پژوهش درپزشکی (مجله پژوهشی دانشکده پزشکی)
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید بهشتی
دوره ۳۱، شماره ۲، تابستان ۱۳۸۶، صفحات ۱۵۵ تا ۱۵۸

مقاله اصلی
(Original Article)

مقایسه کشت خون و بافی‌کوت رنگ‌آمیزی شده با اکریدین اورنج در تشخیص سپتی‌سمی ناشی از میکروارگانیسم‌ها

دکتر پرویز ایازی، دکتر محمدمهدی دانشی، دکتر فرهاد بابایی، دکتر حسن جهانی هاشمی، محسن باریک‌بین*

* گروه اطفال، دانشگاه علوم پزشکی قزوین

چکیده

سابقه و هدف: *آزمایش‌های مختلفی با ویژگی، حساسیت و مدت زمان انجام متفاوت برای تشخیص سپتی‌سمی انجام می‌شوند. در این مطالعه، دو روش رنگ‌آمیزی بافی‌کوت با اکریدین اورنج و کشت خون در تشخیص سپتی‌سمی ناشی از میکروارگانیسم‌ها مقایسه شدند.*

روش بررسی: *در این مطالعه مقطعی، از ۱۰۱ بیمار مشکوک به سپتی‌سمی بستری در بیمارستان قدس شهرستان قزوین در سال‌های ۱۳۷۸ و ۱۳۷۹ نمونه کشت خون گرفته شد و آزمایش رنگ‌آمیزی بافی‌کوت با اکریدین اورنج و کشت خون در تشخیص سپتی‌سمی مقایسه شد. مطابقت دو روش با استفاده از ضریب کاپا مورد ارزیابی قرار گرفت.*

یافته‌ها: *از ۱۰۱ نمونه کشت خون، ۲۰ (۱۹/۸ درصد) مورد آن مثبت شد و حساسیت و ویژگی آن به ترتیب ۲۶ و ۹۲ درصد بود. آزمایش رنگ‌آمیزی با اکریدین اورنج در ۵۴ بیمار (۵۳/۴ درصد) مثبت شد که حساسیت و ویژگی آن به ترتیب ۸۳ و ۱۰۰ درصد محاسبه شد.*

نتیجه‌گیری: *آزمایش رنگ‌آمیزی با اکریدین اورنج در تشخیص سپتی‌سمی ارزش بسیار بالایی دارد.*

واژگان کلیدی: *آزمایش اکریدین اورنج، کشت خون، سپتی‌سمی، بافی‌کوت.*

مقدمه

سپتی‌سمی و باکتریمی از علل مهم مرگ و میر در نوزادان و کودکان هستند (۱). بعضی از باکتریمی‌ها موقت و خود محدود شونده هستند، اما گاهی اوقات همراه و یا در نتیجه بیماری‌های خطرناک عفونی ایجاد می‌شوند (۲،۱). به عنوان مثال، مننژیت در نوزادان معمولاً به دنبال باکتریمی و سپتی-سمی ایجاد می‌شود (۳). سپتی سمی نیز متعاقب باکتریمی ایجاد می‌شود که تشخیص سریع و درمان مناسب موجب کاهش مرگ و میر می‌شود (۳-۱). شوک عفونی هم متعاقب باکتریمی و سپتی‌سمی ایجاد می‌شود. شوک عفونی اغلب ناشی از عفونت با میکروارگانیسم‌های گرم منفی است، اما عفونت با میکروارگانیسم‌های گرم مثبت نیز می‌تواند منجر به شوک عفونی شود (۱).

میزان بروز شوک عفونی متعاقب باکتریمی و سپتی‌سمی مشخص نیست، اما مرگ‌ومیر آن زیاد است، به‌طوری که میزان مرگ ناشی از شوک عفونی در گزارش Dupont و Spink حدود ۹۸ درصد بوده است (۶-۴).

بنابراین تشخیص سریع باکتریمی و سپتی‌سمی با توجه به عواقب خطرناک و مرگ زیاد، اهمیت بسیاری دارد. با توجه به این‌که تظاهرات بالینی سپتی‌سمی ممکن است با تظاهرات بالینی بعضی از بیماری‌های غیرعفونی مشابه باشد، علاوه بر کشت خون که انجام آن به زمانی طولانی نیاز دارد، روش‌های

آدرس نویسنده مسئول: تهران، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، گروه اطفال، دکتر پرویز ایازی
(email: parviz_ayazi@yahoo.com)

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۵/۳/٦
تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۸٦/٤/۳۱

Archive of SID
www.SID.ir

تشخیص سریع باید جزو امکانات اولیه آزمایشگاه‌های تشخیصی بیمارستان‌ها به‌خصوص بیمارستان‌های آموزشی باشد که یکی از این روش‌ها آزمایش رنگ‌آمیزی با اکریدین اورنج است (۶،۲). در این مطالعه، دو روش رنگ‌آمیزی بافی‌کوت با اکریدین اورنج و کشت خون در تشخیص سپتی‌سمی ناشی از میکروارگانیسم‌ها مقایسه شدند.

مواد و روشها

در این مطالعه مقطعی که از فروردین ۱۳۷۸ تا اسفند ۱۳۷۹ انجام شد، از ۱۰۱ بیمار مشکوک به سپتی‌سمی بستری در بیمارستان قدس قزوین که از قبل آنتی بیوتیک دریافت نکرده بودند، نمونه‌گیری انجام شد. به بیمارانی مشکوک به سپتی‌سمی اطلاق شد که دارای علایم و نشانه‌های ناپایداری درجه حرارت، رنگ پریدگی، تاکی‌کاردی، برادی‌کاردی، آپنه، دیسترس تنفسی، تحریک‌پذیری، لتارژی، کما، اسهال و استفراغ بودند (۲). از هر یک از بیماران، یک میلی‌لیتر خون گرفته شد و به ویال‌های حاوی ۱۰ میلی‌لیتر محلول کشت خون اضافه شد. تمام کشت‌های خون به صورت مضاعف انجام شد تا موارد مشکوک به آلودگی مشخص و از مطالعه حذف شوند. کشت‌های خون در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند و در فواصل زمانی ۱۶ ساعت، ۴۸ ساعت و یک هفته بر روی محیط‌های کشت Blood agar و Mac Conkey Agar پاساژ داده شدند. پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون پلیت‌های کشت، از کلونی‌های ایجاد شده جهت تشخیص نوع میکروارگانیسم‌ها لام مستقیم تهیه شد. براساس شکل میکروارگانیسم‌ها (کوکسی یا باسیل) از آزمون‌های تشخیصی کوآگولاز، کاتالاز، اپتوشین، اکسیداز، ایندول، اوره و غیره استفاده شد. پس از تشخیص هویت میکروارگانیسم‌ها، حساسیت باکتری‌ها تعیین شد .

جهت انجام آزمایش رنگ‌آمیزی با اکریدین اورنج از پودر اکریدین اورنج شرکت MicroBiology products BBL آلمان استفاده شد. ابتدا هم‌زمان با انجام کشت خون، ۱ میلی‌لیتر خون از بیماران گرفته شد و به ویال‌های استریل حاوی اتیلن دی‌آمینوتترااستیک اسید (EDTA) اضافه شد. سپس با استفاده از میکروتیوب‌ها و دستگاه سانتریفیوژ، میکروهماتوکریت کنسانتره‌ای از گلبول‌های سفید (بافی‌کوت) تهیه و بلافاصله دو اسلاید از بافی کوت خون آماده شد. سپس اسلایدها با متانول ثابت (Fix) شد و با محلول رنگ اکریدین اورنج یک درصد مطابق روش زیر رنگ‌آمیزی شد (۵).

ابتدا محلول ذخیره رنگ اکریدین‌اورنج با غلظت یک گرم درصد در آب مقطر تهیه شد و سپس ۵ میلی‌لیتر از رنگ ساخته شده با ۵ میلی‌لیتر محلول بافراستات ۰/۲ مولار (pH=4) رقیق شد و تمام اسلایدها همراه اسلاید کنترل مثبت و منفی به وسیله رنگ ساخته شده به مدت ۲ دقیقه رنگ‌آمیزی شد و پس از خشک شدن در هوا به وسیله میکروسکوپ Ultraviolet بررسی شد. تشخیص نهایی سپتی‌سمی با آزمون‌های معتبر که مجموعه‌ای از سدیمانتاسیون، CRP، شمارش و مورفولوژی گلبول‌های سفید خون، کشت از سایر اعضا و پاسخ به درمان آنتی بیوتیکی بود به اثبات رسید (۶،۴). مطابقت دو روش کشت خون و آزمایش رنگ‌آمیزی با اکریدین اورنج با استفاده از ضریب کاپا ارزیابی شد.

یافته‌ها

از ۱۰۱ بیمار مورد مطالعه، ۶۵ مورد (۶۴/۴ درصد) سپتی‌سمی داشتند. ۳۷ نفر (۳۶/۶ درصد) در بخش نوزادان ، ۲۲ نفر (۲۱/۸ درصد) در بخش اطفال و ۴۲ نفر (۴۱/۶ درصد) در بخش ICU و NICU بستری بودند .

از ۶۵ بیمار مبتلا به سپتی‌سمی، ۳۷ نفر (۵۶/۵ درصد) مذکر و ۲۸ نفر (۴۳/۵ درصد) مؤنث بودند. ۳۱ نفر (۴۷/۵ درصد) در گروه سنی کمتر از یک ماه و ۳۴ نفر (۵۲/۵ درصد) در گروه سنی بالاتر از یک ماه قرار داشتند. در ۶۵ بیمار با تشخیص نهایی سپتی‌سمی، تب (۶۱ درصد) شایع ترین یافته بالینی بود و سایر موارد از قبیل لتارژی (۳۴ درصد)، کما (۱۹ درصد)، اسهال (۱۵ درصد)، ضایعات پوستی، دیسترس تنفسی و استفراغ در رده های بعدی قرار داشتند. در نهایت ۱۶/۹ درصد از بیماران نیز فوت کردند .

از ۱۰۱ نمونه کشت خون، ۲۰ مورد (۱۹/۸ درصد) مثبت شد که ۴ مورد کلبسیلا، ۳ مورد اشرشیاکلی، ۶ مورد استافیلوکوک کوآگولاز منفی، ۲ مورد استافیلوکوک کوآگولاز مثبت، ۲ مورد سودومونا آئروژینوزا، ۲ مورد استرپتوکوک بتاهمولیتیک و ۱ مورد پنوموکوک بود. از ۶۵ بیمار مبتلا به سپتی‌سمی، ۱۷ بیمار (۲۶ درصد) دارای کشت خون مثبت بودند و ۴۸ بیمار (۷۵ درصد) کشت خون منفی داشتند. میزان حساسیت کشت خون ۲۶ درصد، ویژگی ۹۲ درصد، ارزش اخباری مثبت (PPV) ۸۵ درصد و دقت (Accuracy) ۴۹/۵ درصد محاسبه شد. از ۱۰۱ آزمایش رنگ‌آمیزی با اکریدین اورنج، نتیجه ۵۴ بیمار (۵۳/۴ درصد) مثبت شد. از ۶۵ بیمار مبتلا به

Archive of SID

www.SID.ir

سپتی‌سمی، آزمایش رنگ آمیزی با آکریدین اورنج در ۵۴ بیمار (۸۳ درصد) مثبت و در ۱۱ بیمار(۱۷ درصد) منفی بود. حساسیت آزمایش رنگ‌آمیزی با اکریدین اورنج ۸۳ درصد، ویژگی ۱۰۰ درصد و ارزش اخباری مثبت (PPV) ۱۰۰ درصد محاسبه شد. حساسیت کشت خون (۲۶ درصد) و رنگ‌آمیزی با اکریدین اورنج (۸۳ درصد) از نظر آماری اختلاف معنی‌داری داشتند ($p<۰/۰۰۱$).

۲۰ مورد (۱۹/۸ درصد) از ۱۰۱ بیمار مشکوک به سپتی‌سمی دارای کشت خون مثبت بودند؛ در صورتی‌که از ۶۵ بیمار با تشخیص نهایی سپتی‌سمی، ۱۷ بیمار کشت خون مثبت داشتند. در حالی که در آزمایش رنگ‌آمیزی با اکریدین اورنج ۵۴ نمونه (۵۳/۴ درصد) مثبت بودند که تمامی آنها در گروه بیماران با تشخیص نهایی سپتی‌سمی بودند. لذا نتایج کشت خون و رنگ‌آمیزی با اکریدین اورنج با یکدیگر همسو نبودند و ضریب کاپای ۲۹/۹ درصد به دست آمد.

بحث

همانطور که مشاهده شد، حساسیت کشت خون (۲۶ درصد) و رنگ‌آمیزی با اکریدین اورنج (۸۳ درصد) از نظر آماری اختلاف معنی‌داری با هم داشتند و با هم همسو نبودند، بطوری که ضریب کاپای ۲۹/۹ درصد به دست آمد.

در تحقیقی که سال ۱۳۷۷ در بیمارستان قدس قزوین به وسیله دکتر پرویز ایازی و همکاران انجام شد، میزان حساسیت کشت خون ۱۸ درصد بود(۶) که کمتر از مطالعه حاضر بود.

در این مطالعه، حساسیت، ویژگی و ارزش اخباری مثبت رنگ‌آمیزی با اکریدین اورنج به ترتیب ۸۳، ۱۰۰ و ۱۰۰ درصد بود. در تحقیقی که در دانشگاه علوم پزشکی تهران انجام گرفت، حساسیت و ویژگی رنگ‌آمیزی با اکریدین اورنج به ترتیب ۷۶ و ۸۹ درصد بود (۷). در مطالعه‌ای که در شهر لیدز انگلستان انجام شد، حساسیت و ویژگی رنگ‌آمیزی با اکریدین اورنج به ترتیب ۸۷ و ۹۴ درصد بود (۸).

در مطالعه دیگری که در ایتالیا انجام شد، حساسیت رنگ‌آمیزی به روش فلورسانس ۹۰/۹ درصد بود (۹). در تحقیق دیگری که در هندوستان انجام شد، کشت خون ۳۳ نوزاد (۳۳ درصد) از یک‌صد نوزادی که از نظر بالینی مبتلا به سپتی‌سمی بودند مثبت شد، ولی آزمایش رنگ‌آمیزی بافی‌کوت با اکریدین‌اورنج در ۷۶ نوزاد (۷۶ درصد) مثبت شد و حساسیت آن ۹۴/۳ درصد بود (۱۰).

با توجه به نتایج به‌دست آمده، لزوم استفاده از آزمایش‌های تشخیصی سریع مانند رنگ‌آمیزی بافی‌کوت با اکریدین اورنج که هم بتواند نقایص موجود در کشت را جبران کند و هم در تشخیص سریع میکروارگانیسم‌ها کمک کند امری اجتناب‌ناپذیر است. بنابراین آزمایش رنگ‌آمیزی بافی‌کوت با اکریدین اورنج در تشخیص سپتی‌سمی بسیار باارزش است.

برای بهبود حساسیت کشت خون پیشنهاد می‌شود از محیط‌های کشت با کیفیت بهتر، محیط‌های کشت اختصاصی، سیستم خودکار، کارکنان مجرب و دارای دانش لازم، مراقبت در رعایت نوبت‌های کار تعیین‌شده برای کارکنان آزمایشگاه، ایجاد امکانات تشخیصی جهت میکروب‌های بی‌هوازی اختیاری و عدم تجویز آنتی‌بیوتیک سرپایی در مواردی که به بستری نیاز است، استفاده شود (۱). هم‌چنین پیشنهاد می‌شود در بیماران مشکوک به سپتی‌سمی، کشت خون و آزمایش رنگ‌آمیزی باف کوت با اکریدین اورنج به صورت توأم انجام شود. بدین ترتیب می‌توان در تشخیص و درمان سریع بیماران و در نتیجه کاهش میزان مرگ و میرها و هزینه‌های بیمارستانی قدم‌های مؤثری برداشت (۲،۱).

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از شورای پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی قزوین که در تأمین هزینه طرح یاری نمودند و هم‌چنین خانم ژیلا پوررضایی سپاسگزاری می‌شود.

REFERENCES

1. Feigin RD, Cherry JD. Textbook of pediatric infectious diseases. 5th ed. Philadelphia, Pa: W.B. Saunders; 2004: 810-11.

2. Behrman RE, Kleigman RM, Jenson HB. Nelson textbook of pediatrics. 17th ed. Philadelphia, Pa: W.B. Saunders; 2004:845-50.

3. Remington JS, Klein JO. Infectious diseases of the fetus and newborn infant. 5th ed. Philadelphia: W. B. Saunders; 2001:944-45.

Archive of SID

www.SID.ir

4. DuPont HL, Spink WW. Infections due to gram-negative organisms: an analysis of 860 patients with bacteremia at the University of Minnesota Medical Center, 1958-1966. Medicine (Baltimore) 1969;48(4):307-32.

5. Baron EJ. Bailey and scott's diagnostic microbiology. 10th ed. St Louis, MO: Mosby; 1988:149.

۶. ایازی پ و همکاران. مقایسه کاربرد کشت خون و اندازه‌گیری آندوتوکسین در تشخیص عفونت‌های ناشی از میکروارگانیسم‌های گرم منفی. مجله دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی-درمانی قزوین، ۱۳۸۲؛ شماره ۲۹، زمستان، صفحات ۲۵ تا ۲۹.

۷. حقی آشتیانی م و همکاران. تشخیص سریع سپتی‌سمی از یافته‌های هماتولوژیک. مجله بیماری‌های کودکان ایران، ۱۳۷۲؛ سال پنجم، شماره ۲، شهریور، صفحات ۱۱۹ تا ۱۳۰.

8. Rushforth JA, Hoy CM, Kite P, Puntis JW. Rapid diagnosis of central venous catheter sepsis. Lancet 1993;342:402-3.

9. Fazii P, Ciancaglini E, Riario Sforza G. Differential fluorescent staining method for detection of bacteria in blood cultures, cerebrospinal fluid and other clinical specimens. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2002;21(5):373-78.

10. Gupta SK, Sharma U, Gupta ML, Sharma DK. Acridine orange stain--a rapid method for diagnosis of neonatal septicemia. Indian Pediatr 1989;26(2):153-55.

Archive of SID

www.SID.ir