ۱۰۴-۸۵
۲. عمادی گنجین و همکاران. استفاده از روش های ایمونولوژیک در تشخیص سریع عوامل باکتریال در مننژیت های کودکان و نوزادان. پایان نامه پزشکی، تهران، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، ۶۶-۱۳۶۵
۳. مهیارابوالفضل و همکاران. بررسی موارد سپتی سمی های دوره نوزادی با کشت مثبت. پایان نامه پزشکی، قزوین، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، ۱۳۷۴
4. Behrman R E et al. Nelson textbook of pediatrics. 16<sup>th</sup> ed, USA, Saunders, 2000, 747-50
5. Feigin R D et al. Textbook of pediatric infectious diseases. 4<sup>th</sup> ed, USA, Saunders, 1998, 807-17
6. Mandel G L et al. Principle and practice of infectious diseases. 5<sup>th</sup> Ed, USA, Churchill Livingstone, 2000, 806-7
7. Naqvi S H, Chundu K R, Friedman A D. Shock in children with gram negative

درصد گزارش شد.<sup>(۱)</sup> در کتب مرجع نیز حساسیت و ویژگی آزمایش LAL به ترتیب ۹۳ و ۹۹/۴ درصد گزارش شده که با نتایج تحقیق حاضر همخوانی دارد.<sup>(۶)</sup> در این تحقیق حساسیت کشت خون ۱۸ درصد و ویژگی آن ۱۰۰ درصد بود، ولی در تحقیق دیگری که توسط حقی آشتیانی و همکاران انجام شد حساسیت کشت خون ۸۹ درصد و ویژگی آن ۴۷ درصد گزارش شد.<sup>(۱)</sup> در بررسی دیگری که در واشنگتن (امریکا) انجام شد، حساسیت کشت خون ۸۲ درصد و ویژگی ۹۶ درصد گزارش شد.<sup>(۹)</sup> حساسیت کشت خون مطالعه آخر با تحقیق حاضر اختلاف زیادی دارد که در جهت رفع این اختلاف موارد زیر پیشنهاد می شود :

- استفاده از محیط های کشت خون با کیفیت بهتر
  - استفاده از محیط های کشت اختصاصی و استفاده از سیستم خودکار
  - استفاده از پرسنل مجرب و دارای دانش لازم
  - مراقبت در رعایت نوبت های کار تعیین شده برای کارکنان آزمایشگاه (در اکثر موارد نوبت های طولانی کار باعث کاهش بازدهی می شود)
  - عدم استفاده خودسرانه بیماران از آنتی بیوتیک ها
  - ایجاد امکانات تشخیصی جهت میکروب های بی هوازی اختیاری مانند بعضی از استرپتوکوک ها
  - عدم تجویز آنتی بیوتیک سرپایی در مواردی که به بستری نیاز است.
- با توجه به موارد ذکر شده، لزوم استفاده از آزمایش های تشخیصی سریع مانند LAL که هم بتواند نقایص موجود در کشت را جبران کند و هم در تشخیص سریع میکروارگانیزم ها کمک کند امری اجتناب ناپذیر است. بنابراین آزمایش LAL جهت تشخیص سپتی سمی های باکتری های گرم منفی و شوک عفونی بسیار باارزش است. توصیه می شود در بیماران مشکوک به سپتی سمی و شوک عفونی، کشت خون و آزمایش LAL به صورت توأم انجام شود. بدین ترتیب می توان در تشخیص و درمان سریع بیماران و در نتیجه کاهش میزان

bacillary sepsis and hemophilus influenza type B sepsis. *Pediatr Infect Dis J* 1986; 5: 512-5

8. Wong V K, Hitchcock W, Mason W H. Meningococcal infections in children : a review of 100 cases. *Pediatr Infect Dis J* 1989; 8: 224-7

9. WWW [http: NEONATAL PED. Washington. EDU, NICU- WEB, Rule out. STM](http://NEONATAL.PED.WASHINGTON.EDU/NICU-WEB/)