بررسی سطح اندوتوکسین خون بیماران همودیالیزی و مقایسه آن با کشت خون

دكتر حاجيه قاسميان صفايي ، دكتر رحمت الله يزداني ، دكتر فرح تاج نواب اكبر ، * ژينا وزير زاده ،

چکیده

مقدمه: یکی از علل مرگ و میر در بیماران همودیالیزی باکتریمی بوده که حدود نیمی از موارد آن ناشی از باکتریهای گرم منفی می باشد. آزاد شدن اندوتوکسین ناشی از لیز این باکتریها در خون منجر به ایجاد پاسخهای التهابی و دفاعی شدید در بدن شده و در صورت عدم درمان سریع و مؤثر منتهی به شوک عفونی و در نهایت مرگ بیمار می گردد. هدف از این مطالعه، اندازه گیری سطح اندوتوکسین خون در بیماران مبتلا به باکتریمی ناشی از باکتریهای گرم منفی به روش (Limulus Amebocyte (LAL-test) می باشد و با توجه به اینکه این روش در مقایسه با کشت خون نیاز به مدت زمان بسیار کوتاهتری دارد، کاربرد آن در شناسایی سریع مبتلایان و تشخیص اندوتوکسمی مورد توجه قرار گرفته است .

روش بررسی: مطالعه در سه مرحله اجرا گردید: در مرحله اول ۲۷۸ نمونه کشت خون از بیماران همودیالیزی جمع آوری و باکتریهای بیماری زا از کشت های خون مثبت ایزوله و شناسایی گردیدند. در مرحله دوم حساسیت باکتریها به آنتی بیوتیک های مورد مطالعه بررسی گردید. در مرحله سوم سطح اندو کسین خون بیماران مبتلا به باکتریمی ناشی از باکتریهای گرم منفی با آزمایش لیمولوس اندازه گیری شد. کیت مورد استفاده در این روش E-toxate محصول شرکت زیگما می باشد.

نتایج: در این مطالعه، شیوع باکتریمی در بیماران همودیالیزی ۱۳/۶٪ به دست آمد . شیوع باکتریمی ناشی از باکتریهای گرم منفی در کشت های مثبت کشت های مثبت گزارش شد و پاتوژن غالب اشرشیاکلی بود . همچنین بیشترین ایزوله کلینیکی در باکتریهای گرم مثبت استافیلو کوک اورئوس بود . میانگین سطح اندوتو کسین خون بیماران $^{\rm Eu}/_{\rm ml}$ به دست آمد و حساسیت روش به کار رفته (Gel – Clot) $^{\rm Clot}$ که محاسبه گردید .

مقایسه نتایج حاصل از کشت خون بیماران و LAL - test در باکتریهای گرم منفی تفاوت آماری معنی داری را نشان نداد.

نتیجه گیری: روش LAL-test در زمانی کمتر از دو ساعت جواب داده و نتایج به سرعت توسط پزشک قابل دسترس می باشد و می تواند به عنوان یک روش سریع و قابل اعتماد در شناسایی بیماران مبتلا به باکتریمی ناشی از باکتریهای گرم منفی به کار رود ولیکن باید در نظر گرفته شود که این تست بسیار حساس می باشد و در صورتی می توان با اطمینان کامل آن را جایگزین کشت خون نمود که تمام مراحل انجام آزمایش در شرایط کاملاً استریل و عاری از اندو توکسین انجام پذیرد.

واژه های کلیدی: باکتریمی، اندو توکسین، همودیالیز، LAL

مقدمه

امروزه دسترسی وسیع به دیالیز موجب افزایش طول عمر هزاران نفر از بیماران مبتلا به نارسایی پیشرفته کلیوی شده است. همودیالیز رایج ترین روش دیالیز است که می تواند از

** ع- نویسنده مسئول – کارشناس ارشد میکروب شناسی، آدرس: ســـازمان تــأمین اجتماعی – اصفهان همراه:۰۹۱۳۱۱۷۲۲۰۸، نمایر: ۰۹۱۳۱۱۷۲۲۸ نمایر: ۳۳۱۸ - ۲۳۱۰ E mail: Vazirzadeh2006@yahoo.com ۲،۱ و۳ – استادیار گروه میکروب شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی اصفهان تاریخ دریافت:۸۴/۱۰/۱۵

مرگ بیماران جلوگیری کند، اما نمی تواند به طور کامل جایگزین عملکرد کلیه شود و بیمار در معرض مشکلات و عوارض متعددی قرار دارد (۱).

یکی از علل منجر به مرگ در میان بیماران با همودیالیز مزمن باکتریمی می باشد که عمدتاً به علت وجود ریسک فاکتورهایی مانند: دیالیزهای مستمر و طولانی مدت ، ضعیف بودن سیستم ایمنی ، بیماریهای زمینه ای ، کاتتر گذاری و ایجاد فیستول جهت دسترسی به گردش خون بیمار ، آلودگی باکتریایی آب مصرفی و دیالیزات، روشهای ضد عفونی کننده نامناسب و مصرف انواع مختلف داروها که منجر به تغییر فلور طبیعی بدن و ایجاد محیط مناسب جهت تهاجم و کولونیزاسیون طیف وسیعی از باکتریها می گردد، می باشد (۲٬۳۳).

با توجه به مطالعات انجام شده ، حدود نیمی از موارد باکتریمی ناشی از باکتریهای گرم منفی می باشد و شیوع آن ۷۰۰۰۰ تا ۲۳۰۰۰ مورد در سال تخمین زده می شود . افزایش شیوع باکتریمی ناشی از باکتریهای گرم منفی در ۲۵ سال اخیر ناشی از فاکتورها و عوامل متعددی مانند افزایش استفاده از روشهای فاکتورها و عوامل متعددی مانند افزایش استفاده از روشهای تشخیصی تهاجمی که به علت نفوذ در مناطق استریل بدن مهاجرت و استقرار باکتریها را از بافت محیطی تقویت می کنند، استفاده گسترده از آنتی بیوتیک های وسیع الطیف و دارو درمانی که موجب کاهش فلور نرمال شده و شرایط را برای تهاجم و استقرار باکتریهای گرم منفی مهیا می کنند، جراحیهای دستگاه معدی – روده ای ، مجاری صفراوی و ادراری می باشد .

موقع باکتریمی در بیماران به منظور کاهش مرگ و میر و عوارض ذکر شده حائز اهمیت فراوان می باشد . جهت دستیابی به این هدف ، به نظر می رسد اندازه گیری اندوتو کسین خون در مقایسه با روشهای باکتریولوژیک مرسوم مانند کشت خون ، نیاز به مدت زمان بسیار کوتاهتری داشته و همچنین با توجه به مصرف آنتی بیوتیک در بعضی از بیماران که منجر به منفی شدن کشتهای خون می گردد ، روش LAL-test با تشخیص اندوتو کسین ناشی از متلاشی شدن و لیز باکتریها کمک مؤثری در شناسایی بیماران می نماید (۶)

روش بررسي

این مطالعه توصیفی از مهرماه ۱۳۸۱ تا پایان خرداد ماه ۱۳۸۲ انجام گرفت. جمعیت مورد بررسی بیماران همودیالیزی تحت پوشش مراکز همودیالیز شهرستان اصفهان (بیمارستان شریعتی، حضرت علی اصغر (ع)، الزهرا و حجتیه) بودند.

حجم نمونه ۲۷۸ نفر بود که به روش نمونه گیری آسان انتخاب گردیدند . نمونه گیری در دو مرحله انجام گرفت. در مرحله اول ۵ سی سی خون جهت کشت خون در محیطهای بی فازیک از بيماران گرفته شد. در مرحله دوم، جهت تعيين سطح اندوتو کسین خون ۴ سی سی خون هیارینه از بیماران گرفته شد و پس از سانتریفوژ و جدا کردن پلاسما در ۲۰-درجه سیلسیوس نگهداری شد. محیط های کشت خون روزانه کنترل شده و با توجه به مشاهدات ماكروسكويي و ساب كالچر در محيط هاي EMB ، بلاد آگار وشکلات آگار، باکتریهای بیماری زا به وسیله آزمایشات بیوشیمیایی افتراقی از کشتهای خون مثبت ایزوله و شناسایی گردیدند. همچنین حساسیت باکتریها به آنتی بیوتیک های مورد مطالعه به وسیله روش کـاربی بـائر تعیـین گردید (۷) جهت تعیین سطح اندو تو کسین خون بیمارانی که مبتلا به باکتریمی ناشی از باسیل های گرم منفیی بودند از آزمــایش لیمولـوس Limulus Amebocyte Lysate (LAL-test) استفاده شد . این روش بر اساس انعقاد یک يروتئين گرفته شده از سلولهاي خوني خرچنگ ليمولوس په وسيله اندو تو كسين موجود در نمونه عمل مي نمايد .(A) (Gel-Clot LAL)

جهت تعیین سطح اندوتو کسین به روش نیمه کمی ، کیت تجاری E-toxate ، محصول شرکت زیگما به کار برده شد .

معرفهای موجود E-toxate ,Endotoxin standard . Water معرفهای موجود در کیت endotoxin free بوده که طبق دستورالعمل موجود در کیت آماده شدند. همچنین تهیه رقت های مختلف از استاندارد، روش آزمایش و تفسیر نتایج بر اساس جداول موجود در دستور کار کیت انجام گرفت .

جـهت خارج کـردن ممـانـعت کننـده هـای پـلاسمـایی از تکنیک (Haris etal) پـلاسمـایی از تکنیک استفاده شد (۱۹۹۹)

سطح اندو تو کسین در نمونه های مثبت بر حسب $^{\rm EU}/_{
m ml}$ بر اساس فرمول ذکر شده در کیت محاسبه گردید :

عكس بالاترين ضريب رقت نمونه مثبت ضربدر پايين ترين غلظت استاندارد اندوتو كسين كه مثبت شده است.

Hard gel = (+)

Absence of gel = (-)

نتايج

نتایج حاصل از انجام آزمایشات باکتریولوژیک در مورد کشت خون بیماران نشان داد که ۳۸ نفر معادل ۱۳/۶٪ مبتلا به باکتریمی ناشی از باسیل های گرم منفی و کوکسیهای گرم مثبت بودند. باسیل های گرم منفی در ۱۷ نفر شناسایی شدند که معادل ۴۵٪ کل نمونه های مثبت از نظر باکتریمی بود و کوکسی های گرم مثبت از ۲۱ نمونه ایزوله گردید بود و کوکسی های گرم مثبت از ۲۱ نمونه ایزوله گردید باکتریمی ناشی از باسیل های گرم منفی به وسیله LAL-test باکتریمی ناشی از باسیل های گرم منفی به وسیله آن در خون اندازه گیری شد و میانگین آن ۱۰۸۸ ± ۱۰۸۹ (SEM) به دست آمد (جدول ۱) همچنین نتایج حاصل از کشت های خون مثبت و گردید .(جدول ۲) همچنین نتایج حاصل از کشت های خون مثبت و گردید .(جدول ۲)

با توجه به موارد مثبت و منفی کاذب به دست آمده ، حساسیت آزمایش ۸۸٪ و ویژگی آن ۹۵٪ به دست آمد .

محاسبه:

a: مثبت حقیقی

مثبت کاذب :
$$\frac{a}{a+c} = \frac{10}{10} = \frac{10}{10} = -\infty$$
 مثبت کاذب : $\frac{d}{a+b+d} = \frac{10}{10} = \frac{10}{10}$ هنفی حقیقی : $\frac{d}{a+c} = \frac{10}{10} = -\infty$ و یژگی منفی حقیقی : $\frac{d}{a+c} = -\infty$

نتایج حاصل از مقایسه کشت خون و LAL-test در باکتریهای گرم مثبت و گرم منفی در (جدول ۳) آورده شده است. در باکتریهای گرم منفی نتایج LAL و کشت خون از نظر آماری اختلاف معنی داری ندارد.

همچنین با تعیین فراوانی نسبی باکتریمی در بیماران همودیالیزی مشخص شد که باکتری غالب در باسیل های گرم منفی اشرشیاکلی (۳۵٪) و در کوکسی های گرم مثبت استافیلوکوک اورئوس (۴۲٪) بود.

جدول ۱: نتایج حاصل از تعیین سطح اندوتو کسین به تفکیک نوع باکتری بر حسب $^{
m EU}/_{
m ml}$

غلظت اندوتوكسين	نوع باكترى	شماره
16/4	اشرشيا كلى	١
V/9	اشرشيا كلى	۲
٧/۶	اشرشيا كلى	٣
٧/۶	پسودوموناس آئروژينوزا	۴
٣/٨	اشرشيا كلى	۵
٣/٨	آنتروباكتر آئروژنز	۶
٣/٨	اشرشيا كلى	٧
٣/٨	اسينتوباكتر كاكلواستيكوس	٨
1/97	آنتروباكتر آئروژنر	٩
•/99	اشرشيا كلى	١.
•/99	كلبسيلا پنومونيه	11
•/۴٨	كلبسيلا ينومونيه	١٢
•/\$A	آنتروباكتر آئروژنز	١٣
•/44	كلبسيلا پنومونيه	14
•/1٢	آنتروباكتر آئروژنز	10

Mean \pm SEM : $\Upsilon/\Lambda = 1/\Lambda EU/ml$

نتایج تعیین حساسیت باکتریها نسبت به آنتی بیوتیک ها مشخص نمود که در باکتریهای گرم منفی بیشترین موارد حساسیت باکتریها نسبت به سیپروفلوکساسین (۱۰۰٪) و سفتازیدیم (۸۸٪) بود و در باکتریهای گرم مثبت وانکومایسین (۹۸٪) و سفوتاکسیم (۱۸٪) بیشترین درصد حساسیت را به خود اختصاص دادند.

لازم به ذكر است جهت توصيف يافته ها از روشهاى آمارى توصيفى ، تهيه جداول توزيع فراوانى ، رسم نمودار، فرمول مقايسه دو نسبت و برآورد فراوانى هاى نسبى استفاده شد .

جدول ۲: مقایسه نتایج کشت خون مثبت و LAL-test در باکتریهای گرم منفی به تفکیک نوع باکتری

LAL-test منفی	LAL-test مثبت	کشت خون مثبت	باكترى
-	۶	۶	اشرشيا كلى
1	۴	۵	آنتروباكترائروژنز
1	٣	۴	كلبسيلاپنومونيه
-	١	١	پسو دو مو ناس ائروژنوزا
_	1	١	اسينتوباكتركاكلواستيكوس
۲	۱۵	١٧	جمع

جدول ۳: مقایسه نتایج کشت خون مثبت و LAL-test در باکتریهای گرم مثبت و گرم منفی

P value	LAL-test	كشت خون	باكترى
	مثبت	مثبت	
>:/.۵	10	١٧	باکتریهای گرم منفی
< '/.۵	١	71	باکتریهای گرم مثبت
	18	٣٨	جمع

نتيجه گيري

لیپوپلی ساکارید باکتریهای گرم منفی به عنوان مهمترین توکسین در ایجاد شوک عفونی مورد توجه و بررسی محققین قرار گرفته است. مرگ و میرهای مرتبط با شوک عفونی ۶۰-۳۵ درصد گزارش شده اند و می توان این بیماری را سیزدهمین عامل مرگ در دنیا محسوب کرد. اثبات عفونت ناشی از باکتریهای گرم منفی در خون از طریق فاکتورهای کلینیکی ساده مشکل می باشد، به طوری که در ایالات متحده تشخیص بیماری توسط یزشکان به بیش از ۴۰ درصد نمی رسد (۱۰).

لذا سالهای متمادی است که پزشکان در تـلاش بـرای تـشخیص سریع وجود اندوتوکسین در خون بیماران مبتلا به باکتریمی ناشی از باکتریهای گرم منفی می باشند تا از این طریق درمان های آنتی

بیوتیکی اختصاصی در مراحل اولیه بیماری شروع شود و قدرت اثر بخشی آنها افزایش یابد. داروهای جدیدی نیز مانند آنتی بادی های منو کلونال ضد اندوتو کسین ابداع شده اند که باید بلافاصله پس از آغاز علایم بیماری تجویز گردند و با توجه به اینکه نتایج کشت خون حداقل ۲-۲ روز بعد از نمونه گیری مشخص می شود و برای تشخیص اندوتو کسمی نیز کافی نمی باشد ضرورت دسترسی به یک روش تشخیصی سریع و آسان در مراحل ابتدایی بیماری آشکار می گردد (۱۱٬۱۱۲).

Levin در سال ۱۹۷۰ ، با استفاده از تحقیقات دکتر Levin آزمایش لیمولوس را ابداع نمود و آن را به عنوان یک روش حساس و سریع جهت تشخیص اندوتو کسین جایگزین روشهای قدیمی نمود (۱۳).

هدف از ایس تحقیق ، ارزیابی آزمایش لیمولوس در تعیین اندوتو کسین خون مبتلایان به باکتریمی ناشی از باکتریهای گرم منفی و نتیجتاً شناسایی سریع باکتریمی بود و با توجه به اینکه بیماران همودیالیزی نیاز به تشخیص و درمان سریع عفونت های باکتریایی دارند، می توان در صورت بدست آوردن ارتباط مناسب با نتایج کشت خون از این آزمایش برای تشخیص استفاده کرد.

در این مطالعه ۱۷ مورد باکتریمی ناشی از باکتریهای گرم منفی شناسیایی گردید و LAL-test در مورد آنان انجام شد . ۱۵ نمونه دارای تست مثبت اندو توکسین بودند (۸۸٪) ، در مطالعه Levin این نسبت ۷۷ درصد گزارش شد (۱۳).

جهت تعیین میانگین سطح اندوتو کسین ، طبق دستور العمل موجود در کیت به روش تیتراسیون ، غلظت اندوتو کسین آزاد شده در خون در هر یک از نمونه ها تعیین و میانگین آن Λ^{EU}/m به دست آمد .

Danner در یک مطالعه غلظت اندو تو کسین را در بیماران خود با علائم بالینی مشابه مطالعه حاضر 4.4 ± 4.4 گزارش نمود ((17) جهت تعیین حساسیت و ویژگی تست ، نمونه پلاسمای بیماران مبتلا به با کتریمی ناشی از با کتریهای گرم مثبت نیز مورد آزمایش قرار گرفت و با توجه به مقایسه تست با کشت خون به عنوان استاندار د طلابی ، حساسیت (10.4) و ویژگی (10.4) به دست آمد.

در مطالعه Peaeson (۱۹۹۵) حساسیت ۹۰٪ و ویژگی ۹۵٪ و Shnep (۱۹۹۸) حــساسیت ۹۰٪ و ویژگــی ۸۱٪ را بــه دســت آوردند ^(۹).

مقایسه نتایج حاصل از کشت خون و LAL در باکتریهای گرم منفی ، از نظر آماری تفاوت معنی داری را نشان نداد . ولی این تفاوت در مورد کوکسی های گرم مثبت معنی دار بود $P < \cdot \cdot \cdot \circ$.

در مطالعه Danner (۱۹۹۴) و Hurley) و Hurley) نتایج حاصل از کشت خون و LAL در باکتریهای گرم منفی تفاوت معنی داری را نشان نداد $(^{(17)})$.

لذا مطالعه حاضر با نتایج حاصل از دو تحقیق اخیر مطابقت دارد. در مطالعات مشابهی که جهت ارزیابی تعیین سطح اندو توکسین در تشخیص باکتریمی ناشی از باکتریهای گرم منفی انجام شده نتایج مثبت و منفی کاذب نیز ذکر شده است که گهگاه در آزمایش تداخل ایجاد می کنند.

موارد مثبت کاذب عبارتند از:

1- در عفونت های موضعی ناشی از باکتریهای گرم منفی ، احتمال آزاد شدن اندو توکسین در خون بدون باکتریمی وجود دارد $\frac{(1)}{1}$.

۲- نارسایی حاد شکم نیز یک پدیده شایع بوده که در اثر جابجایی اندوتو کسین از دستگاه هاضمه به خون در اندوتو کسمی روده ای بدون باکتریمی به اثبات رسیده است (۱۰).

۳-واکنش مثبت گلوکان دیواره سلولی قارچها به آزمایش لیمولوس ، به طوری که Bates در مطالعه خود وجود عفونت های قارچی را به وسیله آزمایش لیمولوس شناسایی نمه د (۱۰).

۴- حضور اندو تو کسین در محیط ، آلودگی ظروف و ابزار مورد نیاز و عدم رعایت تکنیک های استریل در جمع آوری نمونه ها مثبت کاذب در آزمایش ایجاد می کند (۱۰۰).

۵- موارد مثبت در اثر مصرف داروهای گوگردی نیز گزارش شده است (۱۰۰)

در این مطالعه ابزار و لوازم مورد نیاز با روش ذکر شده در دستورالعمل کیت ، عاری از اندو توکسین گردید و آلودگیهای محیطی به حداقل رسانده شد ، سپس جهت اطمینان در هر سری از آزمایشات یک نمونه کنترل منفی قرار داده شد . همچنین تا حد امکان سعی شد بیماران مورد مطالعه فاقد علایم گوارشی ، عفونت های موضعی و قارچی می باشند .

نتایج منفی کاذب عبارتند از:

۱- تعداد معدود باکتری در خون که نتوانسته است اندوتوکسین قابل ملاحظه ای در سطح حساسیت آزمایش آزاد کند (۱۰۰).

۲-حضور ممانعت کننده های پلاسمایی به علت عدم تأثیر مناسب روشهای به کار رفته در خارج کردن آنها از محیط ، منجر به ایجاد نتایج منفی کاذب می گردد (۱۰).

۳- در بعضی از بیماریها ، دوره های گذرایی از اندوتو کسمی همراه با پاکسازی و تصفیه سریع اندوتو کسین از خون وجود دارد که منجر به عدم شناسایی اندوتو کسین می گردد (۱۰۰).

در مطالعه حاضر جهت حذف ممانعت کننده های پلاسمایی از بین روشهای متفاوت ، روش حرارتی - رقتی و از بین روش (Dilosion-heating) انتخاب شد که بر اساس مطالعات اخیر و همچنین تجربیات به دست آمده در این تحقیق بهترین روش حذف کنندگی می باشد (۹)

نتيجه گيري

نظر به اینکه آزمایش لیمولوس در زمانی کمتر از دو ساعت جواب می دهد ، به عنوان یک روش سریع و قابل اعتماد در شناسایی بیماران مبتلا به باکتریمی قابل استفاده می باشد و متعاقب این مسئله پزشکان می توانند جهت درمان اختصاصی و سریع بیماران از آنتی بادیهای منو کلونال ضد اندو تو کسین استفاده نمانند.

References

- I- Emil A. Tanagho ,Jack W, Mcaninch . Smith's General Urology 15 th ed, Mc Graw-Hill. co, companies 2000; 605-614.
- 2- William L . Henrich . Principles and Practice of Dialysis . A Wolters kluwer company 2^{nd} ed 1999:43-49 .
- 3- John . T . Daugirdas . Todds . Ing . Hand book of Dialysis . 3nd ed . Little , Brown company . 1998; 50-150.
- 4- Bailey scott's . *Diagnostic Microbiology* . 17 th ed, Mosby , 2002 ; 865-874.
- 5- Kenneth T. Text book of Bacteriology . uw-Madison Department of Bacteriology , 2002.
- 6- David W.Bates . Limulus Amebocyte Lysate Assay for Detection of Endotoxin in Patients with Sepsis Syndrome . CID 1998; 27: 582-591.
- 7- Connie R.Mahon , George M. Text book of Diagnostic Microbiology. 2 th ed, W.B Saunders company 2000; 997-1007.
- 8- Blechova R.D.pivodova: *LAL test-an Alternative*Method of Detection of Bacterial Endotoxin. Acta

 Vet.Brno 2001; 70: 291-296.

- 9- Robert I, Roth Francine C. Levin. Optimization of Detection of Bacterial Endotoxin in Plasma with the Limulus Test. J Lab Clin Med 1999;116: 153-61.
- 10- Mandell, Douglas, Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. 16 th ed, Philadelphia, 2005.
- 11- Baumgartner J-D. Heumann D. The HA-JA Monoclonal Antibody for Gram-Negative Sepsis. N E J Med 1999;325:281-20.
- 12- Greenman RL.sche in RMH. A Chtrolled Clinical Trial of E5 Murine Monoclonal IGm Antibody to Endotoxin in the Treatment of Gram Negative Sepsis. JAMA 1995; 266: 1097-102.
- 13- Dagata. parsonnet. Hospital-Acquired Infection Among Chronic Hemodialysis Patients. Am J of kidney Diseases.2000; 35: 1083-1088.
- 14- Antonia G.Emilia. L. Catheter Salvage in a Patients on Hemodialysis with Catheter-Related Bacteremia by Pseudomonas. Am J Nephrol 2001; 20: 496-497.

.