

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	3/12/2012
Τίτλος εργαστηριακής άσκησης	ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΟΦΘΑΛΜΙΚΟΥ-ΩΤΙΚΟΥ-ΥΓΡΟΥ ΠΑΡΑΡΡΙΝΙΩΝ ΚΟΛΠΩΝ

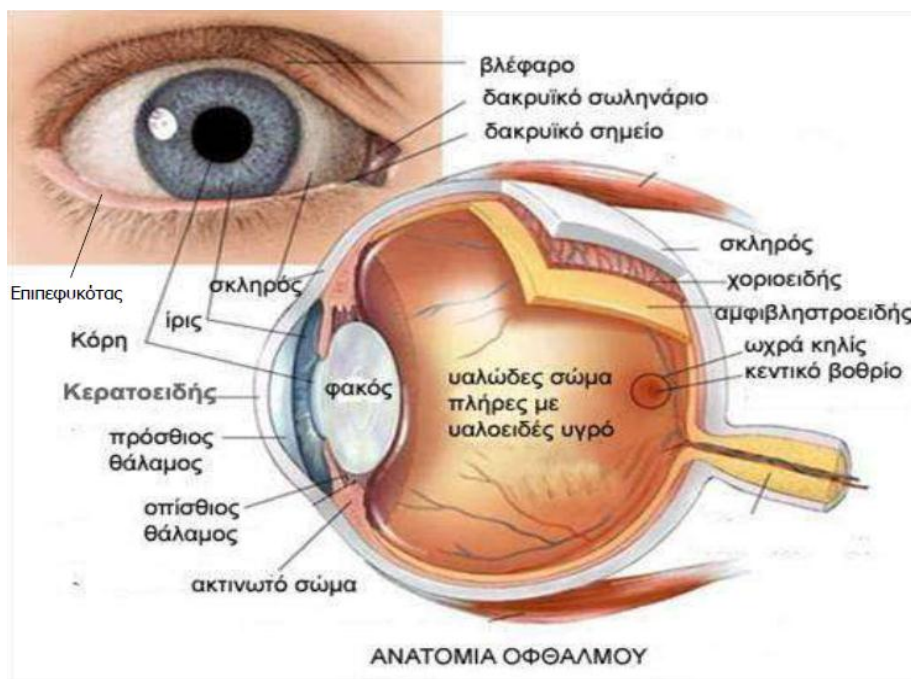
Σκοπός

Η αναγνώριση από το άμεσο παρασκεύασμα (όταν αυτό είναι δυνατό), η απομόνωση και η ταυτοποίηση παθογόνων μικροοργανισμών με διάφορες μεθόδους σε κλινικά δείγματα. Πραγματοποίηση οξεάντοχων χρώσεων.

1. ΟΦΘΑΛΜΙΚΟ ΔΕΙΓΜΑ

1.1 Είδος Δείγματος - Λήψη-Μεταφορά

Το είδος του δείγματος και η λήψη εξαρτάται από την εστία και το είδος της λοίμωξης.



ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ ΟΦΘΑΛΜΟΥ

ΚΛΙΝΙΚΟ ΣΥΝΔΡΟΜΟ	ΕΣΤΙΑ ΛΟΙΜΩΞΗΣ	ΚΛΙΝΙΚΑ ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΑ ΚΑΙ ΕΝΔΕΙΞΕΙΣ	ΣΗΜΑΝΤΙΚΟΤΕΡΑ ΠΑΘΟΓΟΝΑ	ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΠΟΥ ΣΥΛΛΕΓΟΝΤΑΙ
ΕΠΙΠΕΦΥΚΙΤΙΔΑ	Οξεία ή χρόνια φλεγμονή του επιπεφυκότα	Ερυθρότητα του επιπεφυκότα, αυξημένη δακρύρροια, πυώδες έκκριμα από τον ένα ή και τους δύο οφθαλμούς	<i>H. influenzae</i> , <i>S. pneumoniae</i> , <i>S. pyogenes</i> , <i>N. gonorrhoeae</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Chlamydia trachomatis</i> , <i>Moraxella spp</i> , <i>Pseudomonas spp</i> , Εντεροβακτηριακά, <i>M. tuberculosis</i> , <i>Francisella tularensis</i>	Πυώδες έκκριμα ή επίχρισμα με στυλεό, ξέσματα επιπεφυκότα
ΒΛΕΦΑΡΙΤΙΔΑ	Βλέφαρα	Ερυθρότητα, βλεφαρικό οίδημα, ευαισθησία, περιορισμός των βλεφαρικών κινήσεων	<i>S. aureus</i> , CNS, <i>Propionibacterium acnes</i>	Επίχρισμα με στυλεό
ΔΑΚΡΥΟΑΔΕΝΙΤΙΣ/ ΔΑΚΡΥΟΚΥΣΤΙΤΙΣ/ ΦΛΕΓΜΟΝΗ ΤΟΥ ΔΑΚΡΥΙΚΟΥ ΣΩΛΗΝΑΡΙΟΥ (CANALICULITIS)	Δακρυϊκοί αδένες/ Δακρυϊκός ασκός/ Δακρυϊκό σωληνάριο	Ερυθρότητα στο εσωτερικό του βλεφάρου, οίδημα, πόνος, δακρύρροια, πυώδες έκκριμα από τον δακρυϊκό πόρο	<i>S. aureus</i> , <i>Streptococci spp</i> , <i>N. gonorrhoeae</i> , <i>M. tuberculosis</i> , <i>Actinomyces israelii</i> , <i>Actinomyces odontolyticus</i> , <i>Fusobacterium spp</i> , <i>Nocardia spp</i>	Επίχρισμα από επιφανειακά τραύματα στην εκβολή του δακρυϊκού πόρου ή πυώδες έκκριμα με στυλεό
ΚΕΡΑΤΙΤΙΔΑ	Οξεία ή χρόνια φλεγμονή του κερατοειδούς χιτώνα	Ερυθρότητα ματιού, φλεγμονή του επιπεφυκότα, πόνος μειωμένη όραση και φωτοφοβία. Μπορεί να οδηγήσει σε τύφλωση	<i>Ps. aeruginosa</i> (φακοί επαφής), <i>S. aureus</i> , <i>S. pneumoniae</i> , <i>Viridans group streptococci</i> , Εντεροβακτηριακά, <i>Moraxella spp</i> , <i>Nocardia spp</i> , <i>Bacillus spp</i> , <i>Mycobacterium spp</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>Fusarium spp</i> , <i>Aspergillus spp</i> , <i>Acanthamoeba spp</i>	Ξέσματα του κερατοειδούς
ΕΝΔΟΘΦΑΛΜΙΤΙΔΑ	Φλεγμονή οφθαλμικών κοιλοτήτων και ενδοφθalmικού ιστού	Τραυματισμός, χειρουργική επέμβαση, αιματογενής διασπορά του παθογόνου μικροβίου	<i>S. aureus</i> , CNS, <i>S. pneumoniae</i> , <i>Viridans group streptococci</i> , <i>Ps. aeruginosa</i> , Εντεροβακτηριακά, <i>Bacillus spp</i> , <i>H. influenzae</i> , αναερόβια, <i>N. gonorrhoeae</i> , <i>N. meningitis</i> , <i>Propionibacterium acnes</i> , <i>Candida spp</i> , <i>Fusarium spp</i> , <i>Aspergillus spp</i>	Υγρό παρακέντησης
ΠΕΡΙΚΟΓΧΙΚΗ ΚΑΙ ΚΟΓΧΙΚΗ ΚΥΤΤΑΡΙΤΙΔΑ	Φλεγμονή περικογχικών και κογχικών ιστών	Τραυματισμός, χειρουργική επέμβαση, επέκταση παραρρινοκολπίτιδας, επέκταση ενδοφθαλμίτιδας	<i>H. influenzae</i> , <i>S. pneumoniae</i> , <i>S. pyogenes</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Ps. aeruginosa</i> , Εντεροβακτηριακά, αναερόβια, <i>Aspergillus spp</i> , <i>Mucor spp</i>	Επίχρισμα από επιφανειακά τραύματα, αιμοκαλλιέργειες, υγρό παρακέντησης

- Όλα τα δείγματα λαμβάνονται πριν από τη λήψη αντιμικροβιακής θεραπείας
- Για λήψη υλικού στο οποίο αναζητείται Chlamydia ή Neisseria OXI βαμβακοφόρος στυλεός
- Τα αναισθητικά που χρησιμοποιούνται μπορεί να είναι ανασταλτικά για κάποια παθογόνα

1.2 Λήψη δειγμάτων κατά κλινικό σύνδρομο

A) Επιπεφυκίτιδα/βλεφαρίτιδα

Επίχρισμα

Καθαρισμός δέρματος γύρω από τον οφθαλμό με ήπιο αντισηπτικό

Εφύγρανση στυλεού (βαμβακοφόρου, Dacron ή αλγινικού ασβεστίου) με στείρο φυσιολογικό ορό

Λήψη επιχρίσματος περιστρέφοντας το στυλεό πάνω στον επιπεφυκότα ή στο βλέφαρο

Λήψη επιχρίσματος και από τον οφθαλμό που δεν φλεγμαίνει για συγκριτική μελέτη ενδογενούς φυσιολογικής χλωρίδας



Έκκριμα

Καθαρισμός δέρματος γύρω από τον οφθαλμό με ήπιο αντισηπτικό

Συλλογή πυώδους εκκρίματος με υγρό στυλεό

Ξέσματα

Καθαρισμός δέρματος γύρω από τον οφθαλμό με ήπιο αντισηπτικό

Ενστάλαξη 1 ή 2 σταγόνων τοπικού αναισθητικού

Με αποστειρωμένη σπάτουλα Kimura ξύνεται το κάτω κόλπωμα του επιπεφυκότα



B) Κερατίτιδα

Ξέσματα

Καθαρισμός δέρματος γύρω από τον οφθαλμό με ήπιο αντισηπτικό

Ενστάλαξη 1 ή 2 σταγόνων τοπικού αναισθητικού

Με αποστειρωμένη σπάτουλα Kimura ξύνονται τα έλκη ή οι αλλοιώσεις (το βλέφαρο πρέπει να κρατιέται ανοιχτό και να μην αγγιχτούν οι βλεφαρίδες)

Πραγματοποιούνται 3-5 λήψεις ανά κερατοειδή χιτώνα

Γ) Ενδοφθαλμίτιδα

Χρήση τοπικού αναισθητικού

Παρακέντηση με σύριγγα υπό άσηπτες συνθήκες και λήψη υαλοειδούς (παρακέντηση υαλοειδούς σώματος) ή υδατοειδούς υγρού (παρακέντηση πρόσθιου θαλάμου)

Δ) Περικογχική/κογχική κυτταρίτιδα

Καθαρισμός του δέρματος με αλκοόλη 70% και ιωδιούχο διάλυμα

Επί ανοιχτού τραύματος, αναρρόφηση πυώδους συλλογής με σύριγγα

Επί κλειστού τραύματος, διάνοιξη με νυστέρι στο πάνω ή στο κάτω βλέφαρο και λήψη με αναρρόφηση

Λήψη αιμοκαλλιέργειας

Ε) Δακρυοαδενίτιδα

Καθαρισμός δέρματος γύρω από τον οφθαλμό με ήπιο αντισηπτικό

Συλλογή πυώδους εκκρίματος με υγρό στυλεό

ΣΤ) Δακρυοκυστίτιδα

Καθαρισμός δέρματος γύρω από τον οφθαλμό με ήπιο αντισηπτικό

Συλλογή πυώδους εκκρίματος με υγρό στυλεό, κατόπιν πίεσης του δακρυϊκού ασκού

Εναλλακτικά, συλλογή του πυώδους εξιδρώματος με σύριγγα υπό άσηπτες συνθήκες

Λήψη επιχρίσματος και από τον επιπεφυκότα που δεν φλεγμαίνει για συγκριτική μελέτη ενδογενούς φυσιολογικής χλωρίδας

Ζ) Φλεγμονή δακρυϊκού σωληναρίου

Καθαρισμός δέρματος γύρω από τον οφθαλμό με ήπιο αντισηπτικό

Δακτυλική πίεση στην έσω πλευρά του βλεφάρου για την εξαγωγή πυώδους εκκρίματος

Συλλογή πυώδους εκκρίματος με υγρό στυλεό

1.3 Μεταφορά -χειρισμός δειγμάτων

- Τα οφθαλμικά δείγματα πρέπει να ενοφθαλμίζονται άμεσα στα θρεπτικά υλικά για καλλιέργεια και σε αντικειμενοφόρες πλάκες για την πραγματοποίηση χρώσεων (Gram, Giemsa) ή να μην καθυστερεί η μεταφορά πάνω από 2 ώρες
- Τα υγρά παρακέντησης μεταφέρονται σε στείρα δοχεία ή στη σύριγγα αφού προηγουμένως αφαιρεθεί η βελόνα και πωματιστεί. Εναλλακτικά μπορούν να χρησιμοποιηθούν συστήματα μεταφοράς αναεροβίων
- Όταν στο δείγμα αναζητούνται χλαμύδια χρησιμοποιείται ειδικό υλικό μεταφοράς (CTM)
- Δείγματα ληφθέντα χειρουργικά, δείγματα μεταμόσχευσης, ιστοί και ξένα σώματα μεταφέρονται σε στείρα δοχεία

1.4 Θρεπτικά υλικά

Αιματούχο άγαρ (Ht) O ₂ και Αιματούχο άγαρ (Ht) AN
Σοκολατόχρωμο άγαρ (Choc)
McConekey άγαρ No2 (N2)
Θειογλυκολικός ζυμός ή άλλος ζυμός για καλλιέργεια αναερόβιων
Sabouraud άγαρ (Sb)
Υλικά καλλιέργειας μυκοβακτηριδίων
Fildes
Modified Thayer Martin (MTM)

1.5 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:
 - Δύο Ht, το ένα για αερόβια επώαση και το άλλο για αναερόβια. Στο αναερόβιο Ht βάζουμε και δισκίο μετρονιδαζόλης για τον διαχωρισμό των αναερόβιων τα οποία είναι ανθεκτικά
 - Choc άγαρ μόνο του για την απομόνωση *Neisseria spp*, *Haemophilus spp* και *Streptococcus pneumoniae*
 - N2 για διάκριση εντεροβακτηριακών και *Pseudomonas spp*
 - Sabouraud άγαρ για μύκητες
 - Κατά περίπτωση χρησιμοποιούνται Fildes για *Haemophilus spp*, Modified Thayer Martin για *Neisseria gonorrhoeae* και υλικά καλλιέργειας μυκοβακτηριδίων
 - Δείγματα ληφθέντα χειρουργικά, δείγματα μεταμόσχευσης, ιστοί και ξένα σώματα τοποθετούνται σε θειογλυκολικό ζυμό, από τον οποίο θα γίνουν ανακαλλιέργειες σε στερεά θρεπτικά υλικά

Μη αποδεκτά οφθαλμικά δείγματα !!! Κανένα δεν απορρίπτεται πριν ειδοποιηθεί ο γιατρός. Απορρίπτουμε δείγματα που αποστέλλονται με καθυστέρηση στο εργαστήριο

1.6 Αξιολόγηση Αποτελεσμάτων

- Σε υλικό παρακέντησης οποιαδήποτε ανάπτυξη αξιολογείται γιατί είναι υλικό φύσει στείρο
- Σε δείγματα που αναμένεται ανάπτυξη ενδογενούς χλωρίδας η αξιολόγηση είναι δυσκολότερη
- Η αναζήτηση παθογόνων σε δείγματα μικτής χλωρίδας προϋποθέτει γνώση του ιστορικού και της κλινικής εικόνας του ασθενούς, την άμεση μικροσκοπική εξέταση και τη γνώση της φυσιολογικής χλωρίδας μετά από συγκριτική μελέτη της χλωρίδας του υγιούς οφθαλμού
- Μεγάλη ανάπτυξη ή και μονοκαλλιέργημα μικροβίου της φυσιολογικής χλωρίδας αξιολογείται πάντα σε συνδυασμό με τα ευρήματα της μικροσκοπικής εξέτασης

Φυσιολογική χλωρίδα επιπεφυκότα

<i>Staphylococci coagulase negative (CNS)</i>
<i>Micrococcus spp</i>
<i>Moraxella spp</i>
<i>Haemophilus influenzae</i>
<i>Corynebacterium spp</i>
<i>Propionibacterium acnes</i>
<i>Streptococcus spp</i>
Gram αρνητικά βακτήρια
Αναερόβια

Νεογνική επιπεφυκίτιδα (ophthalmia neonatum)

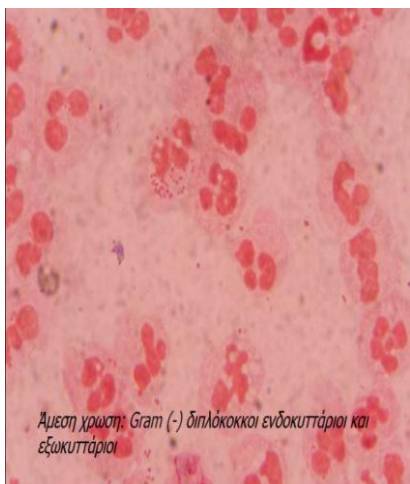
Neisseria gonorrhoeae

Επαφή με μολυσμένο γεννητικό σύστημα της μητέρας κατά τον τοκετό, πυώδες εξίδρωμα τις πρώτες 3-10 μέρες
 Ο γονόκοκκος μπορεί να διαπεράσει ακόμη και το ανέπαφο (χωρίς τραυματισμό) επιθήλιο του κερατοειδούς προκαλώντας σημαντικές βλάβες, αν δεν αντιμετωπιστεί με ειδική αντιβιοτική αγωγή

Chlamydia trachomatis

Επαφή με μολυσμένο γεννητικό σύστημα της μητέρας κατά τον τοκετό, πυώδες εξίδρωμα τις πρώτες 2-4 μέρες
 Δυνητικά τύφλωση

Haemophilus influenzae, Streptococcus pneumoniae, Staphylococcus aureus, Gram (-) βακτήρια



Οξεία βλεφαρίτιδα
 Επιπεφυκίτιδα



Νεογνική επιπεφυκίτιδα
 από *Chlamydia trachomatis*

SCIENCEPHOTOLIBRARY

Λοίμωξη από χλαμύδια

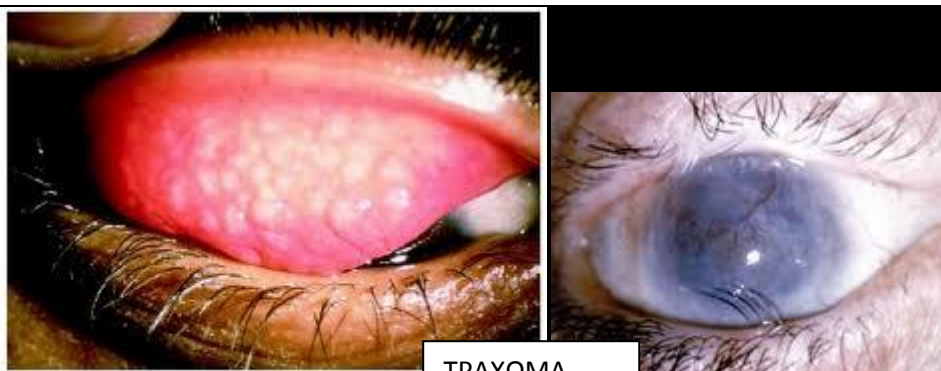
1. Επιπεφυκίτιδα από έγκλειστα

Chlamydia trachomatis ορότυποι D, Da, E, F, G, H, I, J, K
Συνδέεται με τραχηλίτιδα ή ουρηθρίτιδα σε νεαρά άτομα
20% περιστατικών επιπεφυκίτιδας στις ανεπτυγμένες χώρες

2. Τράχωμα

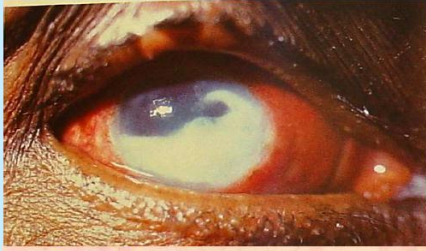
Chlamydia trachomatis ορότυποι A, B, Ba, C
Χρόνια επιπεφυκίτιδα με σχηματισμό ουλών, ειστροφή βλεφάρων, ουλοποίηση κερατοειδούς, τύφλωση (3^ο συχνότερο αίτιο τύφλωσης παγκοσμίως μετά τον καταρράκτη και το γλαύκωμα), συνήθως σε χώρες με ανεπαρκείς συνθήκες υγιεινής

Διάγνωση: σε ξέσματα ή επιχρίσματα επιπεφυκότα
DFA (άμεσος ανοσοφθορισμός)
Giemsa (ενδοκυτταροπλασματικά έγκλειστα)
PCR

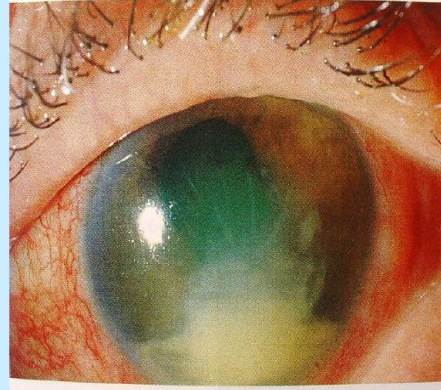


Επιπεφυκίτιδα από
Chlamydia trachomatis

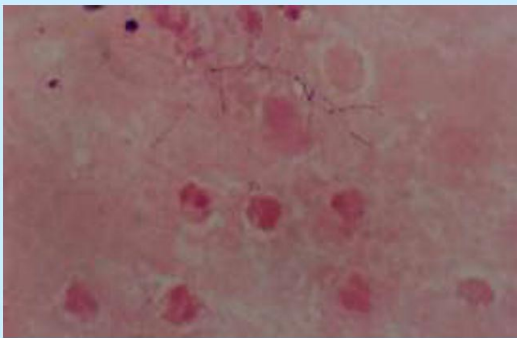
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΑΣΚΗΣΗ: ΟΦΘΑΛΜΙΚΑ-ΩΤΙΚΑ-ΥΓΡΑ ΠΑΡΑΡΡΙΝΙΩΝ ΚΟΛΠΩΝ



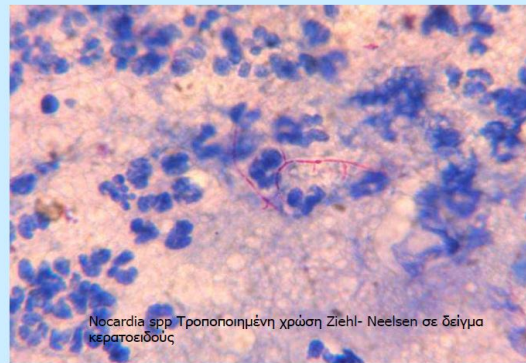
Κερατίτιδα από
S. pneumoniae



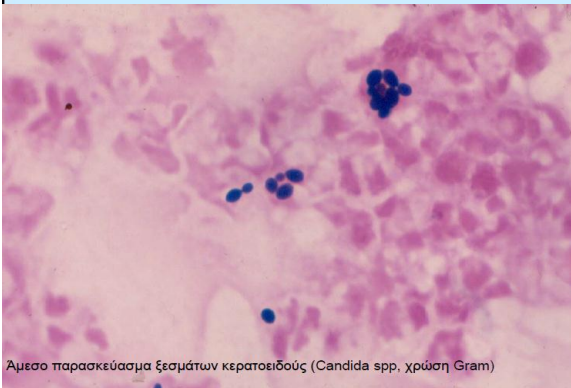
Κερατίτιδα- υπόπυον *S. aureus*



Nocardia spp: άμεση χρώση Gram σε δείγμα κερατοειδούς



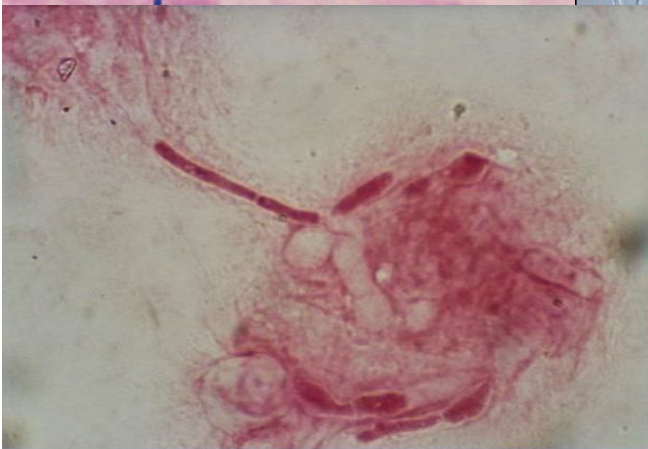
Nocardia spp Τροποποιημένη χρώση Ziehl- Neelsen σε δείγμα κερατοειδούς



Άμεσο παρασκεύασμα ξεσμάτων κερατοειδούς (*Candida* spp, χρώση Gram)



Fusarium spp (μικροσκοπική εικόνα καλλιέργηματος x 400)



Άμεσο παρασκεύασμα ξεσμάτων κερατοειδούς με νηματοειδείς υφές (χρώση Gram)



Νωπό παρασκεύασμα *Alternaria* spp X400

2 ΩΤΙΚΟ ΔΕΙΓΜΑ

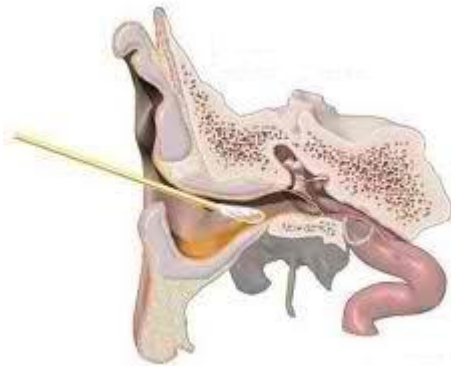
2.1 Είδος Δείγματος - Λήψη

Το είδος του δείγματος και η λήψη εξαρτάται από την εστία και το είδος της λοίμωξης



A) Εξωτερική ωτίτιδα

- Εφύγνωση στυλεού (βαμβακοφόρου, Dacron ή αλγινικού ασβεστίου) με στείρο φυσιολογικό ορό
- Εισαγωγή του στυλεού στον έξω ακουστικό πόρο μέχρι το σημείο που θα συναντήσει αντίσταση
- Περιστροφή του στυλεού για συλλογή του υγρού



B) Μέση ωτίτιδα

- Καθαρισμός του έξω ακουστικού πόρου με ήπιο αντισηπτικό
- Παρακέντηση τυμπάνου με σύριγγα και αναρρόφηση υγρού (μόνο επί υποψίας ασυνήθιστου ή ανθεκτικού στα αντιβιοτικά μικροβίου)
- Σε περίπτωση ρήξης τυμπάνου, γίνεται λήψη του υγρού με λεπτό, εύκαμπτο στυλεό και τη βοήθεια κατόπτρου

2.2 Μεταφορά -χειρισμός δειγμάτων

- Οι στυλεοί μεταφέρονται σε υλικό μεταφοράς Amies ή Stuart
- Τα υγρά παρακέντησης μεταφέρονται σε στείρα δοχεία ή στη σύριγγα αφού προηγουμένως αφαιρεθεί η βελόνα και πωματιστεί
- Μεταφορά ≤ 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου

ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ ΩΤΟΣ

ΚΛΙΝΙΚΟ ΣΥΝΔΡΟΜΟ	ΕΣΤΙΑ ΛΟΙΜΩΞΗΣ	ΚΛΙΝΙΚΑ ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΑ ΚΑΙ ΕΝΔΕΙΞΕΙΣ	ΑΙΤΙΑ	ΣΗΜΑΝΤΙΚΟΤΕΡΑ ΠΑΘΟΓΟΝΑ
ΟΞΕΙΑ ΕΞΩΤΕΡΙΚΗ ΩΤΙΤΙΔΑ (SWIMMER'S EAR)	Έξω ακουστικός πόρος	Τοπικός κνησμός, πόνος, ερυθρότητα, οίδημα	Συχνότερη το καλοκαίρι. Μειωμένη έκκριση κυψελίδας και βακτηριακή υπερανάπτυξη	<i>Ps. aeruginosa</i> <i>S. pneumoniae</i> , <i>S. pyogenes</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>Aspergillus spp</i>
ΧΡΟΝΙΑ ΕΞΩΤΕΡΙΚΗ ΩΤΙΤΙΔΑ	Έξω ακουστικός πόρος	Κνησμός, σπάνια πόνος	Επανειλημμένα μικροτραύματα ή έκκριμα λόγω χρόνιας μέσης ωτίτιδας	<i>Ps. aeruginosa</i> , <i>S. pneumoniae</i> , <i>S. pyogenes</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>Aspergillus spp</i>
ΟΞΕΙΑ ΜΕΣΗ ΩΤΙΤΙΔΑ	Μέσο ους	Ωταλγία, πυρετός, αίσθημα πληρότητας, μείωση ακουστικής οξύτητας	Απόφραξη ευσταχιανών σαλπίνγων και συσσώρευση υγρού στο μέσο ους και στις μαστοειδείς κυψέλες	<i>S. pneumoniae</i> , <i>H. influenzae</i> , <i>M. catarrhalis</i> , <i>S. pyogenes</i> , <i>S. aureus</i>
ΧΡΟΝΙΑ ΜΕΣΗ ΩΤΙΤΙΔΑ	Μέσο ους	Βαρηκοΐα, αίσθημα πληρότητας, εκροή πυώδους υγρού από την ραγείσα τυμπανική μεμβράνη	Επανειλημμένα επεισόδια οξείας μέσης ωτίτιδας. Σχηματισμός βιομεμβράνης	<i>Ps. aeruginosa</i> , <i>S. aureus</i> , Εντεροβακτηριακά, αναερόβια, <i>Candida spp</i> , <i>CNS</i> , <i>Corynebacterium spp</i> , <i>M. tuberculosis</i>

ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΗ ΧΛΩΡΙΔΑ ΩΤΟΣ

Συνήθεις αποικιστές του δέρματος όπως:

Corynebacterium spp

Staphylococcus spp

Micrococcus spp

Neisseria spp

2.3 Θρεπτικά υλικά

Αιματούχο άγαρ (Ht) O ₂
Σοκολατόχρωμο άγαρ (Choc)
McConkey άγαρ No2 (N2)
Αιματούχο άγαρ (Ht) AN
Sabouraud άγαρ (Sb)
Chapman
Θειογλυκολικός ζωμός ή άλλος ζωμός για καλλιέργεια αναερόβιων

2.4 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:
 - Δύο Ητ, το ένα για αερόβια επώαση και το άλλο για αναερόβια. Στο αναερόβιο Ητ βάζουμε και δισκίο μετρονιδαζόλης για τον διαχωρισμό των αναεροβίων τα οποία είναι ανθεκτικά
 - Choc άγαρ μόνο του για την απομόνωση *Haemophilus influenzae* και *Streptococcus pneumoniae*
 - N2 για διάκριση εντεροβακτηριακών και *Pseudomonas aeruginosa*
 - Sabouraud άγαρ για μύκητες
 - Charman για τη διάκριση *Staphylococcus aureus*

2.5 Άλλες διαγνωστικές μέθοδοι

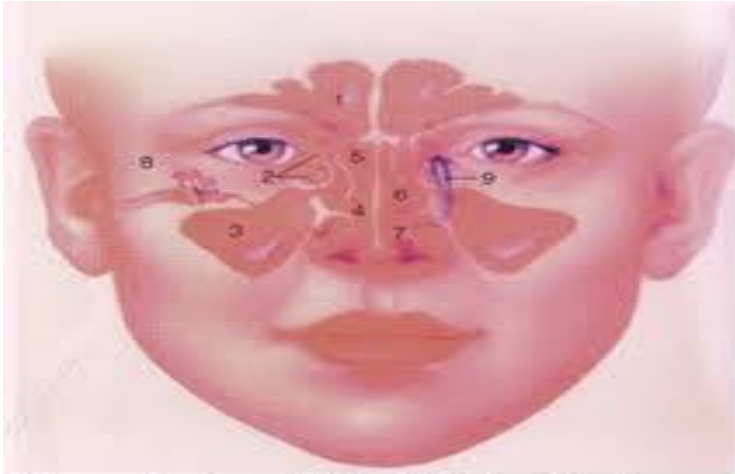
Η PCR για την αναζήτηση παθογόνων της μέσης ωτίτιδας είναι πιο ευαίσθητη μέθοδος από την καλλιέργεια και αυξάνει το ποσοστό ανίχνευσης του παθογόνου κατά 75%

2.6 Αξιολόγηση Αποτελεσμάτων

- Σε υλικό παρακέντησης οποιαδήποτε ανάπτυξη αξιολογείται γιατί είναι υλικό φύσει στείρο
- Η λήψη δείγματος από το ρινοφάρυγγα για την αποκάλυψη παθογόνων μέσης ωτίτιδας δεν πρέπει να γίνεται γιατί τα αποτελέσματα είναι αναξιόπιστα
- Ομοίως και η λήψη από τον έξω ακουστικό πόρο δεν αντιπροσωπεύει τα παθογόνα μέσης ωτίτιδας παρά μόνο σε περίπτωση εκροής υγρού από πρόσφατη ρήξη τυμπάνου
- Μια αρνητική καλλιέργεια δεν αποκλείει την ωτίτιδα. Ιδίως σε περιπτώσεις χρόνιας μέσης ωτίτιδας δεν απομονώνεται συνήθως παθογόνο

3. ΥΓΡΟ ΠΑΡΑΡΡΙΝΙΩΝ ΚΟΛΠΩΝ

3.1 Είδος Δείγματος - Λήψη-Μεταφορά



1.Μετωπιαίος κόλπος 2.Ηθμοειδείς κόλποι 3.Ιγμόρεια
4.Ρινική κοιλότητα 5.Άνω ρινική κόγχη 6.Μέση ρινική κόγχη
7. Κάτω ρινική κόγχη 8.Αυτί 9.Δακρυϊκός πόρος

- Καθαρισμός δέρματος με ήπιο αντισηπτικό
- Χρήση τοπικού αναισθητικού
- Παρακέντηση με σύριγγα και αναρρόφηση του υγρού
- Σε περίπτωση που δεν αναρροφάται καθόλου υλικό, γίνεται έγχυση 2 ml στείρου φυσιολογικού ορού και εκ νέου αναρρόφηση

3.2 Μεταφορά - χειρισμός

- Το υγρό παρακέντησης μεταφέρεται σε στείο δοχείο ή στη σύριγγα αφού προηγουμένως αφαιρεθεί η βελόνα και πωματιστεί.
- Εναλλακτικά μπορούν να χρησιμοποιηθούν συστήματα μεταφοράς αναεροβίων
- Μεταφορά \leq 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου



ΑΙΤΙΑ ΠΑΡΑΡΡΙΝΟΚΟΛΠΙΤΙΔΩΝ

- Οι παραρρίνιοι κόλποι είναι αεριζόμενες κοιλότητες των οστών του προσώπου που επικοινωνούν με τη ρινική κοιλότητα. Αυτοί είναι: τα ιγμόρεια άντρα, οι μετωπιαίοι κόλποι, οι ηθμοειδείς κυψέλες και ο σφηνοειδής κόλπος.
- Διακοπή της επικοινωνίας με τη ρινική κοιλότητα με επακόλουθη συσσώρευση βλέννας και μικροβίων, προκαλούν τις παραρρινοκολπίτιδες (οξείες και χρόνιες). Η πιο συχνή είναι η ιγμορίτιδα και ακολουθούν η ηθμοειδίτιδα, η μετωπιαία και η σφηνοειδής κολπίτιδα.
- Τα συνήθη αίτια των παραρρινοκολπίτιδων κατά σειρά συχνότητας απομόνωσης είναι: *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Streptococcus pyogenes*
- Πιο σπάνια απομονώνονται αναερόβια, *Staphylococcus aureus* και Gram αρνητικά βακτήρια (συνήθως νοσοκομειακοί ασθενείς)
- Η μυκητιασική παραρρινοκολπίτιδα διακρίνεται σε διεισδυτική (ανοσοκατασταλμένοι ασθενείς, συχνότερο αίτιο μύκητες της τάξης *Mucorales*) και μη διεισδυτική (ανοσοεπαρκή άτομα, χρόνια νόσος, υπεύθυνος μύκητας ο *Aspergillus spp*)

3.3 Θρεπτικά υλικά

Αιματούχο άγαρ (Ht) O ₂
Αιματούχο άγαρ (Ht) AN (κατά περίπτωση)
Σοκολατόχρωμο άγαρ (Choc)
McConkey άγαρ No2 (N2) (κατά περίπτωση)
Sabouraud άγαρ (Sb) (κατά περίπτωση)

3.4 Εμβολιασμός

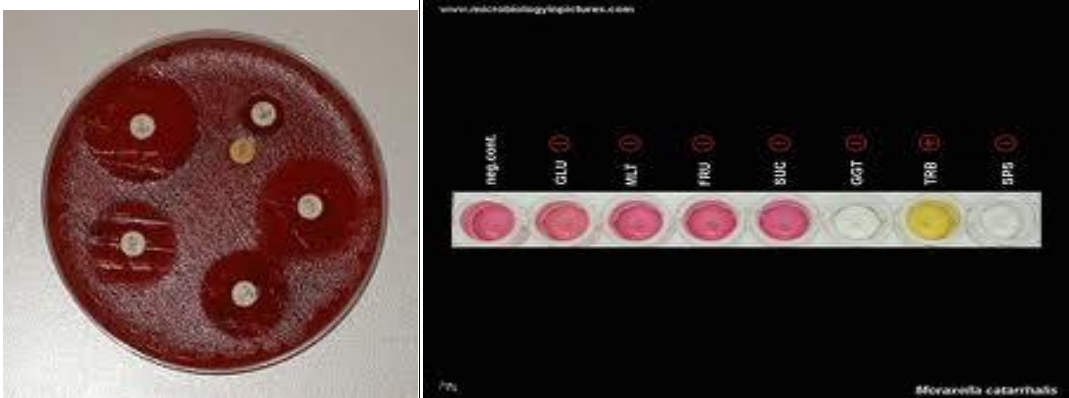
- Αριθμούμε τα δείγματα και τα παραπεμπτικά με βάση τα Βιβλία του εργαστηρίου
- Σε όλα τα δείγματα ετοιμάζουμε άμεσα παρασκευάσματα για χρώση και μικροσκόπηση
- Στα Βιβλία σημειώνουμε οτιδήποτε άλλο γράφει το παραπεμπτικό. Π.χ. ηλικία, ιστορικό, συμπτώματα, λήψη αντιμικροβιακών (θεραπεία ή χημειοπροφύλαξη).
- Ο εμβολιασμός του δείγματος γίνεται σε:
 - Δύο Ht, το ένα για αερόβια επώαση και το άλλο για αναερόβια (μόνο αν υπάρχει υποψία). Στο αναερόβιο Ht βάζουμε και δισκίο μετρονιδαζόλης για τον διαχωρισμό των αναερόβιων τα οποία είναι ανθεκτικά
 - Choc άγαρ μόνο του για την απομόνωση *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* και *Moraxella catarrhalis*
 - N2 για διάκριση Gram αρνητικών (σε σπάνιες περιπτώσεις)
 - Sabouraud άγαρ για μύκητες (μόνο όταν υποψιαζόμαστε μυκητιασική παραρρινοκολπίτιδα)

3.5 Αξιολόγηση Αποτελεσμάτων

- Ρινικά και ρινοφαρυγγικά δείγματα δεν πρέπει να καλλιεργούνται για την αποκάλυψη παθογόνων παραρρινοκολπίτιδας, γιατί τα αποτελέσματα είναι αναξιόπιστα
- Μια αρνητική καλλιέργεια δεν αποκλείει την παραρρινοκολπίτιδα. Συνήθως δεν απομονώνεται παθογόνο
- Το άμεσο κατά Gram βαμμένο παρασκεύασμα είναι πολύ χρήσιμη εφ' όσον το δείγμα είναι από παρακέντηση. Η ανεύρεση ενός τύπου βακτηρίου μπορεί να έχει διαγνωστική αξία

Brachamella (Moraxella) catarrhalis

- Χρώση Gram: Gram (-) αρνητικοί διπλόκοκκοι, νεφροειδείς, ενδο- και εξωκυττάριοι
- Οξειδάση (+), Καταλάση (+), νιτρικά (+)
- Ακίνητοι, ασπορογόνοι, χωρίς έλυτρο, αερόβιοι και προαιρετικά αναερόβιοι
- Αναπτύσσονται σε σοκολατόχρωμο και αιματούχο άγαρ
- Αποικίες : γκρι-άσπρες ημισφαιρικές, διαμέτρου 1mm, «μετακινούμενες» στο τρυβλίο
- Επώαση σε ατμόσφαιρα O₂ ή CO₂ 5 %, 35-37 °C για 48-72 ώρες
- Δεν ζυμώνουν τη γλυκόζη, μαλτόζη, σουκρόζη, λακτόζη
- Ταυτοποιείται με συμβατικά και με αυτόματα ταυτοποιητικά συστήματα που στηρίζονται κυρίως στη δοκιμή διάσπασης σακχάρων σε συνδυασμό και με άλλες βιοχημικές ιδιότητες
- Συνήθης κάτοικος του αναπνευστικού και ευκαιριακά παθογόνο
- 3^ο αίτιο οξείας μέσης ωτίτιδας και ιγμορίτιδας σε παιδιά



3.6 Μεθοδολογία

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

3.7 Έλεγχος ευαισθησίας στα αντιβιοτικά

Στις λοιμώξεις οφθαλμού, ωτός και παραρρινίων κόλπων η θεραπεία είναι συνήθως εμπειρική. Μόνο σε περίπτωση απομόνωσης και ταυτοποίησης κάποιου ασυνήθιστου ή πολυανθεκτικού παθογόνου γίνεται έλεγχος ευαισθησίας στα αντιβιοτικά

3.8 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 καλλιεργειών 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**

4. 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.).

5. Βιβλιογραφία

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