

Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό Ίδρυμα (Τ.Ε.Ι) Αθήνας**Σχολή Επαγγελματιών Υγείας και Πρόνοιας****Τμήμα Ιατρικών Εργαστηρίων****Τομέας Μικροβιολογίας****Εργαστήριο Κλινικής Μικροβιολογίας**

Υπεύθυνοι μαθήματος: Αγγελική Στάθη, B.sc., Ph.D., Ελένη Κρανωτάκη, M.sc., Ph.D.

Ημερομηνία	29/10/2012
Τίτλος εργαστηριακής άσκησης	ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΟΥΡΩΝ

1. Σκοπός

Η απομόνωση και ταυτοποίηση σε δείγμα ούρων μικροοργανισμών σε αριθμό αξιολογήσιμο για ύπαρξη ουρολοίμωξης, καθώς και ο έλεγχος ευαισθησίας των παθογόνων στα αντιβιοτικά.

2. Είδος Δείγματος - Λήψη

Το καλύτερο δείγμα είναι τα **πρώτα πρωινά ούρα (ή τουλάχιστον 4 ώρες παραμονής στην κύστη)**. Σε ορισμένες περιπτώσεις επειγόντων περιστατικών ή μη συνεργάσιμων ασθενών, εξετάζεται **τυχαίο δείγμα** ούρησης. Το δείγμα μεταφέρεται άμεσα στο εργαστήριο (<2 h), αλλιώς φυλάσσεται στους 4°C για 24h ή προσθέτουμε συντηρητικό (βορικό οξύ) για 24-48 h.

Υπερηβική παρακέντηση (Υ/Η)	} Νεογνά, βρέφη, νήπια χωρίς έλεγχο σφιγκτήρων Αλλάζεται κάθε μία ώρα
In&out καθετηριασμός	
Σακουλάκι (urobag)	
Λήψη 'cleancatch'	
Μέσο ρεύμα ούρησης	Μεγαλύτερα παιδιά, ενήλικες
Λήψη από ουρητηροστομία/κυστεοστομία	
Μόνιμος καθετήρας	

- Προηγείται πολύ καλό πλύσιμο και σκούπισμα των χεριών.
- Ακολουθεί καλό πλύσιμο 2 – 3 φορές της ουρογεννητικής περιοχής με νερό και σαπούνι και ιδιαίτερα για τα παιδιά τελικό ξέπλυμα με αποστειρωμένο φυσιολογικό ορό (όχι σκούπισμα).

♀ : Η περιοχή πλένεται επιμελώς με ανοικτά τα μεγάλα χείλη του αιδοίου, από μπροστά προς τα πίσω.

♂ : Η περιοχή πλένεται προσεκτικά, με τραβηγμένη την ακροποσθία έτσι ώστε να αποκαλύπτεται η βάλανος. **Παρουσία ανατομικής ανωμαλίας ή φίμωσης στα αγόρια, πρέπει να σημειωθεί στο παραπεμπτικό.**

- Στις έφηβες και ενήλικες γυναίκες, προηγείται της λήψης του δείγματος απομόνωση του κόλπου. Η λήψη πραγματοποιείται μετά την απομάκρυνση των μεγάλων χειλέων. Για λήψη Υ/Η και in & out καθετήρα πρέπει η περιοχή να καθαριστεί με χρήση ρονιδονειοδίνης (± οινόπνευμα στην Υ/Η)
- Για την αναζήτηση Μυκοβακτηριδίων συγκεντρώνονται όλα τα πρώτα πρωινά ούρα τριών διαδοχικών ημερών και συντηρούνται στο ψυγείο μέχρι τον εμβολιασμό τους.

- Ακατάλληλα δείγματα: ούρα 24 ώρου, άκρο ουροκαθετήρα, ούρα από το σακουλάκι μόνιμου ουροκαθετήρα, ούρα από ουροσυλλέκτη με διαρροή, ούρα >2 ωρών χωρίς ψύξη και συντηρητικό.

3. Υλικά / Αντιδραστήρια

- Θρεπτικά υλικά

McConkey άγαρ Νο2 (N2)
Σοκολατόχρωμο άγαρ (Choc)
Αιματούχο άγαρ (Ht)
Sabouraud άγαρ (Sb)

- Σωληνάρια με φυσιολογικό ορό όγκου 4mL ή αμπούλες 5mL.

4. Εξοπλισμός

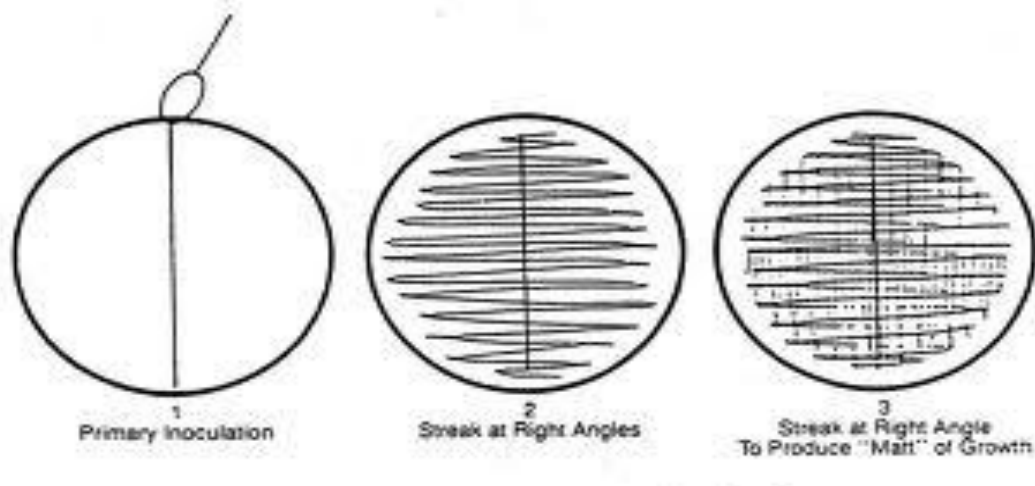
- Λυχνία Bunsen
- Κρικοφόροι συλεις
- Βαθμονομημένοι κρίκοι 1μl ή 10μL
- Αερόβιος επωαστικός κλίβανος 35°C, επωαστικός κλίβανος CO₂ 35°C και Αερόβιος επωαστικός κλίβανος 30°C

5. Εμβολιασμός

- Αριθμούμε τα δείγματα και τα παραπεμπτικά με βάση τα Βιβλία των καλλιέργειών ούρων Εξωτερικών Ιατρείων και Κλινικών.
- Σε όλες τις καλλιέργειες κάνουμε γενική ούρων και βλέπουμε ίζημα, ανεξάρτητα αν αυτό ζητείται.
- Στα Βιβλία σημειώνουμε αν η καλλιέργεια είναι Υ/Η και οτιδήποτε άλλο γράφει το παραπεμπτικό. Π.χ. ηλικία, ιστορικό, συμπτώματα, λήψη αντιμικροβιακών (θεραπεία ή χημειοπροφύλαξη).
- Ο υπεύθυνος των λήψεων των ούρων, πρέπει να σημειώνει στο παραπεμπτικό αν ο ασθενής παίρνει φάρμακα ή αν υπάρχει φίμωση στα αγόρια ή σύμιση χειλέων στα κορίτσια.
- Ο εμβολιασμός του δείγματος γίνεται σε τρυβλίο N2 (ποιοτικά-απομονώσεις) και επιπλέον σε Ht (ποσοτικά) και Sb άγαρ. **Σε κάθε τρυβλίο γράφουμε τον αριθμό του δείγματος.**
- Όλα τα δείγματα από Υ/Β εμβολιάζονται και σε Choc άγαρ. Επίσης σε Choc άγαρ εμβολιάζονται και τα δείγματα στα οποία θα γίνει αναζήτηση για *Haemophilus spp.* και *Neisseria gonorrhoeae*.
- Σε σπάνιες περιπτώσεις μπορεί να ζητηθεί καλλιέργεια σε *Loewenstein* για αναζήτηση Μυκοβακτηριδίων και σε αναερόβιες συνθήκες ή συνθήκες CO₂ για σπάνια παθογόνα.

ΤΕΧΝΙΚΗ ΕΜΒΟΛΙΑΣΜΟΥ

- Πριν τον εμβολιασμό **καλή ανακίνηση** του δείγματος με το χέρι.
- Σε περίπτωση που το δείγμα των ούρων είναι πολύ θολό, γίνεται αραιώση 1:5 (σε αποστειρωμένο νερό ή φυσιολογικό ορό)
- Λήψη 1μl ή 10μl με τους αντίστοιχους βαθμονομημένους κρίκους.
- Επιστροφή ενοφθαλμίσματος με τον κρίκο σε όλη την επιφάνεια του τρυβλίου, χωρίς αυτό να ακουμπά στα τοιχώματα.
- Επώαση στους 35-37°C για ένα 24ωρο.
- Στην Υπερβική παρακέντηση (Υ/Η) και σε όλες τις κ/ες στο υλικό Sabouraud, εμβολιάζονται 10μL ούρων (αραίωση 1:100).



ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ

Αριθμός αποικιών X 100 ή X 1000 = cfu/ml ανάλογα με το αν ο κρίκος ενοφθαλμισμού ήταν των 10 ή του 1 ml αντίστοιχα.

6. Αξιολόγηση Αποτελεσμάτων

Κοινή καλλιέργεια :

- ✓ **ΣΤΕΙΡΑ:** 0 - 5.000 cfu/mL ούρων
- ✓ **ΑΡΝΗΤΙΚΗ :** 5.000 -10.000 cfu/mL ούρων
- ✓ **ΑΜΦΙΒΟΛΗ-ΣΥΝΕΚΤΙΜΗΣΗ ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΕΙΚΟΝΑΣ:** 10.000- 50.000 cfu/mL ούρων, ένα είδος μικροβίων
- ✓ **ΑΜΦΙΒΟΛΗ-ΕΠΑΝΑΛΗΨΗ :** 5.000 -10.000 cfu/mL ούρων, δύο είδη μικροβίων
- ✓ **ΑΚΑΤΑΛΛΗΛΗ ΕΠΑΝΑΛΗΨΗ :** > 10.000 cfu/mL ούρων, τρία είδη μικροβίων
- ✓ **ΘΕΤΙΚΗ :** Βρέφη, παιδιά : > 50.000 cfu/mL ούρων, ένα είδος μικροβίων
Ενήλικες : > 100.000 cfu/mL ούρων, ένα είδος μικροβίων
- ✓ **ΟΞΥ ΟΥΡΗΘΡΙΚΟ ΣΥΝΔΡΟΜΟ:** 100-10.000 cfu/MI, ένα είδος μικροβίου σε νεαρές γυναίκες, θεωρείται κλινικά σημαντική

Τα τελικά αποτελέσματα προκύπτουν μετά από σύγκριση των αποτελεσμάτων της καλλιέργειας, αυτών της γενικής ούρων σε συνδυασμό με την κλινική εικόνα, το ατομικό αναμνηστικό και την πιθανή λήψη αντιβιοτικών.

ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑΤΑ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗΣ Κ/ΑΣ ΟΥΡΩΝ

ΓΕΝΙΚΗ	ΑΡΙΘΜΟΣ cfu/mL	ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ
Π (0-5) Κ.Ο.Π. Μ (-)	< 5.000 cfu/mL	ΣΤΕΙΡΑ
Π (0-5) Κ.Ο.Π. Μ (-)	5.000 – 10.000cfu/mL	ΑΡΝΗΤΙΚΗ
Π (5-8) Κ.Ο.Π. Μ (λίγοι)	10.000 – 50.000 cfu/mL ΠΑΙΔΙΑ 10.000 – 100.000 cfu/mL ΕΝΗΛΙΚΕΣ	ΑΜΦΙΒΟΛΗ - ΕΠΑΝΑΛΗΨΗ
Π (οποιοδήποτε αριθμός)	>50.000 cfu/mL ΠΑΙΔΙΑ >100.000 cfu/mL ΕΝΗΛΙΚΕΣ	ΘΕΤΙΚΗ
>1 Μικροοργανισμός		
Π (80-100) Κ.Ο.Π. Μ (λίγοι ή/και αρκετοί)	Δίνεται ο μικροοργανισμός που υπερέχει αριθμητικά ή και οι δύο αν είναι στην ίδια ποσότητα (μόνο σε ουρολογικούς ασθενείς)	ΘΕΤΙΚΗ
Π (0-5) Κ.Ο.Π. Μ (-)	Επανάληψη μετά από καλό πλύσιμο Δίνεται ο μικροοργανισμός που υπερέχει Π.χ. ο εντερόκοκκος δεν κάνει πυουρία	ΑΚΑΤΑΛΛΗΛΗ ΘΕΤΙΚΗ
Πυουρία	Έλεγχος για άλλα παθογόνα (π.χ. μυκοβακτηρίδια, μυκόπλασμα), λήψη αντιβιοτικών, πρόσμιξη αντισηπτικού, ολική απόφραξη κάτω από το σημείο της λοίμωξης	ΑΡΝΗΤΙΚΗ
Απουσία πυουρίας	Ουδετεροπενία, ασυμπτωματική βακτηριουρία, ουρολοίμωξη από <i>Proteus spp</i> λόγω λύσης (αλκαλικό pH), νευρογενής κύστη	ΘΕΤΙΚΗ

Παρατηρήσεις: Σε ανάπτυξη *Enterococcus spp.* και *Candida spp.*, αξιολογείται μικρότερη ανάπτυξη τους με συνεκτίμηση του ατομικού αναμνηστικού, της συμπτωματολογίας και της γενικής ούρων. Είδη *Pseudomonas spp.*, αξιολογούνται με μεγάλη προσοχή.

Υπερηβική παρακέντηση :

Αξιολογείται κάθε ανάπτυξη ≥ 100 cfu/mL ούρων.

In & outκαθετήρας :

Αξιολογείται κάθε ανάπτυξη $\geq 1.000- 10.000$ cfu/mL ούρων.

Λήψη με σακουλάκι :

Αξιολογείται κάθε ανάπτυξη ≥ 10.000 cfu/mL ούρων με θετική γενική και θετική συμπτωματολογία.

7. Μεθοδολογία

Βγάζουμε τα τρυβλία από τον κλίβανο και τα τοποθετούμε στον πάγκο, κατά αριθμητική σειρά χωριστά των εξωτερικών ιατρείων και χωριστά των κλινικών.

Βγάζουμε τα στατά με τα σωληνάρια των ταυτοποιητικών δοκιμασιών Methyl-red, Ινδόλη, Κινητικότητα, ΡΡΑ, Ουρία (Μ.Ι.Κ.ΡΡΑ.Ö), Αισκουλίνη, Νιτρικά.

Προσθέτουμε αντιδραστήρια -Γίνονται οι κατάλληλες δοκιμασίες για την ταυτοποίηση των μικροβιακών παθογόνων στις πιθανές θετικές καλλιέργειες

Προσθέτουμε αντιδραστήρια στα ταυτοποιητικά συστήματα του εμπορίου αφού προηγουμένως διαβάσουμε τα σάκχαρα.

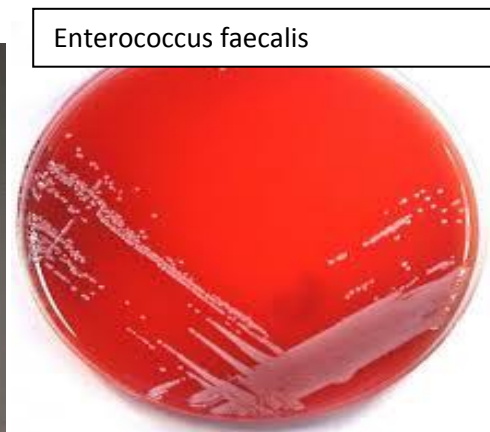
Αντιγράφουμε στα Βιβλία των καλλιέργειών ούρων, τις αντίστοιχες γενικές ούρων της προηγούμενης ημέρας (Ειδικό βάρος, pH, λευκοκυτταρική εστέραση, αιμοσφαιρίνη, νιτρώδη, μικροοργανισμοί, αριθμός πυοσφαιρίων και ερυθρών).

Διαβάζουμε τα τρυβλία με τη χρήση μεγεθυντικού φακού. Αριθμούμε και καταγράφουμε τις αποικίες για κάθε μικρόβιο χωριστά, χαρακτηρίζοντας π.χ. g-βL (+) : 3.000 cfu/mL, g-β L (-) : 5.000 cfu/mL, g+κ. Κατ. (+) : 7.000 cfu/mL, g+κ. Κατ. (-) : 500 cfu/mL.

Γράφουμε τα ΣΤΕΙΡΑ και ΑΡΝΗΤΙΚΑ στα Βιβλία εργασίας του εργαστηρίου, στους αντίστοιχους αριθμούς δείγματος, αλλά στα απαντητικά την επόμενη ημέρα.

ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΑ ΑΙΤΙΑ ΟΥΡΟΛΟΙΜΩΞΗΣ

Gram αρνητικά βακτήρια
Βακτηρίδια: <i>E. coli</i> , <i>Klebsiella pneumonia</i> , <i>Proteus mirabilis</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Enterobacter spp.</i> , <i>Citrobacter spp.</i> , Κόκκοι: <i>Neisseria gonorrhoeae</i>
Gram θετικά βακτήρια
Βακτηρίδια: <i>Corynebacterium urealyticum</i> Κόκκοι: <i>Enterococcus spp.</i> , <i>Staphylococcus saprophyticus</i> , <i>Streptococcus agalactiae</i> (GBS), <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Streptococcus bovis</i> , <i>Aerococcus spp.</i>
Μύκητες: <i>Candida albicans</i> , <i>Candida glabrata</i>
Άλλα σπάνια παθογόνα: <i>Mycoplasma hominis</i> , <i>Ureaplasma urealyticum</i> , <i>Gardnerella vaginalis</i> , <i>Haemophilus influenza</i> , <i>Haemophilus parainfluenzae</i> , <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .



8. Έλεγχος ευαισθησίας στα αντιβιοτικά

Μετά την ταυτοποίηση διενεργείται έλεγχος ευαισθησίας στα αντιβιοτικά. Το κάθε είδος βακτηρίου που απομονώνεται από το ουροποιητικό, ελέγχεται σε συγκεκριμένη ομάδα αντιβιοτικών.

9. Έκδοση Αποτελεσμάτων

Μετά την αξιολόγηση τα αποτελέσματα καταγράφονται στα βιβλία του εργαστηρίου και στα απαντητικά δελτία για να αποσταλούν στις κλινικές ή στη γραμματεία του τμήματος αν πρόκειται για εξωτερικούς ασθενείς. Τις απαντήσεις των θετικών ουροκαλλιεργειών συνοδεύουν τα αποτελέσματα του ελέγχου ευαισθησίας στα αντιβιοτικά.

10. Έλεγχος Ποιότητας

- **Εσωτερικός ποιοτικός έλεγχος:** Γίνεται με ανακαλλιέργεια προτύπων στελεχών σε αντίστοιχα θρεπτικά υλικά για κάθε μικροβιακό στέλεχος.
- **Εξωτερικός ποιοτικός έλεγχος:** Γίνεται μέσω των εγκεκριμένων διεθνώς οργανισμών ελέγχου ποιότητας π.χ. NEQAS, United Kingdom (National External Quality Assessment Service). Λυοφιλοποιημένα στελέχη που έχουν απομονωθεί σε συγκεκριμένα βιολογικά δείγματα, ανασυσταίνονται σε θρεπτικό ζωμό και καλλιεργούνται σε στερεά θρεπτικά υλικά, ανάλογα με το είδος του δείγματος. Αναζητούνται τα παθογόνα μικρόβια και ταυτοποιούνται ανάλογα, με συμβατικά ή αυτοματοποιημένα ταυτοποιητικά συστήματα (API, ERIC, CrystalBBL, VITEK κ.ά.).



11. Βιβλιογραφία

1. Χαρβάλου Αικατερίνη. Πρωτόκολλα Κλινικής Μικροβιολογίας. Σύνοψη εργαστηριακής προσπέλασης βακτηριακών λοιμώξεων. Εκδόσεις Πασχαλίδη. 2007.
2. Urinary tract infection in children: diagnosis, treatment and long-term management. London (UK): National Collaborating Centre for Women's and Children's Health. National Institute for Health and Clinical Excellence (NICE); 2007 Aug. 148 p. (Clinical guideline; no. 54). [271 references]
3. The New American Academy of Pediatrics Urinary Tract Infection Guideline. Thomas B. Newman. *Pediatrics* 2011;128;572; originally published online August 28, 2011;
4. Diagnosing urinary tract infections in febrile infants and children: when evidence-based medicine and clinical practice collide. Julie Spence, MD;* John Ross, MD† *CJEM • JCMU* July • juillet 2000; 2 (3): 198-200.
5. What are appropriate methods of urine collection in urinary tract infection? Primary Reviewer: Elliot Long Secondary Reviewer: John Vince. International Child Health Review Collaboration www.ichrc.org
6. Follow-up Urine Cultures and Fever in Children With Urinary Tract Infection. *Melissa L. Currie, MD; Lindsay Mitz, BA; Carolyn S. Raasch, RN, BSN; Larry A. Greenbaum, MD, PhD*(REPRINTED) ARCH PEDIATR ADOLESC MED/VOL 157, DEC 2003 1237-1240
7. European guidelines for urinalysis: a collaborative document produced by European clinical microbiologists and clinical chemists under ECLM in collaboration with ESCMID. O. Aspevall, H. Hallander, V. Gant and T. Kouri. *Clinical Microbiology and Infection*, Volume 7 Number 4, April 2001: CMI, 7, 173–178.
8. A Critical Appraisal of the Role of the Clinical Microbiology. Laboratory in the Diagnosis of Urinary Tract Infections. Eileen M. Burd* and K. Sue Kehl. *Journal of Clinical Microbiology*, Sept. 2011, p. S34–S38 Vol. 49, NO. 9 Suppl.
9. Rapid tests and urine sampling techniques for the diagnosis of urinary tract infection (UTI) in children under five years: a systematic review. Penny Whiting, Marie Westwood*, Ian Watt, Julie Cooper and Jos Kleijnen *BMC Pediatrics* 2005, 5:4 doi:10.1186/1471-2431-5-4.
10. Guidelines on Standard Operating Procedures for MICROBIOLOGY Chapter 19- Urinary Tract Infection World Health Organization 27 April 2006.
11. Urinary Tract Infection: Clinical Practice Guideline for the Diagnosis and Management of the initial UTI in Febrile Infants and Children 2 to 24 Months. SUBCOMMITTEE ON URINARY TRACT INFECTION, STEERING COMMITTEE ON QUALITY IMPROVEMENT AND MANAGEMENT. *Paediatrics*, Volume 128, Number 3, Sep 2011:595-610.
12. Clinical microbiology procedures handbook. Procedures Guidelines for the Microbiology Laboratory Henry D. Isenberg, American Society for Microbiology. 2d ed 2010.

