

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

Εργαστήριο Κλινικής Μικροβιολογίας

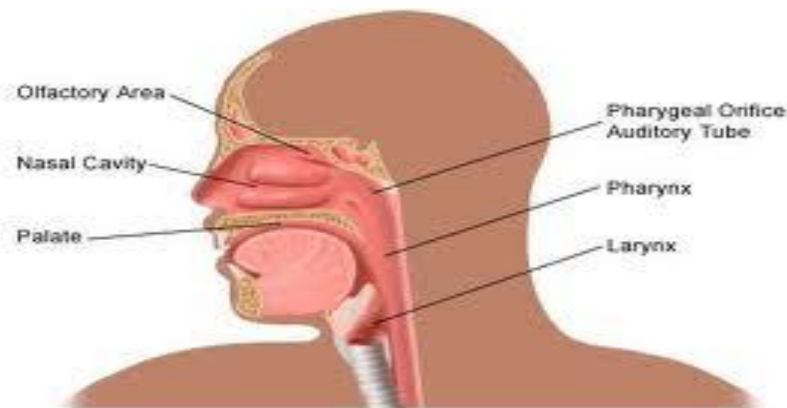
Υπεύθυνοι μαθήματος: Αγγελική Στάθη, B.sc., Ph.D., Ελένη Κρανιωτάκη, M.sc., Ph.D.

Ημερομηνία	26/11/2012
Τίτλος εργαστηριακής άσκησης	ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΟΥ

Σκοπός

Η αναγνώριση από το άμεσο παρασκεύασμα (όταν αυτό είναι δυνατό), η απομόνωση και η ταυτοποίηση παθογόνων μικροοργανισμών που έχουν απομονωθεί σε δείγματα από το αναπνευστικό σύστημα με διάφορες μεθόδους, καθώς και ο έλεγχος ευαισθησίας των παθογόνων στα αντιβιοτικά.

1. ΑΝΩΤΕΡΟ ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΟ



1.1 Είδος Δείγματος - Λήψη-Μεταφορά

Το είδος του δείγματος και η λήψη εξαρτάται από τα συμπτώματα, την εστία και το είδος της λοίμωξης:

- ο κατάλληλος χρόνος λήψης: 1-3 μέρες από την έναρξη των συμπτωμάτων και όχι παραπάνω από 7 μέρες (εξαίρεση: η *Bordetella pertussis* απομονώνεται έως και 4 εβδομάδες μετά την έναρξη των συμπτωμάτων του κοκκύτη)

- λήψη πριν από τη χορήγηση αντιβιοτικών
- όχι βαμβακοφόρος συτλεός για *Bordetella spp* (αλγινικού ασβεστίου ή Dacron) και όχι συτλεός αλγινικού ασβεστίου για δείγματα που θα σταλούν για PCR (περιέχει ανασταλτικούς παράγοντες κυρίως αν στην εξαγωγή DNA χρησιμοποιείται πρωτεΐνάση K)

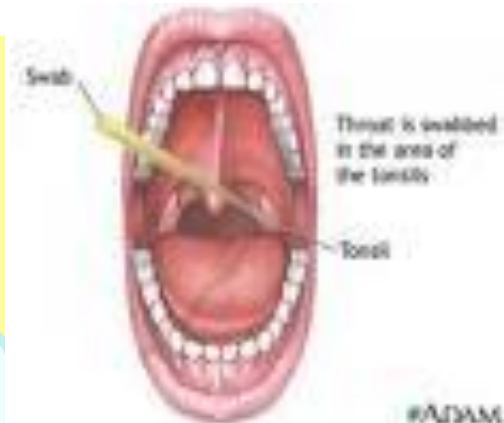
ΚΥΡΙΟΤΕΡΕΣ ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ ΑΝΩΤΕΡΟΥ ΑΠΝΕΥΣΤΙΚΟΥ

ΚΛΙΝΙΚΟ ΣΥΝΔΡΟΜΟ	ΣΗΜΑΝΤΙΚΟΤΕΡΑ ΠΑΘΟΓΟΝΑ	ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΠΟΥ ΣΥΛΛΕΓΟΝΤΑΙ
ΦΑΡΥΓΓΙΤΙΔΑ	<i>Streptococcus pyogenes</i> , <i>Streptococci Group C, G</i> <i>Neisseria gonorrhoeae</i> ,	Φαρυγγικό επίχρισμα
ΔΙΦΘΕΡΙΤΙΔΑ	<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	Φαρυγγικό επίχρισμα
ΕΠΙΓΛΩΤΤΙΤΙΔΑ	<i>Haemophilus influenzae</i>	Επίχρισμα από την επιγλωττίδα, αμμοκαλλιέργεια
ΚΟΚΚΥΤΗΣ	<i>Bordetella pertussis</i> , <i>Bordetella parapertussis</i>	Ρινοφαρυγγικό επίχρισμα, Ρινοφαρυγγικό έκπλυμα
ΦΟΡΕΙΑ ΣΤΑΦΥΛΟΚΟΚΚΟΥ	<i>Staphylococcus aureus Methicillin Resistant (MRSA)</i>	Ρινικό επίχρισμα

Λήψη δειγμάτων κατά κλινικό σύνδρομο

A) Φαρυγγίτιδα- Φαρυγγικό επίχρισμα

- Πιέζουμε τη γλώσσα ελαφρά με γλωσσοπίεστρο
- Λαμβάνεται επίχρισμα με βαμβακοφόρο ή πολυεστερικό συτλεό, με περιστροφικές κινήσεις, πρώτα στην μία αμυγδαλή, μετά στη μαλακή υπερώα, έπειτα στην άλλη αμυγδαλή και τελικά στον οπίσθιο φάρυγγα
- Αν υπάρχουν φλεγμονώδεις εστίες λαμβάνουμε επίχρισμα και από αυτές
- Σε περίπτωση φαρυγγίτιδας από *Corynebacterium diphtheriae* (διφθερίτιδα), αν υπάρχουν εσχάρες που μπορούν να μετακινηθούν, το επίχρισμα λαμβάνεται κάτω από τις εσχάρες
- Αποφεύγουμε την επαφή με τη γλώσσα, τα ούλα και τα δόντια για την αποφυγή επιμόλυνσης του δείγματος



Β) Κοκκύτης

1. Ρινοφαρυγγικό επίχρισμα

- Εισάγεται εύκαμπτος στυλεός (αλγινικού ασβεστίου ή Dacron) στον οπίσθιο ρινοφάρυγγα μέσω του ρώθωνος
- Το επίχρισμα λαμβάνεται με περιστροφικές κινήσεις του στυλεού για 5'' (δευτερόλεπτα)
- Η διαδικασία επαναλαμβάνεται και για τον άλλο ρώθωνα

2. Ρινοφαρυγγικό έκπλυμα

- Εισάγουμε στη μύτη πλαστικό καθετήρα προσαρμοσμένο σε σύριγγα
- Γεμίζουμε τη σύριγγα με στείρο φυσιολογικό ορό
- Εξηγούμε στον ασθενή ότι δεν πρέπει να καταπιεί κατά τη διάρκεια της λήψης
- Γίνεται έγχυση 5mL φυσιολογικού ορού με το κεφάλι του ασθενή σε υπερέκταση
- Αναρροφούμε το υγρό και από τους δύο ρώθωνες
- Τοποθετούμε το υγρό σε στείρο δοχείο



Γ) Επιγλωττίδα

1. Επίχρισμα με βαμβακοφόρο στυλεό από την περιοχή της επιγλωττίδας

Πραγματοποιείται μόνο εάν οι αεροφόρες οδοί είναι ανοικτές. Προσοχή κίνδυνος απόφραξης της τραχείας κατά τη λήψη!!!

2. Αιμοκαλλιέργεια

Το πλέον αξιόπιστο δείγμα σε περίπτωση επιγλωττίτιδας

Δ) Έλεγχος φορέας MRSA

Ρινικό επίχρισμα (δείγμα χαμηλής διαγνωστικής αξίας)

- Εφύγρανση βαμβακοφόρου στυλεού με στείρο φυσιολογικό ορό
- Εισαγωγή στυλεό στο ρώθωνα 1-2 cm, παράλληλα με την υπερώα
- Λήψη επιχρίσματος με περιστροφή του στυλεού



1.2 Μεταφορά -χειρισμός δειγμάτων

- Οι στυλεοί μεταφέρονται σε υλικό μεταφοράς Amies ή Stuart (έως 3 μέρες στους 4-22°C)
- Τα δείγματα στα οποία αναζητούμε *Bordetella spp* είναι καλό να ενοφθαλμίζονται άμεσα σε εκλεκτικά υλικά (αυξάνεται η ευαισθησία της καλλιέργειας). Διαφορετικά οι στυλεοί τοποθετούνται σε υλικό Amies με άνθρακα, αν το δείγμα πρόκειται να ενοφθαλμιστεί σε <24h ή σε υλικό
- Regan-Lowe για >24h καθυστέρηση. Στο ρινοφαρυγγικό έκπλυμα για *Bordetella spp* προσθέτουμε διάλυμα 0.5-1% casein hydrolysate ως υλικό συντήρησης-μεταφοράς
- Το ιδανικό είναι η μεταφορά να μην υπερβαίνει τις 2ώρες για όλα τα δείγματα

1.3 Εξοπλισμός

- Κλίβανος για αερόβια επώαση 35°C
- Κλίβανος για επώαση 35°C με 5% CO₂
- Vortex
- Λυχνία Bunsen
- Κρίκοι και κρικοφόροι στυλεοί

1.4 Θρεπτικά υλικά

Αιματούχο άγαρ (Ht)
Σοκολατόχρωμο άγαρ (Choc)
Charman
Loeffler ή Hoyle ή Tinsdale
Columbia 5%
Bordet-Gengou agar ή Regan-Lowe charcoal
Fildes για αιμόφιλο
Modified Thayer Martin (MTM)

1.5 Προετοιμασία-Εμβολιασμός

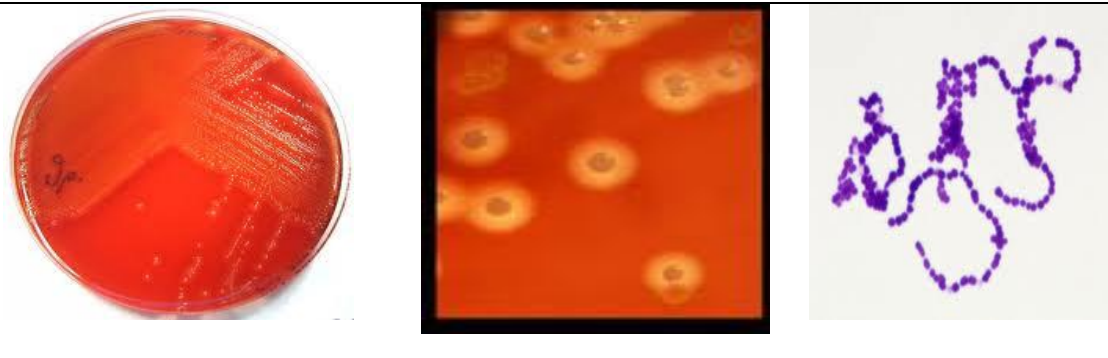
- Αριθμούμε τα δείγματα και τα παραπεμπτικά με βάση τα Βιβλία του εργαστηρίου
- Σε όλα τα δείγματα ετοιμάζουμε άμεσα παρασκευάσματα για χρώση και μικροσκόπηση
- Στα Βιβλία σημειώνουμε οτιδήποτε άλλο γράφει το παραπεμπτικό. Π.χ. ηλικία, ιστορικό, συμπτώματα, λήψη αντιμικροβιακών (θεραπεία ή χημειοπροφύλαξη).

Ο εμβολιασμός του δείγματος γίνεται σε:

- Ένα αιματούχο άγαρ για αερόβια επώαση (αναπτύσσονται όλα τα μικρόβια, ιδίως οι κόκκοι)
- Σοκολατόχρωμο άγαρ για την απομόνωση *Neisseria gonorrhoeae*, *Haemophilus influenzae* (5% CO₂)
- Charman για τη διάκριση *Staphylococcus aureus*
- Κατά περίπτωση χρησιμοποιούνται Fildes για *Haemophilus influenzae*, Modified Thayer Martin για *Neisseria gonorrhoeae* (5% CO₂)
- Bordet-Gengou agar ή Regan-Lowe charcoal agar όταν αναζητούμε *Bordetella spp* (O₂)
- Loeffler ή Hoyle ή Tinsdale & Columbia 5% όταν αναζητούμε *Corynebacterium diphtheriae* (O₂)

ΦΑΡΥΓΓΙΤΙΔΑ ΑΠΟ *Streptococcus pyogenes* (Group A Streptococcus)

Απαραίτητη διαφοροδιάγνωση από ιογενή φαρυγγίτιδα
Επιπλοκές: άμεσες → περιαμυγδαλικό απόστημα, οξεία μέση ωτίτιδα, ιγμορίτιδα έμμεσες → ρευματικός πυρετός, οζώδες ερύθημα, οξεία σπειραματονεφρίτιδα
StreptTest (ανίχνευση αντιγόνου στρεπτοκόκκου σε φαρυγγικό επίχρισμα με ανοσοχρωματογραφία) → απάντηση σε 10-15 min. Ευαισθησία 70-90%, ειδικότητα 99%
Επί αρνητικού StreptTest: καλλιέργεια
<i>Streptococcus pyogenes</i> : μικρές, λευκωπές αποικίες με διαυγή ζώνη αιμόλυσης (β-αιμόλυση) στο αιματούχο άγαρ <ul style="list-style-type: none"> • Gram: κόκκοι Gram (+) σε αλυσίδες • καταλάση (-) • ευαισθησία στην βακιτρακίνη (0.04IU) /αντοχή στο SXT • δοκιμασία PYR (υδρόλυση L-πυρρολιδονυλο-β-ναφθυλαμίνης) • ορολογική τυποποίηση κατά Lanfield (με ειδικούς αντιορούς τυποποιείται ως β-αιμολυτικός στρεπτόκοκκος της ομάδας A)



ΦΑΡΥΓΓΙΤΙΔΑ ΑΠΟ *Corynebacterium diphtheriae* (Διφθερίτιδα)

Οξεία, μεταδιδόμενη νόσος του ανώτερου αναπνευστικού, με παραγωγή τοξινών
 Υψηλό ποσοστό θνητότητας ~10%
 Σχηματισμός ψευδομεμβρανών στο φάρυγγα

Corynebacterium diphtheriae: καλλιέργεια σε κοινά και εκλεκτικά υλικά (24-48 ώρες αεροβίως, 35°C)
 Columbia agar 5% : αργή ανάπτυξη, αιμολυτικές αποικίες
 Loeffler agar slant: ορός βοός + 25% σακχαρούχος ζυμός
 Hoyle: αιματούχο άγαρ με τελλουριούχο κάλιο (μαύρες αποικίες)
 Tinsdale: L-κυστίνη → διάσπαση με κυστινάση → παραγωγή H₂S (φαιοκάστανες αποικίες με τεφρόχρωμη καστανή άλω)



- Gram: Gram (+) κορυνόμορφα βακτήρια
- καταλάση (+)
- έλεγχος για παραγωγή τοξίνης : κλασική/ τροποποιημένη δοκιμασία Elek
- ανίχνευση γονιδίων τοξίνης με PCR

ΦΑΡΥΓΓΙΤΙΔΑ ΑΠΟ *Bordetella pertussis/parapertussis* (Κοκκύτης)

Οξεία νόσος του ανώτερου αναπνευστικού, με υψηλή μεταδοτικότητα και μικρή εποχιακή ποικιλία
 Πιο συχνή σε βρέφη και μικρά παιδιά
 Ο εμβολιασμός (DTP) προφυλάσσει
 Καταρροϊκό στάδιο: μολυσματικό και παροξυσμικό (βήχας)
 Επιπλοκές: πνευμονία

Bordetella pertussis: καταλάση (+), οξειδάση (-), κοντό, ακίνητο, κοκκοβακτηρίδιο

Άμεση μικροσκοπική

- Gram (-) κοκκοβακτηρίδιο
- βάφεται και με κυανούν του μεθυλενίου: διπολική χρώση

Καλλιέργεια: σε εκλεκτικά υλικά (5-7μέρες, αεροβίως, 35°C, σε υγρασία)

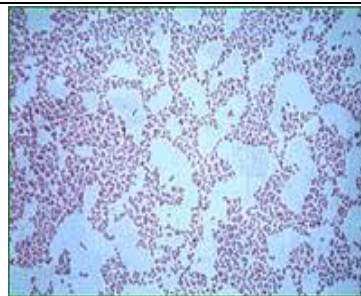
- Bordet-Gengou agar
- Regan-Lowe charcoal agar (γκρι, μικρές μαλακές, κυρτές, στίλβουσες αποικίες)
- η *Bordetella parapertussis* αναπτύσσεται και στο αιματούχο (μαλακές θολές και συνήθως αιμολυτικές αποικίες)



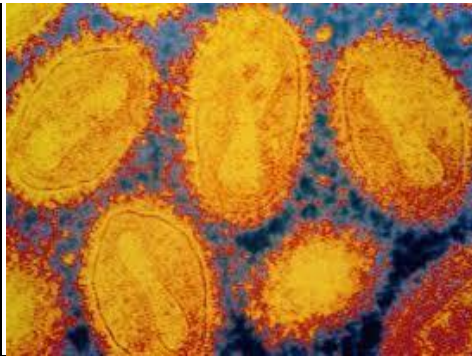
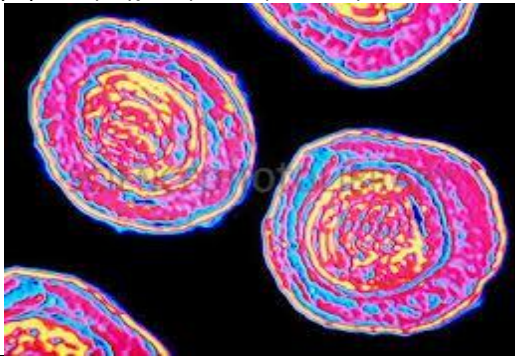
Regan-Lowecharcoalagar



Bordet-Gengouagar



- άμεσος ανοσοφθορισμός: ανίχνευση αντιγόνου (χαμηλή ευαισθησία: 60%)
- ανίχνευση αντισωμάτων στο ορό του ασθενούς με ELISA(επιδημιολογικός έλεγχος, έλεγχος ανοσίας)
- μοριακές τεχνικές : PCR (ευαισθησία: 90%)



ΕΠΙΓΛΩΤΤΙΤΙΔΑ ΑΠΟ *Haemophilus influenzae* τύπου b

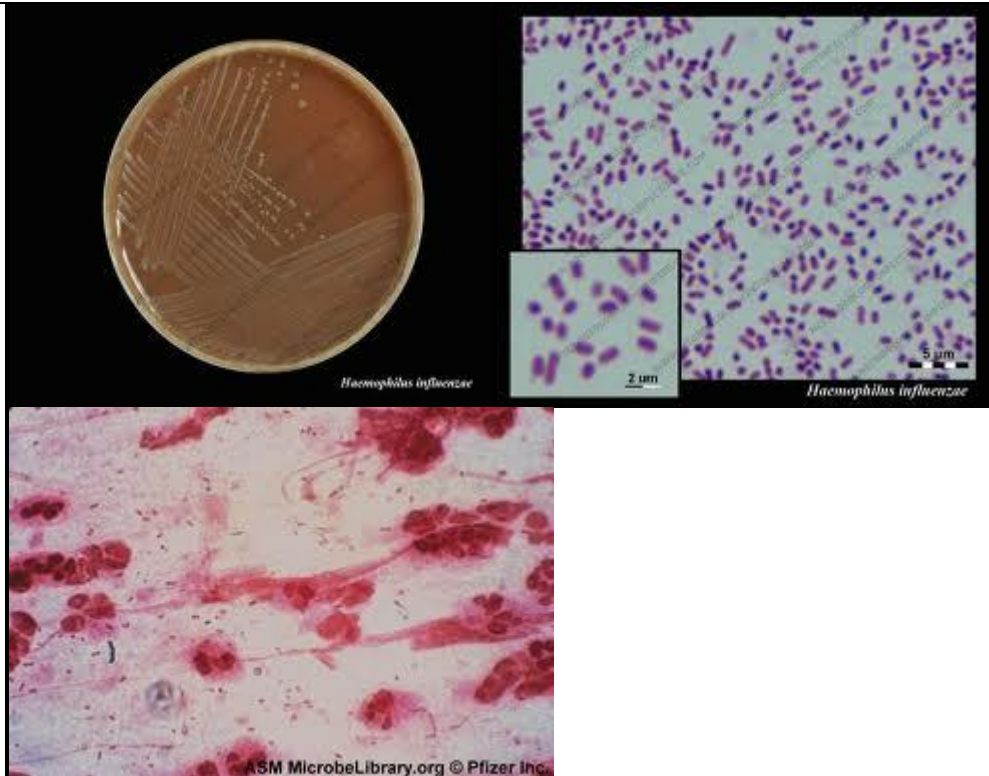
Οξεία νόσος του ανώτερου αναπνευστικού, πιο συχνή στην προσχολική ηλικία
Κίνδυνος πλήρους απόφραξης των αεροφόρων οδών (θανατηφόρος επιπλοκή)

Άμεση μικροσκοπική κατά Gram
πολύμορφο Gram (-) βακτηρίδιο και πολλά πυοσφαίρια
Καλλιέργεια

- ✓ σοκολατόχρωμο, Fildes στους 37°C αερόβια ή 5% CO₂.
- ✓ μικρές, διάφανες, στρογγυλές αποικίες

Τεστ ταυτοποίησης

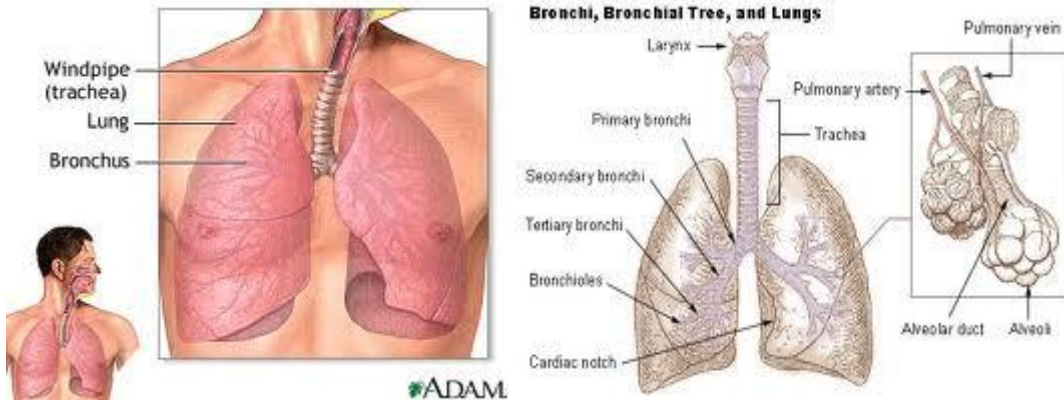
- ✓ εξάρτηση από τους παράγοντες X και V
- ✓ αντοχή στη βακιτρακίνη(10U)
- ✓ καταλάση (+), οξειδάση(+)
- ✓ φαινόμενο δορυφορισμού
- ✓ ορολογική τυποποίηση



1.6 Αξιολόγηση Αποτελεσμάτων

- Τα δείγματα του ανώτερου αναπνευστικού είναι επιμολυσμένα με την τοπική μικροβιακή χλωρίδα
- Επιπλέον, μικροοργανισμοί που είναι παρόντες σε φυσιολογικούς, ασυμπτωματικούς φορείς, είναι παρόντες και σε πάσχοντες
- Επομένως, τα δείγματα δεν παρέχουν πάντα ακριβείς, κλινικά χρήσιμες πληροφορίες για τη διάγνωση των λοιμώξεων
- Σε περιπτώσεις όμως με θετική συμπτωματολογία, η απομόνωση ειδικών παθογόνων (*Corynebacterium diphtheriae*, *Bordetella pertussis*, *Haemophilus influenzae*) παραπέμπει σε λοίμωξη του ανώτερου αναπνευστικού

2. ΚΑΤΩΤΕΡΟ ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΟ



ΚΥΡΙΟΤΕΡΕΣ ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ ΚΑΤΩΤΕΡΟΥ ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΟΥ: ΠΝΕΥΜΟΝΙΕΣ

Διάκριση πνευμονιών:

A) Πνευμονίες κοινότητας- κυριότεροι αιτιολογικοί παράγοντες

S. pneumoniae
S. aureus (και MRSA)
H. influenzae
Kl. pneumoniae
Pneumocystis jirovecii
M. tuberculosis

B) Νοσοκομειακές πνευμονίες- κυριότεροι αιτιολογικοί παράγοντες

S. aureus
Εντεροβακτηριακά
Ps. aeruginosa

Γ) Άτυπες πνευμονίες -κυριότεροι αιτιολογικοί παράγοντες

Chlamydia pneumoniae
Chlamydia psittaci
Legionella pneumophila
Coxiella burnetii
Mycoplasma pneumoniae

Δ) Πνευμονίες από εισρόφηση -κυριότεροι αιτιολογικοί παράγοντες

Αναερόβια
S. aureus
Streptococcus spp
Εντεροβακτηριακά
Ps. aeruginosa

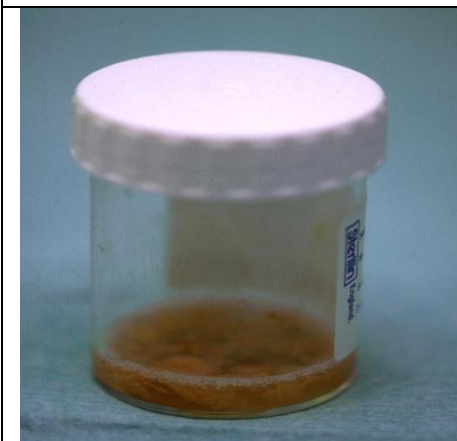
2.1 Είδος Δείγματος - Λήψη-Μεταφορά

Τα δείγματα του κατώτερου αναπνευστικού διακρίνονται σε:

A) Μη επεμβατικά
Πτύελα
Ούρα (ανίχνευση αντιγόνων)
Ορός αίματος (ανίχνευση αντισωμάτων)
Περιφερικό αίμα (αιμοκαλλιέργειες)
B) Επεμβατικά
Βρογχοκυψελιδικόέκπλυμα (BAL)
Δείγμα προστατευμένης ψήκτρας
Βρογχικό έκπλυμα (washing)
Βρογχικά ξέσματα
Πλευριτικό υγρό
Διαβρογχική βιοψία
Διαβρογχική αναρρόφηση με βελόνη
Τραχειακή αναρρόφηση
Διαθωρακική βιοψία με βελόνη
Ανοιχτή βιοψία πνεύμονα

ΠΤΥΕΛΑ

Καταλληλότερο δείγμα είναι το πρωινό πριν από το πρόγευμα
Εάν υπάρχουν οδοντοστοιχίες αφαιρούνται
Ο άρρωστος πλένει καλά το στόμα του με φυσιολογικό ορό ή αποστειρωμένο νερό
Ο άρρωστος εκπαιδεύεται να δώσει πτύελα με βαθιά απόχρεμψη
Εάν χρειάζεται ζητείται η βοήθεια φυσικοθεραπευτού
Τα πτύελα συλλέγονται σε αποστειρωμένο δοχείο (2-3 ml)
Το δοχείο σημαίνεται με το όνομα του αρρώστου και αποστέλλεται στο εργαστήριο (<2 h)
Δεν αναζητούνται αναερόβια μικρόβια σε καλλιέργεια πτυέλων
Εάν υπάρχει υποψία λοίμωξης από μύκητες, <i>Nocardia spp</i> και <i>Mycobacterium spp</i> ζητείται ειδική καλλιέργεια



ΠΡΟΚΛΗΤΑ ΠΤΥΕΛΑ (κυρίως για καλλιέργεια *M. tuberculosis*)

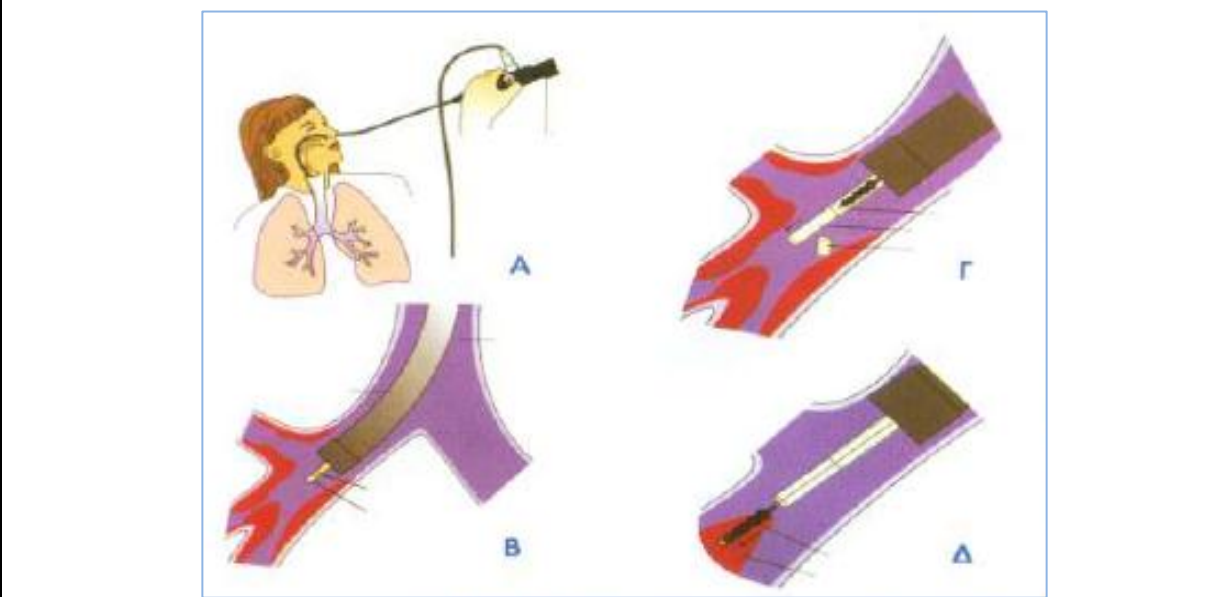
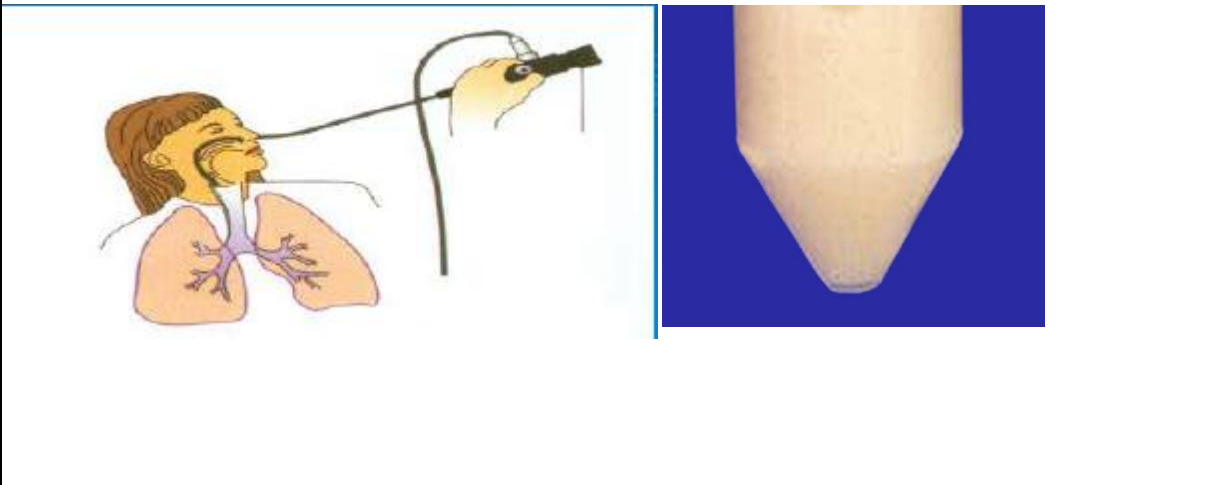
Ο άρρωστος πλένει καλά το στόμα του με φυσιολογικό ορό ή αποστειρωμένο νερό
Το δείγμα συλλέγεται μετά από εισπνοή διαλύματος NaCl 3% υπό μορφή αεροσόλης σε νεφελοποιητή για χρονικό διάστημα 20-30 min

ΒΡΟΓΧΟΚΥΨΕΛΙΔΙΚΟ ΕΚΠΛΥΜΑ (BAL)

Σταθεροποιείται το βρογχοσκόπιο
Προσαρμόζεται το δοχείο συλλογής
Ξεπλένονται οι κατώτεροι αεροφόροι οδοί σταδιακά και ανά 20 ml με φυσιολογικό ορό θερμοκρασίας 37°C
Ακολουθεί η συλλογή του υγρού στο δοχείο συλλογής
Η διαδικασία επαναλαμβάνεται 3-5 φορές για κάθε σημείο επιλογής
Ο συνολικός όγκος είναι 100-250 ml

ΠΡΟΣΤΑΤΕΥΜΕΝΗ ΒΡΟΓΧΙΚΗ ΨΗΚΤΡΑ (PSB)

Εισαγωγή βούρτσας με βρογχοσκόπιο
Συλλογή εκκρίσεων από τα άνω βρογχιόλια
Η βούρτσα τοποθετείται σε 1 ml αποστειρωμένου φυσιολογικού ορού και μεταφέρεται στο εργαστήριο



2.2 Μεταφορά -χειρισμός δειγμάτων

Από τη δειγματοληψία μέχρι την επεξεργασία του κλινικού δείγματος: μεγίστη καθυστέρηση 2h(κίνδυνος υπερανάπτυξης φυσιολογικής χλωρίδας)
Ειδήλλως, φύλαξη στους 4°C έως 24, ώρες

Μη αποδεκτά δείγματα

- όχι πάνω από 1 δείγμα πτυέλων του ίδιου ασθενούς, την ίδια μέρα
- όχι δεύτερο δείγμα πτυέλων του ίδιου ασθενούς σε διάστημα μικρότερο των 48 ωρών
- όχι δείγμα πτυέλων 24ώρου συλλογής
- όχι δείγματα που περιέχουν μόνο σίελο
- όχι δείγματα που περιέχουν τροφές, οδοντόπαστα κ.α.
- όχι δείγματα για αναερόβια καλλιέργεια
- όχι δείγματα που μένουν εκτός ψυγείου >2 ώρες

2.3 Εξοπλισμός

- Κλίβανος για αερόβια επώαση 35°C
- Κλίβανος για επώαση 35°C με 5% CO₂
- Vortex
- Λυχνία Bunsen
- Κρίκοι και κρικοφόροι στυλεοί
- Δισκία βακιτρακίνης 10U
- Δισκία οπτοχίνης

2.4 Θρεπτικά υλικά

Αιματούχο άγαρ (Ht)ή Columbia 5%
Σοκολατόχρωμο άγαρ (Choc)
McConkey άγαρ No2 (N2)
Chapman
Sabouraud άγαρ (Sb)
Υλικά καλλιέργειας μυκοβακτηριδίων
Fildes

2.5 Προετοιμασία - Εμβολιασμός

- Αριθμούμε τα δείγματα και τα παραπεμπτικά με βάση τα Βιβλία του εργαστηρίου
- Σε όλα τα δείγματα ετοιμάζουμε άμεσα παρασκευάσματα για χρώση και μικροσκόπηση
- Στα Βιβλία σημειώνουμε οτιδήποτε άλλο γράφει το παραπεμπτικό. Π.χ. ηλικία, ιστορικό, συμπτώματα, λήψη αντιμικροβιακών (θεραπεία ή χημειοπροφύλαξη).
- Ο εμβολιασμός του δείγματος γίνεται σε:
 - Ένα Ht για αερόβια επώαση
 - Ένα Columbia άγαρ 5% (5% CO₂) + optocin για ταυτοποίηση *Streptococcus pneumoniae*
 - Choc άγαρ (5% CO₂) + bacitracin 10U για ταυτοποίηση *Haemophilus influenzae*
 - N2 για διάκριση εντεροβακτηριακών και *Pseudomonas spp* (O₂)
 - Sabouraud άγαρ για μύκητες (O₂)
 - Fildes για *Haemophilus influenzae* (O₂)
 - Chapman για διάκριση *Staphylococcus aureus* (O₂)
 - Υλικά καλλιέργειας μυκοβακτηριδίων (Lowenstein-Jensen) αν ζητηθεί καλλιέργεια για *M. tuberculosis*

2.6 Άμεσο βαμμένο κατά Gram

Η χρησιμότητα της χρώσης Gram στα πτύελα είναι αμφιλεγόμενη, εκτός κι αν γίνεται με συγκεκριμένα κριτήρια (Cumitech, 2004)

- Διαχωρισμός δειγμάτων σε αυτά που πιθανώς εμπεριέχουν το παθογόνο και αυτά που είναι επιμολυσμένα από τη στοματοφαρυγγική χλωρίδα
- Προσδιορισμός είδους κυττάρων του ξενιστή και κυρίαρχου μικροοργανισμού → προκαταρκτικές πληροφορίες → αρχική επιλογή της θεραπείας
- Οδηγός επιλογής «πιθανών παθογόνων» που αναπτύσσονται στην καλλιέργεια
 - (→ ταυτοποίηση, έλεγχος ευαισθησίας)

Η παρουσία πολλών επιθηλιακών κυττάρων και η παράλληλη απουσία πυοσφαιρίων είναι ενδεικτική επιμόλυνσης με στοματοφαρυγγική χλωρίδα → υποδεικνύει την αναγκαιότητα νέας δειγματοληψίας

2.7 Ποσοτική Καλλιέργεια πτυέλων/BAL

Σε περίπτωση σωστού δείγματος πτυέλων γίνεται ποσοτική καλλιέργεια

Θετικό αποτέλεσμα:

Πτύελα: $>10^5$ cfu/mL

BAL: $> 10^3$ cfu/mL

PSB: 10^3 cfu /mL

Βασίζεται:

- α) ένας μικροοργανισμός που προκαλεί λοίμωξη του κατώτερου αναπνευστικού συστήματος θα βρίσκεται στα πτύελα σε πολύ μεγαλύτερο αριθμό από τους μικροοργανισμούς που αποικίζουν το φάρυγγα και επιμολύνουν τα πτύελα κατά την απόχρεμψή τους
- β) οι μικροοργανισμοί στα πτύελα δεν βρίσκονται ομαλά κατανεμημένοι και αν καλλιεργηθούν αυτούσια πτύελα μπορεί το αποτέλεσμα να είναι αναξιόπιστο
- γ) οι διεργασίες που περιλαμβάνονται στην ποσοτική καλλιέργεια (έκπλυση, ρευστοποίηση και ομογενοποίηση) έχουν ως στόχο να ξεπεραστούν αυτά τα προβλήματα

2.8 Άλλες διαγνωστικές μέθοδοι

Κυρίως για τις άτυπες πνευμονίες, οι οποίες προκαλούνται από μικρόβια που δεν αναπτύσσονται σε κοινά θρεπτικά υλικά:

- ανίχνευση αντιγόνων στα ούρα με ανοσοχρωματογραφία → απάντηση σε 10-15 min (*Legionella pneumophila*, *Streptococcus pneumoniae*)
- ορολογική διάγνωση πνευμονίας (*Chlamydia pneumoniae*, *Chlamydia psittaci*, *Legionella pneumophila*, *Coxiella burnetti*, *Mycoplasma pneumoniae*)
- μοριακή διάγνωση πνευμονίας (όχι ακόμα τυποποιημένα kit του εμπορίου)

2.9 Αξιολόγηση Αποτελεσμάτων

- Μια θετική καλλιέργεια με *Streptococcus pneumoniae* ή *Haemophilus influenzae* συνήθως υποδεικνύει λοίμωξη από τους παραπάνω μικροοργανισμούς, αν και η φορεία των ίδιων μικροβίων μπορεί να οδηγήσει σε ψευδώς θετικό αποτέλεσμα
- Μια θετική καλλιέργεια με *Staphylococcus aureus* ή Gram αρνητικά βακτήρια γενικώς υποδεικνύει λοίμωξη από τους παραπάνω μικροοργανισμούς, όταν και στο άμεσο κατά Gram ανευρίσκονται στοιχεία φλεγμονής μαζί με τους παραπάνω μικροοργανισμούς
- Μια αρνητική καλλιέργεια δεν αποκλείει την πνευμονία. Συνήθως δεν απομονώνεται παθογόνο όταν ο ασθενής έχει ξεκινήσει την αντιμικροβιακή θεραπεία ή όταν η λοίμωξη είναι από ιούς, χλαμύδια κ.α.

2.10 Μεθοδολογία

Βγάζουμε τα τρυβλία από τον κλίβανο και τα τοποθετούμε στον πάγκο, κατά αριθμητική σειρά χωριστά των εξωτερικών ιατρειών και χωριστά των κλινικών. Το ίδιο κάνουμε για τις ανακαλλιέργειες, τις ταυτοποιητικές δοκιμασίες και τις ευαισθησίες

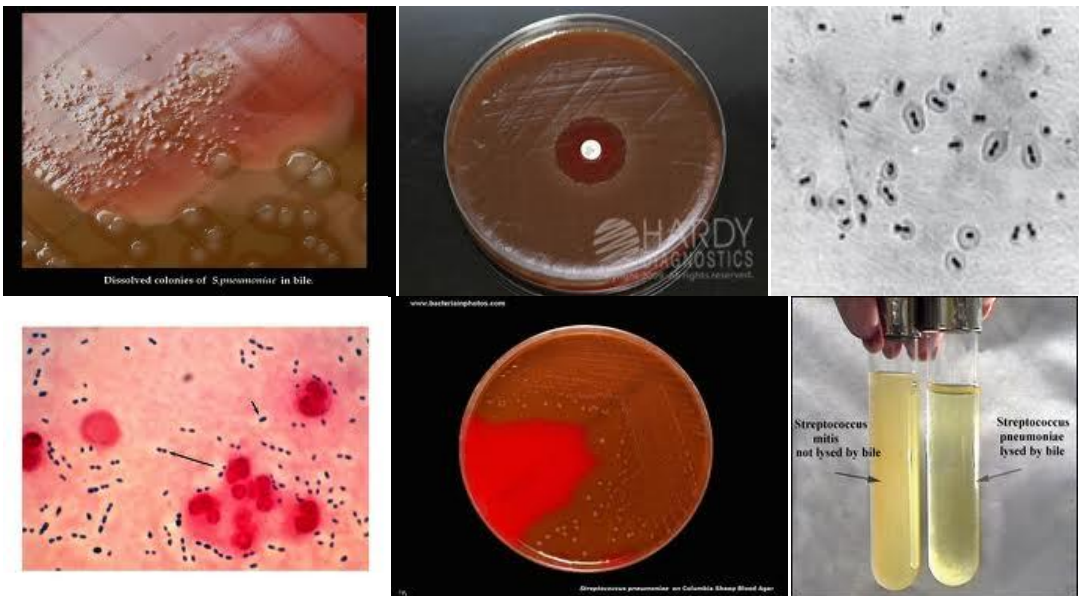
Γίνονται οι κατάλληλες δοκιμασίες για την ταυτοποίηση των μικροβιακών παθογόνων στις πιθανές θετικές καλλιέργειες

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

Διαβάζουμε τα τρυβλία με τη χρήση μεγεθυντικού φακού.

Streptococcus pneumoniae

- Χρώση Gram: Gram (+) διπλόκοκκοι, σε αλυσίδες, λογχοειδείς
- Καταλάση (-)
- Ακίνητοι, ασπορογόνοι, **ελυτροφόροι**, αερόβιοι, δυνητικά αναερόβιοι
- Το έλυτρο φέρει πολυσακχαριδικό αντιγόνο που έχει σημασία για τη λοιμογόνο δράση του μικροβίου (πάνω από 90 ορότυποι)
- Αναπτύσσονται σε σοκολατόχρωμο και αιματούχο άγαρ
- Αποικίες : στο νεαρό καλλιέργημα κυκλικές γυαλιστερές, υγρές, βλενώδεις, α-αιμολυτικές. Στο παλιό παρασκεύασμα το κέντρο της αποικίας καταρρέει (αυτολυτικές διεργασίες), δίνοντας την εικόνα μικρού πιάτου **“πιατάκι του καφέ”**
- Επώαση σε ατμόσφαιρα CO₂ 5 %, 35-37 °C για 48-72 ώρες
- Ταυτοποιείται με:
 - δοκιμασία οπτοχίνης θετική (διαφορική διάγνωση από πρασινίζοντες στρεπτοκόκκους)
 - εξέταση διαλυτότητας της χολής
 - δοκιμασία εξοιδήσεως του ελύτρου
- Μέρος της χλωρίδας του ανώτερου αναπνευστικού, προκαλεί ευκαιριακές λοιμώξεις
- **1^ο αίτιο πνευμονίας της κοινότητας!!!**



ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΠΝΕΥΜΟΝΙΑΣ ΑΠΟ *Mycobacterium tuberculosis*

Κανόνας τριών διαδοχικών δειγμάτων (τουλάχιστον)
 Δείγματα από το κατώτερο αναπνευστικό ή γαστρικό υγρό

Επεξεργασία δείγματος:

Διαλυτοποίηση (διάλυμα N-ακετυλο-L-κυστεΐνης)

Εξουδετέρωση χλωρίδας (διάλυμα NaOH)

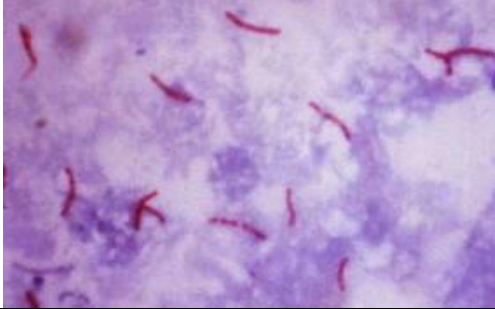
Συμπύκνωση δείγματος (ψυχόμενη φυγόκεντρος, 3.000xg)

Σε γαστρικό υγρό προηγείται η άμεση **εξουδετέρωση του pH**

Οξεάντοχη χρώση:

Ziehl-Nielsen (στερείται ευαισθησίας και ειδικότητας)

Ποσοτική έκφραση αποτελέσματος (Νομικοβακτηριδίων/κ.ο.π.)



Υγρό και στερεό θρεπτικό υλικό Lowenstein-Jensen

Εμπορικά συστήματα υγρών καλλιιεργειών:

αυξάνουν ευαισθησία

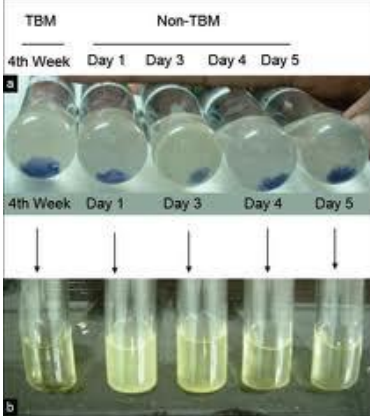
ταχύτερος χρόνος θετικοποίησης (~10 μέρες)

Ταυτοποίηση στελέχους: πλέον μοριακή (2-6 ώρες)

Νέες μοριακές τεχνικές διάγνωσης:

-άμεση μοριακή ανίχνευση MTB σε κλινικό δείγμα

-άμεση μοριακή ανίχνευση αντοχής)



M. tuberculosis colonies on agar medium



3. 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.

4. 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 καλλιιεργειών συνοδεύουν τα αποτελέσματα του ελέγχου ευαισθησίας στα αντιβιοτικά.

Αξιολόγηση απαντητικού

- Αναφέρουμε μόνο τα κλινικά σημαντικά παθογόνα
- Από στείρες περιοχές αναφέρουμε όλα τα παθογόνα που απομονώθηκαν
- Δεν απομονώθηκαν παθογόνα – Υπάρχει Φυσιολογική Χλωρίδα: **Αναπτύχθηκε Φυσιολογική Χλωρίδα**
- Απουσία ανάπτυξης: **Ουδεμία ανάπτυξη**

6. Έλεγχος Ποιότητας

Εσωτερικός ποιοτικός έλεγχος : Γίνεται με ανακαλλιέργεια προτύπων στελεχών σε αντίστοιχα θρεπτικά υλικά για κάθε μικροβιακό στέλεχος.

Εξωτερικός ποιοτικός έλεγχος : Γίνεται μέσω του 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, Crystal BBL, VITEK κ.ά.).

7. Βιβλιογραφία

- 2 Χριστάκης, Γ. Β., και Ν. Ι. κ. Λεγάκης. 2002. *Κλινική Μικροβιολογία και Λοιμώξεις*. Εκδόσεις: Παρισιάνου. Αθήνα.
- 3 Χαλεβελάκης, Γ. Ε., Ν. Ι. κ. Λεγάκης, και Τ. Η. Περόγαμβρος. 1997. *Αντιβιοτικά και Συνήθεις Λοιμώξεις*. 2η έκδοση. Εκδόσεις: Εκδόσεις Βιβλίων Χριστοδουλία Χαλεβεδάκη. Αθήνα.
- 4 *Clinical microbiology procedures handbook. Procedures Guidelines for the Microbiology Laboratory* Henry D. Isenberg, American Society for Microbiology. 2010.
- 5 Σπ. Φωκάς-Στ. Φωκάς, Φ. Μαρκάτου. 2003. *Κλινική Μικροβιολογία*. Εκδόσεις: Ιατρικές εκδόσεις Αργυρού. Αθήνα
- 6 Χαρθάλου Αικατερίνη. 2007. *Πρωτόκολλα Κλινικής Μικροβιολογίας. Σύνοψη εργαστηριακής προσπέλασης βακτηριακών λοιμώξεων*. Εκδόσεις: Ιατρικές εκδόσεις Πασχαλίδη. Αθήνα
- 7 Miller, J.M., 1999. *A Guide to Specimen Management in Clinical Microbiology*, 2nd Edition. American Society for Microbiologists, Washington D.C. Health Protection Agency, 2012
- 8 Murray, P.R., E.J. Baron, M.A. Pfaller, F.C. Tenover, and R.H. Tenover, 1999. *Manual of Clinical Microbiology*, 7th Edition. American Society for Microbiologists, Washington D.C.
- 9 Quest Diagnostic - Specimen Collection Guide. March 2001. By Quest Diagnostic
- 10 Front Cover Pictures, from Top Down and Left to Right, Courtesy of: Tenover, F.C., Ph.D., and Hirschmann, J.V., M.D., 1990.
- 11 Koneman E.W., A. S. D., Janda W.M. and Schreckenberger P.C. 2005. *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. Editors: Koneman E.W., Allen S.D., Janda W.M., Schreckenberger P.C. and Winn W.C. 6th edition. J.B. Lippincott Company: Philadelphia.
- 12 Mandell, G.L., Bennett, J.E. & Dolin, R., *Principles and Practice of Infectious Diseases*, 7th edn, 2010. Churchill Livingstone, New York.