

## مقایسه کشت خون و بافی کوت رنگ آمیزی شده با اکریدین اورنج در تشخیص سپتی سمی ناشی از میکرووارگانیسم‌ها

دکتر پرویز ایازی، دکتر محمدمهری 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 سپتی سمی انجام می‌شوند. در این مطالعه، دو روش رنگ آمیزی بافی کوت با اکریدین اورنج و کشت خون در تشخیص سپتی سمی ناشی از میکرووارگانیسم‌ها مقایسه شدند.

**روش بررسی:** در این مطالعه مقطعی، از ۱۰۱ بیمار مشکوک به سپتی سمی بستری در بیمارستان قدس شهرستان قزوین در سال‌های ۱۳۷۹ و ۱۳۷۸ نمونه کشت خون گرفته شد و آزمایش رنگ آمیزی بافی کوت با اکریدین اورنج و کشت خون در تشخیص سپتی سمی مقایسه شد. مطابقت دو روش با استفاده از ضریب کاپا مورد ارزیابی قرار گرفت.  
**یافته‌ها:** از ۱۰۱ نمونه کشت خون، ۲۰ (۱۹/۱ درصد) مورد آن مثبت شد و حساسیت و ویژگی آن به ترتیب ۲۶ و ۹۲ درصد بود. آزمایش رنگ آمیزی 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 رنگ آمیزی با اکریدین اورنج در تشخیص سپتی سمی ارزش بسیار بالای دارد.

**واژگان کلیدی:** آزمایش اکریدین اورنج، کشت خون، سپتی سمی، بافی کوت.

### مقدمه

باکتریمی و سپتی سمی ایجاد می‌شود. شوک عفونی اغلب ناشی از عفونت با میکرووارگانیسم‌های گرم منفی است، اما عفونت با میکرووارگانیسم‌های گرم مثبت نیز می‌تواند منجر به شوک عفونی شود (۱).

میزان بروز شوک عفونی متعاقب باکتریمی و سپتی سمی مشخص نیست، اما مرگ و میر آن زیاد است، به طوری که میزان مرگ ناشی از شوک عفونی در گزارش Spink و Dupont حدود ۹۸ درصد بوده است (۲-۶).

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

سپتی سمی 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 خطربناک عفونی ایجاد می‌شوند (۲، ۱). به عنوان مثال، منژیت 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

آدرس نویسنده مسئول: تهران، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، گروه اطفال، دکتر پرویز ایازی

(email: parviz\_ayazi@yahoo.com)

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۵/۳/۶

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۸۷/۴/۳۱

## کشت خون و آزمایش اکریدین اورنج در تشخیص سپتیسمی

ابتدا محلول ذخیره رنگ اکریدین اورنج با غلظت یک گرم درصد در آب مقطر تهیه شد و سپس ۵ میلی لیتر از رنگ ساخته شده با ۵ میلی لیتر محلول با فراستات ۰/۲ مولار (pH=۴) رقیق شد و تمام اسلامیدها همراه اسلامید 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 سدیماناتسیون، 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) مذکور 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 لتاژی (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 آئروژنوزا، 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

تشخیص سریع باید جزو امکانات اولیه آزمایشگاه‌های تشخیصی بیمارستان‌ها به خصوص بیمارستان‌های آموزشی باشد که یکی از این روش‌ها آزمایش رنگآمیزی با اکریدین اورنج است (۶،۲). در این مطالعه، دو روش رنگآمیزی بافی کوت 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، تاکی کاردی، برادی کاردی، آپنه، دیسترس تنفسی، تحریک‌پذیری، لتاژی، کما، اسهال و استفراغ بودند (۲). از هر یک از بیماران، یک میلی لیتر خون گرفته شد و به ویال‌های حاوی ۱۰ میلی لیتر 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 سانتی گراد قرار داده شدند و در فواصل زمانی ۱۶ ساعت، ۴۸ ساعت و یک هفته بر روی محیط‌های کشت Mac Conkey و Blood 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 کواگولاز، 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 BBL MicroBiology products آلمان استفاده شد. ابتدا هم‌زمان با انجام کشت خون، ۱ میلی لیتر خون از بیماران گرفته شد و به ویال‌های استریل حاوی اتیلن دی‌آمینوتراستیک اسید (EDTA) اضافه شد. سپس با استفاده از میکروتیوب‌ها و دستگاه سانتریفیوژ، میکروهماتوکریت کنسانترهای از گلبول‌های سفید (بافی کوت) تهیه و بلا فاصله دو اسلامید از بافی کوت خون آماده شد. سپس اسلامیدها با متانول ثابت (Fix) شد و با محلول رنگ اکریدین اورنج یک درصد مطابق روش زیر رنگآمیزی شد (۵).

در مطالعه دیگری که در ایتالیا انجام شد، حساسیت رنگ آمیزی 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 رنگ آمیزی بافی کوت با اکریدین اورنج در ۷۶ نوزاد (۷۶ درصد) مثبت شد و حساسیت آن ۹۴/۳ (۱۰).

با توجه به نتایج به دست آمده، لزوم استفاده از آزمایش‌های تشخیصی سریع مانند رنگ آمیزی بافی کوت با اکریدین اورنج که هم بتواند نقاچیس موجود در کشت را جبران کند و هم در تشخیص سریع میکرووارگانیسم‌ها کمک کند امری اجتناب‌ناپذیر است. بنابراین آزمایش رنگ آمیزی بافی کوت با اکریدین اورنج در تشخیص سپتیسمی بسیار بالرزش 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 تعیین شده برای کارکنان آزمایشگاه، ایجاد امکانات تشخیصی جهت میکروب‌های بی‌هوایی اختیاری و عدم تجویز آنتی‌بیوتیک سرپایی در مواردی که به بستره نیاز است، استفاده شود (۱). همچنین پیشنهاد می‌شود در بیماران مشکوک به سپتیسمی، کشت خون و آزمایش رنگ آمیزی 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 پاری نمودند و همچنین خانم ژیلا پورراضی سپاسگزاری می‌شود.

سپتیسمی، آزمایش رنگ آمیزی با اکریدین اورنج در ۵۴ بیمار (۸۳ درصد) مثبت و در ۱۱ بیمار (۱۷ درصد) منفی بود. حساسیت آزمایش رنگ آمیزی با اکریدین اورنج ۸۳ درصد، ویژگی ۱۰۰ درصد و ارزش اخباری مثبت (PPV) ۱۰۰ درصد محاسبه شد. حساسیت کشت خون (۲۶ درصد) و رنگ آمیزی با اکریدین اورنج (۸۳ درصد) از نظر آماری اختلاف معنی‌داری داشتند (۱) (p<0.001).

۲۰ مورد (۱۹/۸ درصد) از ۱۰۱ بیمار مشکوک به سپتیسمی دارای کشت خون مثبت بودند؛ در صورتی که از ۶۵ بیمار با تشخیص نهایی سپتیسمی، ۱۷ بیمار کشت خون مثبت داشتند. در حالی که در آزمایش رنگ آمیزی 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 رنگ آمیزی 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 رنگ آمیزی 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 رنگ آمیزی با اکریدین اورنج به ترتیب ۸۳، ۱۰۰ و ۱۰۰ درصد بود. در تحقیقی که در دانشگاه علوم پزشکی تهران انجام گرفت، حساسیت و ویژگی رنگ آمیزی با اکریدین اورنج به ترتیب ۷۶ و ۸۹ درصد بود (۷). در مطالعه‌ای که در شهر لیدز انگلستان انجام شد، حساسیت و ویژگی رنگ آمیزی با اکریدین اورنج به ترتیب ۸۷ و ۹۴ درصد بود (۸).

### 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. 17<sup>th</sup> 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.

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 آندوتوكسین در تشخیص عفونت‌های ناشی از میکروارگانیسم‌های گرم منفی. مجله دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی-درمانی قزوین، ۱۳۸۲؛ ۲۹، شماره ۱۳۷۲، 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.