

# ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑ II

ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ «ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ ΚΑΙ ΔΙΑ ΒΙΩΣΙΜΗΣ ΜΑΘΗΣΗΣ»  
ΠΡΟΤΥΠΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ

ΤΕΧΝΙΚΗ ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ ΚΑΙ ΚΑΤΑΡΤΙΣΗ

Με Γενικό Διευθυντή τον Πρύτανη κ. Γ. Παπαδόπουλο

2<sup>ος</sup> Κύκλος

Τεχνολογία Βιοφάρμακων και Βιοτεχνολογία Εργαστηρίων

# ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑ II



ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΕΘΝΙΚΗΣ ΠΑΙΔΕΙΑΣ ΚΑΙ ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ  
ΠΑΙΔΑΓΩΓΙΚΟ ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ

ΤΕΧΝΙΚΑ ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΑ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΗΡΙΑ

Μενεγάτου Δ. Νικολοπούλου-Ντέρου Ε. Παυλινέρη Π.

2<sup>ου</sup> κύκλου

Ειδικότητα: Βοηθών Ιατρικών και Βιολογικών Εργαστηρίων

# ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑ II



ΤΟΜΕΑΣ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΠΡΟΝΟΙΑΣ

ΑΘΗΝΑ 2001



## ΤΟΜΕΑΣ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΠΡΟΝΟΙΑΣ

### ΣΥΓΓΡΑΦΕΙΣ

**Δρ. Νικολοπούλου - Ντέρου Ελένη** Ιατρός Βιοπαθολόγος, Διευθύντρια Ε.Σ.Υ.

**Μενεγάτου Διονυσία** Ιατρός Βιοπαθολόγος, Επιμελήτρια Ε.Σ.Υ.

**Παυλινέρη Παναγιώτα** Τεχνολόγος Ιατρικών Εργαστηρίων, Εκπαιδευτικός Π.Ε. 18

### ΕΠΠΡΟΠΗ ΚΡΙΣΗΣ

**Δρ. Παπακωνσταντίνου -Σπυράκου Ουρανία** Ιατρός Βιοπαθολόγος, Διευθύντρια Εργαστηρίου Ιατρικής Βιοπαθολογίας Τ.Υ.Π.Α.Τ.Ε.

**Πέτροβα Αγγελική** Ιατρός Μικροβιολόγος, Εκπαιδευτικός Π.Ε. 14

**Κεφαλάκης Αλέξανδρος** Τεχνολόγος Ιατρικών Εργαστηρίων

### ΣΥΝΤΟΝΙΣΤΗΣ

**Ρίζου Ευαγγελία** Ιατρός Μικροβιολόγος, Εκπαιδευτικός Π.Ε. 14

### ΓΛΩΣΣΙΚΗ ΕΠΙΜΕΛΕΙΑ

**Μπατσολάκη Στεφανία** Φιλολόγος Εκπαιδευτικός Π.Ε. 02, Μεταπτυχιακό κλασικής φιλολογίας

### ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ

**Μουρτζίνη Μαρία Σοφία**

### ΠΑΙΔΑΓΩΓΙΚΟ ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ

Υπεύθυνη του τομέα «Υγείας και Πρόνοιας»

**Ματίνα Στάππα**, Οδοντίατρος

Πάρεδρος Ε.Θ. του Παιδαγωγικού Ινστιτούτου



<b>ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ</b>	<b>7</b>
<b>ΠΡΟΛΟΓΟΣ</b>	<b>13</b>
<b>ΜΕΡΟΣ ΠΡΩΤΟ ΒΑΚΤΗΡΙΑ</b>	
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1<sup>ο</sup> ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΗ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΧΛΩΡΙΔΑ</b>	<b>16</b>
1.1. Γενικά	16
1.2. Φυσιολογική μικροβιακή χλωρίδα του σώματος	16
1.3. Φυσιολογική μικροβιακή χλωρίδα δέρματος, ματιών και αυτιών	18
1.4. Φυσιολογική μικροβιακή χλωρίδα της αναπνευστικής οδού	18
1.5. Φυσιολογική μικροβιακή χλωρίδα του γαστρεντερικού συστήματος	19
1.6. Φυσιολογική μικροβιακή χλωρίδα του ουρογεννητικού συστήματος	19
ΑΝΑΚΕΦΑΛΑΙΩΣΗ	21
ΕΡΩΤΗΣΕΙΣ	21
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2<sup>ο</sup> STAPHYLOCOCCUS (ΣΤΑΦΥΛΟΚΟΚΚΟΙ)</b>	<b>22</b>
2.1. Γενικά - είδη	22
2.2. <i>Staphylococcus aureus</i> (Σταφυλόκοκκος χρυσίζων)	22
2.3. <i>Staphylococcus epidermidis</i> (Σταφυλόκοκκος επιδερμικός)	25
ΑΝΑΚΕΦΑΛΑΙΩΣΗ	27
ΕΡΩΤΗΣΕΙΣ	27
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3<sup>ο</sup> STREPTOCOCCUS (ΣΤΡΕΠΤΟΚΟΚΚΟΙ)</b>	<b>28</b>
3.1. Γενικά - είδη	28
3.2. <i>Streptococcus pyogenes</i> (β-αιμολυτικός Στρεπτόκοκκος Α ομάδας)	29
3.3. <i>Streptococcus pneumoniae</i> (Πνευμονιόκοκκος)	32
3.4. <i>Enterococcus</i> (Εντερόκοκκοι)	34
ΑΝΑΚΕΦΑΛΑΙΩΣΗ	37
ΕΡΩΤΗΣΕΙΣ	37
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4<sup>ο</sup> NEISSERIA (ΝΑΪΣΣΕΡΙΕΣ)</b>	<b>38</b>
4.1. Γενικά - είδη	38
4.2. <i>Neisseria meningitidis</i> (Μηνιγγιτιδόκοκκος)	38
4.3. <i>Neisseria gonorrhoeae</i> (Γονόκοκκος)	41
ΑΝΑΚΕΦΑΛΑΙΩΣΗ	44
ΕΡΩΤΗΣΕΙΣ	44
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5<sup>ο</sup> ENTEROBACTERIACEAE (ΕΝΤΕΡΟΒΑΚΤΗΡΙΑΚΑ)</b>	<b>45</b>
5.1. Γενικά - είδη	45
5.2. <i>Escherichia coli</i> (Κολοβακτηρίδιο)	47



5.3. <i>Shigella</i> (Σιγκέλλες)	49
5.4. <i>Salmonella</i> (Σαλμονέλλες)	51
5.5. <i>Klebsiella pneumoniae</i> (Κλεμπσιέλλα της πνευμονίας)	54
5.6. <i>Proteus</i> (Πρωτεΐς)	56
ΑΝΑΚΕΦΑΛΑΙΩΣΗ	59
ΕΡΩΤΗΣΕΙΣ	
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6° MYCOBACTERIA (ΜΥΚΟΒΑΚΤΗΡΙΔΙΑ)</b>	<b>61</b>
6.1. Γενικά- Είδη	61
6.2. <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (Μυκοβακτηρίδιο της φυματίωσης)	61
6.3. <i>Mycobacterium leprae</i> ( Μυκοβακτηρίδιο της λέπρας)	65
ΑΝΑΚΕΦΑΛΑΙΩΣΗ	67
ΕΡΩΤΗΣΕΙΣ	68
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7° CORYNEBACTERIAE (ΚΟΡΥΝΟΒΑΚΤΗΡΙΔΙΑ)</b>	<b>69</b>
7.1. Γενικά - είδη	69
7.2. <i>Corynebacterium diphtheriae</i> (Κορυνοβακτηρίδιο της διφθερίτιδας)	69
ΑΝΑΚΕΦΑΛΑΙΩΣΗ	72
ΕΡΩΤΗΣΕΙΣ	72
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8° PSEUDOMONAS (ΨΕΥΔΟΜΟΝΑΔΕΣ)</b>	<b>73</b>
8.1. Γενικά - είδη	73
8.2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Ψευδομονάδα η πυοκυανική)	73
ΑΝΑΚΕΦΑΛΑΙΩΣΗ	76
ΕΡΩΤΗΣΕΙΣ	76
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9° TREPONEMA (ΣΠΕΙΡΟΧΑΠΤΣ)</b>	<b>77</b>
9.1. Γενικά - είδη	77
9.2. <i>Treponema pallidum</i> (ωχρή Σπειροχαΐτη)	77
ΑΝΑΚΕΦΑΛΑΙΩΣΗ	80
ΕΡΩΤΗΣΕΙΣ	80
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 10° HAEMOPHILUS (ΑΙΜΟΦΙΛΟΙ)</b>	<b>81</b>
10.1. Γενικά - είδη	81
10.2. <i>Haemophilus influenzae</i> (Αιμόφιλος της γρίπης)	81
ΑΝΑΚΕΦΑΛΑΙΩΣΗ	85
ΕΡΩΤΗΣΕΙΣ	86
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 11° BORDETELLA (ΜΠΟΡΝΤΕΤΕΛΛΕΣ)</b>	<b>87</b>
11.1. Γενικά - είδη	87
11.2. <i>Bordetella pertussis</i> (Μπορντετέλλα του κοκκύτη)	87



ΑΝΑΚΕΦΑΛΑΙΩΣΗ.....	90
ΕΡΩΤΗΣΕΙΣ.....	90
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 12° BRUCELLA (ΒΡΟΥΚΕΛΛΕΣ)</b> .....	<b>91</b>
12.1. Γενικά-είδη.....	91
12.2. <i>Brucella melitensis-Brucella abortus-Brucella suis</i> .....	91
ΑΝΑΚΕΦΑΛΑΙΩΣΗ.....	95
ΕΡΩΤΗΣΕΙΣ.....	96
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 13° CLOSTRIDIUM (ΚΛΩΣΤΗΡΙΔΙΑ)</b> .....	<b>97</b>
13.1. Γενικά - είδη.....	97
13.2. <i>Clostridium tetani</i> (Κλωστηρίδιο του τετάνου).....	97
13.3. <i>Clostridium perfringens</i> (Κλωστηρίδιο το διαθλαστικό).....	99
ΑΝΑΚΕΦΑΛΑΙΩΣΗ.....	103
ΕΡΩΤΗΣΕΙΣ.....	104
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 14° VIBRIO (ΔΟΝΑΚΙΑ)</b> .....	<b>105</b>
14.1. Γενικά - είδη.....	105
14.2. <i>Vibrio cholerae</i> (Δονάκιο της χολέρας).....	105
ΑΝΑΚΕΦΑΛΑΙΩΣΗ.....	108
ΕΡΩΤΗΣΕΙΣ.....	108
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 15° MYCOPLASMA (ΜΥΚΟΠΛΑΣΜΑΤΑ)</b> .....	<b>109</b>
15.1. Γενικά - είδη.....	109
15.2. <i>Mycoplasma pneumoniae</i> (Μυκόπλασμα της πνευμονίας).....	109
15.3. <i>Mycoplasma hominis</i> .....	112
15.4. <i>Ureaplasma urealyticum</i> .....	113
ΑΝΑΚΕΦΑΛΑΙΩΣΗ.....	116
ΕΡΩΤΗΣΕΙΣ.....	116
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 16° CHLAMYDIA (ΧΛΑΜΥΔΙΑ)</b> .....	<b>117</b>
16.1. Γενικά - είδη.....	117
16.2. <i>Chlamydia trachomatis</i> (Χλαμύδιο του τραχώματος).....	117
ΑΝΑΚΕΦΑΛΑΙΩΣΗ.....	120
ΕΡΩΤΗΣΕΙΣ.....	120
<b>ΜΕΡΟΣ ΔΕΥΤΕΡΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ</b>	
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1° ΤΡΟΠΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ ΥΓΡΩΝ ΚΑΙ ΕΚΚΡΙΜΑΤΩΝ</b> .....	<b>122</b>
1.1. Γενικά.....	122
1.2. Μελέτη υγρών και εκκρινμάτων.....	123

<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2°</b>	<b>ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΠΥΟΥ ΡΙΝΟΦΑΡΥΓΓΙΚΟΥ ΕΚΚΡΙΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΠΤΥΕΛΩΝ</b>	<b>131</b>
2.1.	Καλλιέργεια πύου	131
2.2.	Καλλιέργεια ρινοφαρυγγικού εκκρίματος	134
2.3.	Καλλιέργεια πτυέλων	136
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3°</b>	<b>ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΚΟΛΠΙΚΟΥ ΚΑΙ ΟΥΡΗΘΡΙΚΟΥ ΕΚΚΡΙΜΑΤΟΣ</b>	<b>140</b>
3.1.	Καλλιέργεια κολπικού εκκρίματος	140
3.2.	Καλλιέργεια ουρηθρικού εκκρίματος	143
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4°</b>	<b>ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΩΤΙΚΟΥ ΚΑΙ ΟΦΘΑΛΜΙΚΟΥ ΕΚΚΡΙΜΑΤΟΣ</b>	<b>146</b>
4.1.	Καλλιέργεια ωτικού εκκρίματος	146
4.2.	Καλλιέργεια οφθαλμικού εκκρίματος	147
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5°</b>	<b>ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΟΥΡΩΝ</b>	<b>150</b>
5.1.	Γενικά	150
5.2.	Καλλιέργεια ούρων	
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6°</b>	<b>ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΑΙΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ENY</b>	<b>156</b>
6.1.	Καλλιέργεια αίματος	156
6.2.	Καλλιέργεια εγκεφαλονωτιαίου υγρού (ENY)	161
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7°</b>	<b>ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΠΕΡΙΤΟΝΑΪΚΟΥ ΚΑΙ ΠΛΕΥΡΙΤΙΚΟΥ ΥΓΡΟΥ</b>	<b>164</b>
7.1.	Καλλιέργεια περιτοναϊκού υγρού	164
7.2.	Καλλιέργεια πλευριτικού υγρού	166
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8°</b>	<b>ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΥΛΙΚΟΥ ΔΕΡΜΑΤΙΚΩΝ ΒΛΑΒΩΝ</b>	<b>169</b>
8.1.	Γενικά για την καλλιέργεια υλικού δερματικών βλαβών	169
8.2.	Μυκητολογική εξέταση δερματικών βλαβών (τριχών, ξεσμάτων από λέπια και νύχια)	169
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9°</b>	<b>ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΚΑΙ ΠΑΡΑΣΠΟΛΟΓΙΚΗ ΕΞΕΤΑΣΗ ΚΟΠΡΑΝΩΝ</b>	<b>173</b>
9.1.	Καλλιέργεια κοπράνων	173
9.2.	Παρασιτολογική εξέταση κοπράνων	176
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 10°</b>	<b>ΜΕΤΡΑ ΠΡΟΣΤΑΣΙΑΣ ΣΤΟ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ</b>	<b>182</b>
10.1.	Γενικά	182

10.2. Ομάδες επικινδυνότητας .....	186
10.3. Τύποι μικροβιολογικών εργαστηρίων .....	187

## ΜΕΡΟΣ ΤΡΙΤΟ ΜΕΘΟΔΟΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ

<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1<sup>ο</sup> ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΔΟΚΙΜΑΣΙΕΣ</b> .....	<b>190</b>
1.1. Δοκιμασία καταλάσης .....	190
1.2. Δοκιμασία παραγωγής κοαγκουλάσης (πηκτάσης) .....	190
1.3. Δοκιμασία παραγωγής δεοξυριβονουκλεάσης .....	192
1.4. Δοκιμασία ευαισθησίας στη βακιτρασίνη .....	193
1.5. Δοκιμασία ευαισθησίας στην οπτοχίνη .....	194
1.6. Δοκιμασία χολής .....	195
1.7. Υδρόλυση της εσουλίνης σε υλικό με χολή .....	196
1.8. Δοκιμασία οξειδάσης .....	197
1.9. Δοκιμασία αναγωγής των νιτρικών αλάτων σε νιτρώδη .....	197
1.10. Δοκιμασία παραγωγής ινδόλης .....	198
1.11. Δοκιμασία ερυθρού του μεθυλίου (Methyl Red) .....	199
1.12. Δοκιμασία παραγωγής ακετυλομεθυλοκαρβινόλης (Voges-Proskauer) .....	200
1.13. Δοκιμασία των κιτρικών (Citrate) .....	201
1.14. Δοκιμασία παραγωγής υδρόθειου (H <sub>2</sub> S) .....	202
1.15. Δοκιμασία καταβολισμού των αμινοξέων ορνιθίνης, λυσίνης και αργινίνης .....	204
1.16. Δοκιμασία παραγωγής ουρεάσης .....	205
1.17. Δοκιμασία απαμίνωσης της φαινυλαανίνης (PPA) .....	206
1.18. Δοκιμασία ρευστοποίησης της πηκτής .....	207
1.19. Δοκιμασία ελέγχου κινητικότητας .....	208
1.20. Δοκιμασία διάσπασης των σακχάρων .....	209
1.21. Ταυτοποίηση βακτηρίων με API 20 E .....	210
1.22. Δοκιμή εξάρτησης από τους X και V παράγοντες ( <i>Haemophilus influenzae</i> ) .....	214
1.23. Δοκιμασία εξοιδίσεως του ελύτρου .....	214
<b>ΓΛΩΣΣΑΡΙ</b> .....	<b>217</b>
<b>ΠΑΡΑΠΟΜΠΗ ΕΙΚΟΝΩΝ - ΠΙΝΑΚΩΝ - ΣΧΗΜΑΤΩΝ</b> .....	<b>220</b>
<b>ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ</b> .....	<b>223</b>
<b>ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ</b> .....	<b>225</b>
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b> .....	<b>226</b>



## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Το βιβλίο αυτό γράφτηκε για τους μαθητές του Β΄ κύκλου του Τμήματος Ιατρικών και Βιολογικών Εργαστηρίων του Τομέα Υγείας και Πρόνοιας των Τ.Ε.Ε.

Ακολουθώντας το αναλυτικό πρόγραμμα του Παιδαγωγικού Ινστιτούτου, στο πρώτο μέρος του βιβλίου παραθέτουμε γενικές γνώσεις της Μικροβιολογίας και στο δεύτερο μέρος τις καλλιέργειες των διαφόρων υγρών και εκκριμάτων του σώματος του ανθρώπου. Παραθέτονται επίσης στο δεύτερο μέρος τα μέτρα που πρέπει να λαμβάνονται στο εργαστήριο για την προστασία των εργαζομένων και του περιβάλλοντος.

Θεωρήσαμε σκόπιμο να συμπεριλάβουμε σε ένα τρίτο μέρος κάποιες από τις βιοχημικές δοκιμασίες που απαιτούνται για την ταυτοποίηση των βακτηρίων με γνώμονα τη συχνότητα και τη δυνατότητα χρησιμοποίησής τους στα εργαστήρια των Τ.Ε.Ε, ώστε να βοηθηθούν δάσκαλοι και μαθητές στο έργο τους.

Η συγγραφή επομένως του βιβλίου αυτού έχει ως σκοπό να γνωρίσουν οι μαθητές τη μορφολογία, τις βιοχημικές ιδιότητες, τον τρόπο με τον οποίο καλλιεργούνται τα βακτήρια, την παθογόνο δράση τους, την εργαστηριακή διάγνωση των ασθενειών που προκαλούν και την προφύλαξη από αυτές.

Ειδικά το δεύτερο μέρος έχει ως σκοπό να γνωρίσουν οι μαθητές τον τρόπο λήψης των διαφόρων δειγμάτων, να μάθουν να παρασκευάζουν και να χρωματίζουν τα κατάλληλα επιχρίσματα, να γνωρίσουν τις συνθήκες και τα κατάλληλα υλικά για κάθε καλλιέργεια, να εμπεδώσουν τις βιοχημικές ιδιότητες, την ταυτοποίηση των βακτηρίων και τον τρόπο ελέγχου της ευαισθησίας τους στα αντιβιοτικά.

Προσπαθήσαμε να δώσουμε με όσο το δυνατόν περισσότερη απλότητα και σαφήνεια τις δύσκολες έννοιες της Μικροβιολογίας. Προσπαθήσαμε ακόμη να προκαλέσουμε το ενδιαφέρον των παιδιών για το θαυμαστό κόσμο των βακτηρίων και να τους δώσουμε τα εφόδια, για να γίνουν υπεύθυνοι συνεργάτες και να μπορέσουν να νιώσουν την ικανοποίηση που νιώθει κανείς, όταν ανακαλύπτει το βακτήριο που κρύβεται πίσω από μια ασθένεια και βοηθάει έναν ασθενή να γίνει καλά.

Οι συγγραφείς θα δεχτούν ευχαρίστως παρατηρήσεις και υποδείξεις στο περιεχόμενο του βιβλίου.

Η συγγραφική ομάδα εκφράζει τις ευχαριστίες της προς τους κριτές για τις υποδείξεις και παρατηρήσεις τους, οι οποίες συνέβαλαν εποικοδομητικά στη συγγραφή του βιβλίου.

**Η ΣΥΓΓΡΑΦΙΚΗ ΟΜΑΔΑ**



ΒΑΚΤΗΡΙΑ

1

ΜΕΡΟΣ ΠΡΩΤΟ

ΒΑΚΤΗΡΙΑ

## 1.1. Γενικά

Φυσιολογική μικροβιακή χλωρίδα ονομάζουμε το σύνολο των βακτηρίων\* που, κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, καλύπτουν το δέρμα και τις επιφάνειες των βλεννογόνων των ανοικτών κοιλοτήτων ενός μεγαλοοργανισμού.

Η εγκατάσταση της φυσιολογικής χλωρίδας αρχίζει κατά τη διάρκεια του τοκετού και ολοκληρώνεται τη δωδέκατη ημέρα της ζωής του νεογνού.

## 1.2. Φυσιολογική μικροβιακή χλωρίδα του σώματος

Η κατανομή της φυσιολογικής χλωρίδας στις κοιλότητες και επιφάνειες του οργανισμού δε γίνεται τυχαία, αλλά είναι αυστηρά καθορισμένη. Οι διάφοροι μικροοργανισμοί παρουσιάζουν ιδιαίτερη προτίμηση (τροπισμό) προς ορισμένους ιστούς και περιοχές του σώματος. Αυτό πρέπει να λαμβάνεται υπόψη στην αξιολόγηση των μικροοργανισμών που απομονώνονται στις καλλιέργειες διαφόρων κλινικών υλικών.

Η φυσιολογική χλωρίδα που φιλοξενεί ο άνθρωπος-ξενιστής μπορεί να διακριθεί σε δύο κατηγορίες:

- Την **μόνιμη φυσιολογική χλωρίδα**, η οποία επικρατεί σε κάθε περιοχή και αποκαθίσταται με την ίδια πάντοτε σύνθεση, όταν διαταραχθεί.
- Την **παροδική φυσιολογική χλωρίδα**, η οποία αποικίζει παροδικά τον ξενιστή από ώρες έως εβδομάδες.

Ο αριθμός των βακτηρίων της φυσιολογικής χλωρίδας είναι τόσο μεγάλος, που υπερβαίνει κατά δέκα φορές τον αριθμό όλων των ευκαρυωτικών κυττάρων των ιστών του ανθρώπινου οργανισμού. Τα βακτήρια της φυσιολογικής χλωρίδας μπορούν εύκολα να αυξηθούν, αν δε λειτουργήσουν **οι ρυθμιστικοί μηχανισμοί**, από τους οποίους σπουδαιότεροι είναι:

- Η κινητικότητα του εντέρου.

*\*Βακτήριο και μικρόβιο είναι έννοιες ταυτόσημες. Στο βιβλίο αυτό χρησιμοποιούμε τον όρο βακτήριο.*



- Η παραγωγή σιέλου και οι κινήσεις κατάποσης.
- Η ροή των ούρων.
- Η παραγωγή γαλακτικού οξέος.

Τα βακτήρια της φυσιολογικής χλωρίδας σε ορισμένες περιπτώσεις μπορούν να λειτουργήσουν ως παθογόνα, όπως:

- ◆ Σε οργανισμούς με μειωμένο ανοσολογικό σύστημα μετά από θεραπείες με κάποια φάρμακα λόγω κάποιας σοβαρής ασθένειας (κακοήθειες, AIDS κ.ά.).
- ◆ Αν προκληθεί τοπικός τραυματισμός.
- ◆ Αν διαταραχθεί η οικολογική ισορροπία της φυσιολογικής χλωρίδας και επικρατήσουν παθογόνα μέλη της, μετά από χορήγηση μεγάλης ποσότητας αντιβιοτικών φαρμάκων.
- ◆ Αν μεταφερθούν σε περιοχή στην οποία δεν αποτελούν φυσιολογική χλωρίδα.

Οι σχέσεις των μικροοργανισμών της φυσιολογικής χλωρίδας με τον ξενιστή θα μπορούσαν να συνοψιστούν σε δύο κυρίως δραστηριότητες:

**1. Τη μεταβολική:** Οι μικροοργανισμοί της φυσιολογικής χλωρίδας έχουν ένα τεράστιο φάσμα μεταβολικών δραστηριοτήτων και με αυτήν την έννοια θα μπορούσαν να θεωρηθούν ως ένα «όργανο» του ανθρώπινου σώματος. Αναφέρεται χαρακτηριστικά ότι η μεταβολική δραστηριότητα της χλωρίδας του εντέρου είναι ίση με εκείνη του ήπατος. Η φυσιολογική χλωρίδα συμμετέχει στο μεταβολισμό πολλών ουσιών που έρχονται σε επαφή με το δέρμα, εισπνέονται ή λαμβάνονται με τις τροφές. Λαμβάνει μέρος στη σύνθεση βιταμινών.

**2. Την παρεμπόδιση της εγκατάστασης παθογόνων βακτηρίων (αντίσταση αποικισμού):** Οι μικροοργανισμοί της φυσιολογικής χλωρίδας έχουν σπουδαιότατη σημασία στην προστασία του ξενιστή από την προσβολή άλλων μικροοργανισμών (εισβολέων) ικανών να προκαλέσουν νόσο. Η προστασία αυτή επιτυγχάνεται με τους εξής μηχανισμούς:

- Ανταγωνίζονται τους εισβολείς μικροοργανισμούς για την πρόσληψη των θρεπτικών ουσιών.
- Ανταγωνίζονται τους εισβολείς μικροοργανισμούς για την κατάληψη των ίδιων υποδοχέων στα κύτταρα του ξενιστή.

- Παράγουν Βακτηριοσίνες, ουσίες τοξικές για άλλα βακτήρια.
- Παράγουν πτητικά και λιπαρά οξέα και άλλους τοξικούς μεταβολίτες.
- Διεγείρουν το ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή.

### 1.3. Φυσιολογική μικροβιακή χλωρίδα δέρματος, ματιών και αυτιών

Τη φυσιολογική χλωρίδα του δέρματος αποτελούν:

- *Corynebacterium* (Κορυνοβακτηρίδια)
- *Micrococcus* (Μικρόκοκκοι)
- *Neisseria* (Ναϊσσέριες)
- *Staphylococcus aureus* (Σταφυλόκοκκος χρυσίζων)
- *Staphylococcus epidermidis* (Σταφυλόκοκκος επιδερμικός)
- *Streptococcus viridans* (Στρεπτόκοκκος πρασινίζων)

Ο επιπεφυκότας των ματιών φέρει ορισμένα βακτήρια του δέρματος. Ο μέσος και ο έσω ακουστικός πόρος, κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, είναι περιοχές στείρες από βακτήρια, ενώ ο έξω ακουστικός πόρος φέρει συνήθως την ίδια μικροβιακή χλωρίδα με το δέρμα.

### 1.4. Φυσιολογική μικροβιακή χλωρίδα της αναπνευστικής οδού

Οι περιοχές της αναπνευστικής οδού στις οποίες φυσιολογικά αναπτύσσονται βακτήρια είναι η μύτη, το στόμα και η φαρυγγική κοιλότητα. Τα βακτήρια αυτά είναι:

- *Enterococcus* (Εντερόκοκκοι)
- *Enterobacteriaceae* (Εντεροβακτηριακά, κυρίως *Escherichia coli*, *Klebsiella*)
- *Haemophilus* (Αιμόφιλοι, κυρίως *Haemophilus influenzae*)
- *Neisseria* (Ναϊσσέριες)
- *Staphylococcus aureus* (Σταφυλόκοκκος χρυσίζων)
- *Staphylococcus epidermidis* (Σταφυλόκοκκος επιδερμικός)
- *Streptococcus pneumoniae* (Πνευμονιόκοκκος)
- *Streptococcus viridans* (Στρεπτόκοκκος πρασινίζων)

Η χλωρίδα του ρινοφάρυγγα φθάνει το πολύ μέχρι το λάρυγγα. Από εκεί και κάτω υπάρχει μόνο παροδική διέλευση βακτηρίων.

Περιοχές της αναπνευστικής οδού που είναι στείρες από βακτήρια, κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, είναι ο λάρυγγας, η τραχεία, οι βρόγχοι, τα βρογχιόλια, οι κυψελίδες και οι παραρρινικοί κόλποι.

### 1.5. Φυσιολογική μικροβιακή χλωρίδα του γαστρεντερικού συστήματος

Ο οισοφάγος, το στομάχι και το άνω τμήμα του λεπτού εντέρου δεν έχουν χλωρίδα αλλά παροδική διέλευση βακτηρίων, που εισέρχονται με την τροφή και τις εκκρίσεις του ρινοφάρυγγα και του στόματος.

Χλωρίδα αναπτύσσεται στο κάτω μέρος του εντέρου και ιδιαίτερα στον ειλέο, η οποία είναι όμοια με τη χλωρίδα του παχέος εντέρου.

Το παχύ έντερο έχει την πλουσιότερη και αφθονότερη σε όγκο και μικροβιακά είδη χλωρίδα. Είναι επίσης η πιο μελετημένη χλωρίδα του ανθρώπινου σώματος. Το 90% τουλάχιστον των βακτηρίων είναι αναερόβια. Το υπόλοιπο 10% αποτελείται από αερόβια ή προαιρετικά αναερόβια μεταξύ των οποίων επικρατεί η *Escherichia coli* και ακολουθούν οι Εντερόκοκκοι, οι Μύκητες και πολλά είδη Εντεροβακτηριακών. Υπολογίζεται ότι στα κόπρανα του ενήλικα το 25% του ξηρού βάρους τους οφείλεται στα βακτήρια της φυσιολογικής χλωρίδας του εντέρου, την οποία αποτελούν:

- *Enterococcus* (Εντερόκοκκοι)
- *Enterobacteriaceae* (Εντεροβακτηριακά, κυρίως *Escherichia coli*, *Klebsiella*)
- *Pseudomonas aeruginosa* (Ψευδομονάδα πυοκυανική ή αεριογόνος)
- *Staphylococcus aureus* (Σταφυλόκοκκος χρυσίζων)
- *Clostridium* (Κλωστρίδια)
- Μύκητες

### 1.6. Φυσιολογική μικροβιακή χλωρίδα του ουρογεννητικού συστήματος

Οι περιοχές του ουρογεννητικού συστήματος που φυσιολογικά αποικίζονται με βακτήρια είναι τα εξωτερικά γεννητικά όργανα, η πρόσθια ουρήθρα και ο κόλπος. Όλες οι άλλες περιοχές του ουρογεννητικού συστήματος είναι, κάτω από φυσιολογικές συνθήκες,

στείρες βακτηρίων. Τη φυσιολογική χλωρίδα αποτελούν:

- *Enterococcus* (Εντερόκοκκοι)
- *Enterobacteriaceae* (Εντεροβακτηριακά, κυρίως *Escherichia coli*, *Klebsiella*)
- *Staphylococcus aureus* (Σταφυλόκοκκος χρυσίζων)
- *Staphylococcus epidermidis* (Σταφυλόκοκκος επιδερμικός)
- *Neisseria* (Ναϊσσέριες)
- *Mycoplasma* (Μυκοπλάσματα)
- *Clostridium* (Κλωστηρίδια)

Την πλουσιότερη χλωρίδα στην περιοχή αυτήν την έχει ο γυναικείος κόλπος. Πριν την ήβη και μετά την εμμηνόπαυση η χλωρίδα αποτελείται από τα βακτήρια του δέρματος, του εντέρου και του περινέου. Κατά την αναπαραγωγική ηλικία αποτελείται κυρίως από αναερόβια βακτήρια, μικροαερόφιλους Γαλακτοβάκιλλους και βακτηρίδια που μπορούν να επιζήσουν στο όξινο περιβάλλον (pH 4-5) του κόλπου, το οποίο δημιουργούν οι Γαλακτοβάκιλλοι από τη διάσπαση του γλυκόγόνου σε γαλακτικό οξύ με την επίδραση των οιστρογόνων ορμονών.

Χλωρίδα δεν έχουν οι κλειστές περιοχές του σώματος και τα εντός αυτών υγρά, όπως το αίμα, το εγκεφαλονωτιαίο υγρό, η ουροδόχος κύστη, η μήτρα και οι σάλπιγγες, οι παραρρινικοί κόλποι, το μέσο αυτί, ο περικαρδιακός και ο πλευριτικός χώρος. Στον υγιή περιτοναϊκό χώρο είναι δυνατόν να υπάρξουν παροδικά βακτήρια από το παχύ έντερο.

Αν και ο κίνδυνος ανάπτυξης φλεγμονής και λοίμωξης από τα βακτήρια της φυσιολογικής χλωρίδας είναι πιθανός, η παρουσία τους είναι φαινόμενο βιολογικά αναπόφευκτο. Τα οικοσυστήματα των βακτηρίων δημιουργούνται σε όλους τους οργανισμούς, φυτικούς και ζωικούς, από τους πιο απλούς (πρωτόζωα) μέχρι τους πιο πολύπλοκους (άνθρωπο). Ακόμη και τα ίδια τα βακτήρια αποικίζονται από μικρότερα όντα, όπως είναι οι βακτηριοφάγοι. Κανένα ον δε ζει μόνο του.

## Ανακεφαλαίωση

Φυσιολογική μικροβιακή χλωρίδα ονομάζεται το σύνολο των βακτηρίων που, κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, αποικίζουν το δέρμα και όλες τις επιφάνειες των βλεννογόνων των ανοικτών κοιλοτήτων ενός μεγαλοοργανισμού.

Η φυσιολογική χλωρίδα που φιλοξενεί ο άνθρωπος διακρίνεται σε μόνιμη και παροδική. Στον οργανισμό μας υπάρχουν και λειτουργούν ρυθμιστικοί μηχανισμοί, ώστε να μην αναπτύσσονται ανεξέλεγκτα τα βακτήρια της μικροβιακής χλωρίδας και προκαλούν ασθένειες. Τέτοιοι μηχανισμοί είναι η κινητικότητα του εντέρου, η παραγωγή σιέλου, η ροή των ούρων κ.ά.

Τα βακτήρια της φυσιολογικής χλωρίδας μπορούν να μετατραπούν σε παθογόνα, αν η ανοσολογική άμυνα του οργανισμού είναι μειωμένη ή αν μεταφερθούν σε άλλη περιοχή στην οποία δεν αποτελούν φυσιολογική χλωρίδα.

Οι σχέσεις των μικροοργανισμών της φυσιολογικής χλωρίδας με τον ξενιστή συνοψίζονται σε δύο κυρίως δραστηριότητες: τη μεταβολική και την παρεμπόδιση της εγκατάστασης παθογόνων βακτηρίων.

Φυσιολογική χλωρίδα διαθέτουν: το δέρμα, τα μάτια, ο έξω ακουστικός πόρος, η μύτη, το στόμα, η φαρυγγική κοιλότητα, ο ειλεός, το παχύ έντερο, ο γυναικείος κόλπος, τα εξωτερικά γεννητικά όργανα και η πρόσθια ουρήθρα.

## Ερωτήσεις

1. Τι ονομάζουμε φυσιολογική μικροβιακή χλωρίδα και σε ποιές κατηγορίες διακρίνεται;
2. Ποιος είναι ο ρόλος της λειτουργίας των ρυθμιστικών παραγόντων στον οργανισμό;
3. Πότε τα βακτήρια της φυσιολογικής χλωρίδας μπορούν να μετατραπούν σε παθογόνα;
4. Ποιες είναι οι σχέσεις των μικροοργανισμών της φυσιολογικής χλωρίδας με τον ξενιστή;
5. Ποιες περιοχές του σώματος έχουν φυσιολογική μικροβιακή χλωρίδα και ποιές είναι στείρες βακτηρίων;
6. Τι γνωρίζετε για τη μικροβιακή χλωρίδα του ουρογεννητικού συστήματος;

## 2.1. Γενικά - είδη

Στο γένος *Staphylococcus* περιλαμβάνονται πολλά είδη. Είναι Gram θετικοί κόκκοι, αερόβιοι, άσποροι και ακίνητοι. Υπάρχουν στη φυσιολογική χλωρίδα πολλών περιοχών του σώματος.

Στο κεφάλαιο αυτό θα αναπτύξουμε τις ιδιότητες των *Staphylococcus aureus* και *Staphylococcus epidermidis*.

## 2.2. *Staphylococcus aureus* (Σταφυλόκοκκος χρυσίζων)

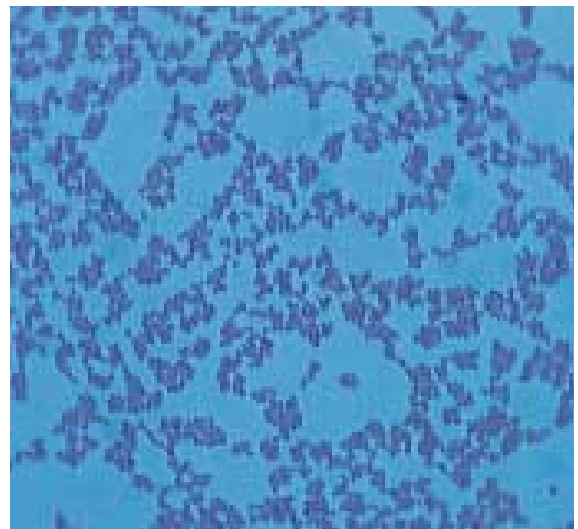
### I. ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ - ΧΡΩΣΗ

Ο *S.aureus* είναι Gram θετικός κόκκος, που διατάσσεται σε σταφυλοειδείς σχηματισμούς, σε τετράδες ή άτακτα. Είναι κόκκος ακίνητος, άσπορος, αερόβιος και χωρίς έλυτρο.

### II. ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ

Η καλλιέργειά του γίνεται σε κοινά, εμπλουτισμένα και εκλεκτικά θρεπτικά υλικά, κάτω από αερόβιες και προαιρετικά αναερόβιες συνθήκες, για 24 ώρες, με άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης τους 37°C. Στο αιματούχο άγαρ οι αποικίες περιβάλλονται από ζώνη αιμόλυσης.

Στο εκλεκτικό του θρεπτικό υλικό, το Charman άγαρ (περιέχει 7,5% NaCl), δίνει αποικίες μικρές, συμπαγείς και φουσκωτές, κίτρινες λόγω της ζύμωσης της μαννιτόλης. Εμφανίζει χρυσίζουσα χρωστική στα στερεά θρεπτικά υλικά, η οποία γίνεται εντονότερη, όταν το 24ωρο καλλιέργημα παραμένει σε θερμοκρασία δωματίου.



Εικ.2.1: *Staphylococcus aureus*

### III. ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ

Ο *S.aureus* παράγει:

- Το ένζυμο καταλάση, που διασπά το υπεροξείδιο του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ) σε νερό και οξυγόνο. Η καταλάση παράγεται από όλα τα είδη των Σταφυλόκοκκων και είναι βασικό διαχωριστικό χαρακτηριστικό τους από τους Στρεπτόκοκκους, που αντίθετα δεν την παράγουν.
- Το ένζυμο κοαγκουλάση ή πηκτάση, που είναι δύο ειδών, η εξωκυττάρια ή ελεύθερη και η συνδεδεμένη, προσκολλημένη στο κυτταρικό τοίχωμα. Η παραγωγή κοαγκουλάσης είναι η βασική διαχωριστική ιδιότητα του *S.aureus* από την ομάδα των κοαγκουλάση αρνητικών Σταφυλόκοκκων (CNS).
- Μια θερμοανθεκτική δεοξυριβονουκλεάση (Dnase). Η ιδιότητα αυτή είναι χαρακτηριστική του *S.aureus*, όπως και η παραγωγή κοαγκουλάσης.
- Διασπά τη γλυκόζη και τη μαννιτόλη κάτω από αερόβιες και αναερόβιες συνθήκες.

	Παραγωγή		Διάσπαση Γλυκόζης-Μαννιτόλης		
	Καταλάση	Κοαγκουλάση	Dnase	Αερόβια	Αναερόβια
<i>S.aureus</i>	+	+	+	+	+

Πίνακας 2.1: Βιοχημικές ιδιότητες του *S. aureus*

### IV. ΑΝΤΙΓΟΝΙΚΗ ΣΥΣΤΑΣΗ - ΤΟΞΙΚΕΣ ΟΥΣΙΕΣ

Ο *S.aureus* παράγει πολλές τοξικές ουσίες, παθογόνες για τον άνθρωπο. Οι σπουδαιότερες από αυτές είναι οι εξής:

- Αιμολυσίνες: Έχουν διαχωρισθεί τέσσερις αιμολυσίνες, οι α,β,γ και δ. Η καθεμιά από αυτές προκαλεί λύση των ερυθρών αιμοσφαιρίων του ανθρώπου και διαφόρων ζώων.
- Λευκοκτονίνες: Είναι ουσίες που καταστρέφουν τα λευκά αιμοσφαίρια.
- Εντεροτοξίνες: Όταν ο *S.aureus* αναπτυχθεί σε ορισμένα τρόφιμα και κάτω από κατάλληλες συνθήκες, παράγει εντερο-



τοξίνες (γαλακτοκομικά προϊόντα εκτός ψυγείου, κρέας κ.ά.), οι οποίες προκαλούν τροφικές δηλητηριάσεις. Έχουν διαχωριστεί πέντε εντεροτοξίνες με βάση τις αντιγονικές τους διαφορές, οι A, B, C, D, και E. Οι εντεροτοξίνες δε χάνουν την τοξική τους δράση στους 100° C για 30 min και δείχνουν αντοχή στα οξέα και στα πρωτεολυτικά ένζυμα.

- Υαλουρονιδάση: Είναι ένζυμο που διασπά το υαλουρονικό οξύ του διάμεσου συνδετικού ιστού και με αυτόν τον τρόπο ευνοεί την επέκταση της λοίμωξης. Παράγεται από το 90% των στελεχών του *S. aureus*.
- Επιδερμολυτική τοξίνη: Πρόκειται για πρωτεΐνη που παράγεται από ορισμένα στελέχη του *S. aureus* και προκαλεί νέκρωση και απόπτωση της επιδερμίδας των νεογνών (επιδερμολυτική νέκρωση).

#### V. ΠΑΘΟΓΟΝΟΣ ΔΡΑΣΗ

Ο *S. aureus* είναι παθογόνο βακτήριο που προσβάλλει όλα τα όργανα και όλους τους ιστούς. Ο αντιπροσωπευτικός τύπος της σταφυλοκοκκικής νόσου είναι η πυώδης φλεγμονή. Πυώδεις, φλεγμονώδεις σταφυλοκοκκικές νόσοι είναι οι δερματικές σταφυλοκοκκιάσεις (δοθιήνας, ακμή, διαπυήσεις τραυμάτων κ.ά.). Είναι δυνατόν επίσης να προκαλέσει αποστήματα εσωτερικών οργάνων και εμπυήματα κοιλοτήτων.

Το βακτήριο μπορεί να μεταφερθεί αιματογενώς από κάποια σταφυλοκοκκική φλεγμονή σε απομακρυσμένα όργανα. Στην περίπτωση αυτήν αναπτύσσονται σοβαρές λοιμώξεις, όπως ενδοκαρδίτιδα (προσβολή των βαλβίδων της καρδιάς), οστεομυελίτιδα (ανάπτυξη οξείας πυώδους φλεγμονής στη μετάφυση των μακρών οστών). Προκαλεί επίσης πνευμονία, μηνιγγίτιδα, τροφικές δηλητηριάσεις κ.ά.

#### VI. ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ

Γίνεται με:

- Καλλιέργεια του δείγματος σε κατάλληλα θρεπτικά υλικά. Το δείγμα μπορεί να είναι πύο αποστήματος, υγρό από παρακέντηση κλειστής κοιλότητας π.χ. ΕΝΥ, περικαρδιακό και αρθρικό υγρό, επιχρίσματα βλεννογόνων, υλικό δερματικών ή τραυματικών βλα-



βών, πύελα, κόπρανα, ούρα, αίμα κ.ά.

- Μακροσκοπική εξέταση των αποικιών και χρώση κατά Gram ξηρών παρασκευασμάτων από τις αποικίες αυτές.
- Ταυτοποίηση του βακτηρίου με βιοχημικές δοκιμασίες (δοκιμασία παραγωγής κοαγκουλάσης, API Staph κ.ά.).
- Δοκιμή ευαισθησίας στα αντιβιοτικά (αντιβιογράμμα).

### 2.3 *Staphylococcus epidermidis* (Σταφυλόκοκκος επιδερμικός)

#### I. ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ - ΧΡΩΣΗ

Ο *S. epidermidis* είναι Gram θετικός κόκκος, άσπορος, αερόβιος, ακίνητος, με λεπτό έλυτρο, ο οποίος διατάσσεται σε σταφυλοειδείς σχηματισμούς ή άτακτα.

#### II. ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ

Αναπτύσσεται σε κοινά, εμπλουτισμένα και εκλεκτικά θρεπτικά υλικά, σε αερόβιες συνθήκες, με άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης τους 37°C. Στο αιματούχο άγαρ παράγει αποικίες λευκές, κυκλικές, με διαφορετικού βαθμού αιμόλυση. Μερικά στελέχη παράγουν μια βλενώδη ουσία (slime) και κάνουν γλοιώδεις αποικίες. Αναπτύσσεται, όπως και ο *S. aureus*, στο εκλεκτικό θρεπτικό υλικό Charman, αλλά οι αποικίες του είναι λευκές και όχι κίτρινες, επειδή δε διασπά τη μαννιτόλη.

#### III. ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ

Παράγει το ένζυμο καταλάση, όπως και οι άλλοι Σταφυλόκοκκοι. Δεν παράγει κοαγκουλάση ούτε θερμοανθεκτική δεοξυριβονουκλεάση και δε διασπά τη μαννιτόλη. Με τις ιδιότητες αυτές το διαχωρίζουμε από τον *S. aureus*.

#### IV. ΤΟΞΙΚΕΣ ΟΥΣΙΕΣ

Παράγει μια αιμολυσίνη που μοιάζει με τη δ-τοξίνη του *S. aureus* και ονομάζεται ε-τοξίνη.

#### V. ΠΑΘΟΓΟΝΟΣ ΔΡΑΣΗ

Η παθογόνος δράση του *S. epidermidis* οφείλεται στις δύο βασικές βιολογικές του ιδιότητες, την προσκολλητική ικανότητα και την

παραγωγή βλέννας (slime). Προσκολλάται στις επιφάνειες των πλαστικών καθετήρων (ενδαγγειακών) ή άλλων θεραπευτικών ενδοπροσθετικών συσκευών. Οι βλεννώδεις ουσίες που παράγει τον προστατεύουν από τη δράση των αντιβιοτικών. Προκαλεί:

- Μετεγχειρητικές λοιμώξεις (ενδοκαρδίτιδες σε ασθενείς με τεχνητές βαλβίδες, σηψαιμία σε ασθενείς με ενδαγγειακούς καθετήρες, ουρολοιμώξεις κ.ά).
- Μέση ωτίτιδα.
- Χρόνιες δερματοπάθειες.
- Τραυματικές λοιμώξεις.

#### VI. ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ

Γίνεται με:

- Καλλιέργεια σε κατάλληλα θρεπτικά υλικά. Το δείγμα μπορεί να είναι πύο, αίμα, ούρα, υγρά κατακλίσεων κ.ά.
- Μελέτη μακροσκοπική και χρώση κατά Gram ξηρών επιχρισμάτων των ύποπτων αποικιών.
- Ταυτοποίηση με βιοχημικές δοκιμασίες (δοκιμασία καταλάσης, δοκιμασία κοαγκουλάσης, δοκιμασία παραγωγής βλέννας (slime), API Staph )
- Δοκιμή ευαισθησίας στα αντιβιοτικά (αντιβιογράμμα).
- Ανάλυση του DNA με PCR.

### Ανακεφαλαίωση

Οι Σταφυλόκοκκοι είναι Gram θετικοί κόκκοι, που διατάσσονται σε σταφυλοειδείς σχηματισμούς, σε τετράδες ή άτακτα.

Ο *S. aureus* καλλιεργείται σε κοινά, εμπλουτισμένα και εκλεκτικά θρεπτικά υλικά. Οι αποικίες του εμφανίζουν χρυσίζουσα χρωστική στα στερεά θρεπτικά υλικά, γι' αυτό ονομάζεται Σταφυλόκοκκος χρυσίζων.

Παράγει το ένζυμο καταλάση που τον διαχωρίζει από τους Στρεπτόκοκκους, οι οποίοι αντίθετα δεν το παράγουν. Από τον *S.epidermidis* διαχωρίζεται κυρίως από την παραγωγή του ενζύμου κοαγκουλάση και μιας θερμοανθεκτικής δεοξυριβονουκλεάσης.

Παράγει αιμολυσίνες, λευκοκτονίνες, επιδερμολυτική τοξίνη, εντεροτοξίνες και άλλες ουσίες που συμβάλλουν στην παθογόνο δράση του.

Προκαλεί πυώδεις φλεγμονές και, αν μεταφερθεί με το αίμα σε απομακρυσμένα όργανα, μπορεί να προκαλέσει σοβαρές λοιμώξεις.

Ο *S. epidermidis* οφείλει την παθογόνο δράση του στις δύο βασικές βιολογικές ιδιότητές του, την προσκολλητική ικανότητα και την παραγωγή βλέννας.

Προδιαθεσικοί παράγοντες για πολλές ασθένειες είναι η ανοσοκαταστολή και οι προσθετικές χειρουργικές επεμβάσεις.

### Ερωτήσεις

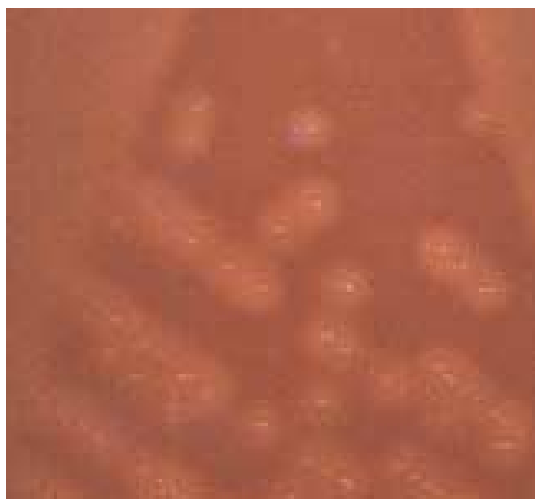
1. Ποια είναι η μικροσκοπική εικόνα του *S. aureus*;
2. Ποια είναι η μακροσκοπική εικόνα του *S. aureus* στο αιματούχο και το Charman άγαρ;
3. Ποιες είναι οι βιοχημικές ιδιότητες του *S. aureus*;
4. Ποια είναι η παθογόνος δράση του *S. aureus*;
5. Σε ποια δείγματα απομονώνουμε συνήθως το *S. aureus* και πώς γίνεται η εργαστηριακή διάγνωση;
6. Τι γνωρίζετε για την παθογόνο δράση του *S. epidermidis*;
7. Ποια είναι η μακροσκοπική εικόνα των αποικιών του *S. epidermidis* στο αιματούχο και στο Charman άγαρ;

### 3.1. Γενικά - είδη

Στο γένος *Streptococcus* ανήκουν 29 είδη με τα εξής κοινά χαρακτηριστικά: Gram θετικοί κόκκοι, σφαιρικοί ή ωοειδείς, που διατάσσονται κατά ζεύγη ή σχηματίζουν αλυσίδες. Συνήθως είναι ακίνητοι, άσποροι, μερικοί αυστηρά αναερόβιοι, μερικοί απαιτούν ατμόσφαιρα CO<sub>2</sub> και οι περισσότεροι εκλεκτικά αναερόβιοι. Δεν παράγουν το ένζυμο καταλάση. Πολλά είδη ανήκουν στη φυσιολογική χλωρίδα του ανθρώπου, αλλά αρκετά από αυτά είναι σαφώς παθογόνα.

Με βάση το είδος της αιμόλυσης που προκαλούν οι Στρεπτόκοκκοι, όταν αναπτυχθούν σε αιματούχο άγαρ, διαχωρίζονται σε:

1. β-αιμολυτικούς (πλήρης αιμόλυση, δηλαδή πλήρης λύση ερυθρών αιμοσφαιρίων, με αποτέλεσμα τη δημιουργία διαυγούς ζώνης γύρω από την αποικία).
2. α-αιμολυτικούς ή πρασινίζοντες (μερική αιμόλυση, με αποτέλεσμα τη δημιουργία πράσινης ζώνης γύρω από την αποικία).
3. γ-αιμολυτικούς ή μη-αιμολυτικούς (καμιά αιμόλυση)



Εικόνα 3.1: Αιμόλυση

Στο γένος *Streptococcus* τα είδη που έχουν σχέση με τον άνθρωπο χωρίζονται σε πέντε ομάδες:

1. Πυογόνοι Στρεπτόκοκκοι
2. Στρεπτόκοκκος του στόματος
3. Γαλακτικοί Στρεπτόκοκκοι
4. Αναερόβιοι Στρεπτόκοκκοι
5. Άλλοι Στρεπτόκοκκοι

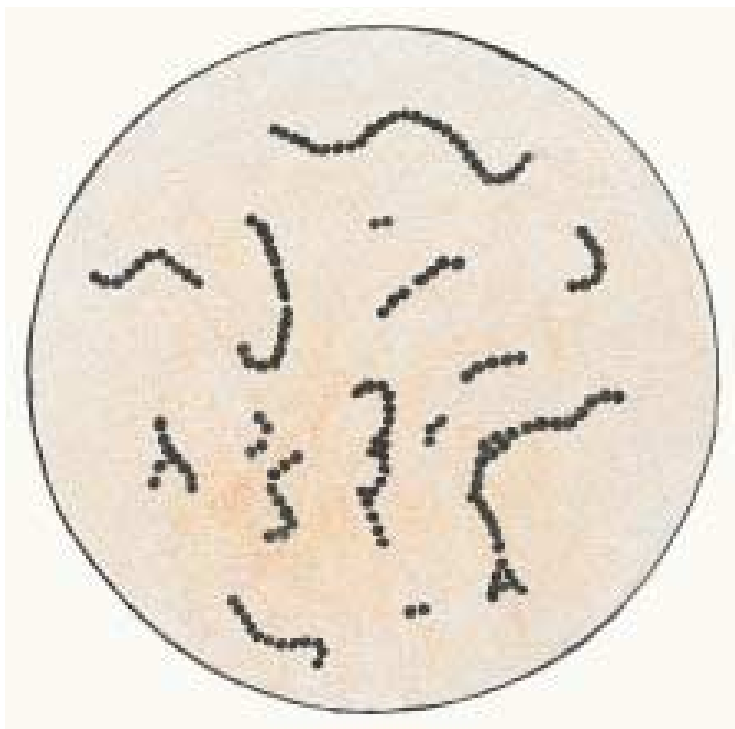
Οι Εντερόκοκκοι διαχωρίστηκαν από το γένος *Streptococcus* και αποτελούν ένα καινούργιο γένος με 13 είδη.

## Κεφάλαιο 3<sup>ο</sup> *Streptococcus* (Στρεπτόκοκκοι)

### 3.2. *Streptococcus pyogenes* (β-αιμολυτικός Στρεπτόκοκκος Α ομάδας)

#### I. ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ - ΧΡΩΣΗ

Ο *S. pyogenes* είναι Gram θετικός κόκκος, σφαιρικός, που τα κύτταρά του διατάσσονται το ένα κοντά στο άλλο και σχηματίζουν αλυσίδες (στρεπτούς). Έχει λεπτά ινίδια και λεπτό στρώμα υαλουρονικού οξέος.



Σχήμα 3.1: *Streptococcus pyogenes*

#### II. ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ

Η καλλιέργεια του *S. pyogenes* γίνεται σε εμπλουτισμένα θρεπτικά υλικά που περιέχουν αίμα. Αναπτύσσεται κάτω από αερόβιες και αναερόβιες συνθήκες με άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης τους 37° C.

Στο αιματούχο άγαρ δίνει αποικίες μικρές, μικρότερες των Σταφυλόκοκκων, άσπρες, οι οποίες περιβάλλονται από μια πλατιά και ίδιου μεγέθους ζώνη β-αιμόλυσης.

### III. ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ

Οι κυριότερες βιοχημικές ιδιότητες του *S. pyogenes* είναι:

- Δεν παράγει καταλάση. Με τη δοκιμασία αυτή διαχωρίζεται από τους Σταφυλόκοκκους.
- Η ανάπτυξή του αναστέλλεται από τη βακιτρασίνη. Γενικά γύρω από το δισκίο της βακιτρασίνης δεν αναπτύσσεται ο β-αιμολυτικός Στρεπτόκοκκος της ομάδας A (δες παρακάτω ομάδες). Αν έχουμε ανάπτυξη αποικιών, σημαίνει ότι είναι άλλο βακτήριο. Η μέθοδος της ευαισθησίας στη βακιτρασίνη, με δισκία που περιέχουν 0,04 μονάδες βακιτρασίνης, χρησιμοποιείται για να διαπιστωθεί γρήγορα και με μεγάλη ακρίβεια αν ένας β-αιμολυτικός Στρεπτόκοκκος ανήκει στην ομάδα A. Οι β-αιμολυτικοί Στρεπτόκοκκοι των άλλων ομάδων είναι ανθεκτικοί στη βακιτρασίνη.
- Δεν υδρολύει την εσκουλίνη και το ιππουρικό νάτριο.

	Παραγωγή	Δοκιμασία	Υδρόλυση	
<i>S.pyogenes</i>	Καταλάση -	Βακιτρασίνη +	Εσκουλίνη -	Ιππουρικό Na <sup>+</sup> -

Πίνακας 3.1: Βιοχημικές ιδιότητες του *S. pyogenes*

### IV. ΑΝΤΙΓΟΝΙΚΗ ΣΥΣΤΑΣΗ - ΤΟΞΙΚΕΣ ΟΥΣΙΕΣ

Ο *S. pyogenes* ανήκει στην κατηγορία των β-αιμολυτικών Στρεπτόκοκκων. Οι β-αιμολυτικοί Στρεπτόκοκκοι διαχωρίζονται σε 20 οροομάδες (A, B, C, D...), με βάση το σακχαριδικό αντιγόνο C, το οποίο βρίσκεται στο κυτταρικό τους τοίχωμα. Η κατάταξη αυτή των β-αιμολυτικών Στρεπτόκοκκων καλείται **ορολογική τυποποίηση κατά Lancefield**, από την επιστήμονα που πρώτη την εφάρμοσε. Ο *S. pyogenes* ανήκει στην A ομάδα κατά Lancefield (β-αιμολυτικός Στρεπτόκοκκος ομάδας A).

Η ομάδα A διακρίνεται σε περισσότερους από 70 **ορολογικούς τύπους**. Αυτοί καθορίζονται από την πρωτεΐνη M, που βρίσκεται στο κυτταρικό τοίχωμα μόνο των Στρεπτόκοκκων της ομάδας A.

## Κεφάλαιο 3<sup>ο</sup> *Streptococcus* (Στρεπτόκοκκοι)

Οι κυριότερες τοξίνες και ένζυμα που παράγει ο *S. pyogenes* είναι:

- Ερυθρογόνος τοξίνη: Είναι η τοξίνη που προκαλεί το εξάνθημα της οστρακιάς.
- Αιμολυσίνες: Οι αιμολυσίνες που παράγει το βακτήριο καλούνται στρεπτολυσίνες Ο και S. Τα αντισώματα που παράγονται από τη δράση της στρεπτολυσίνης Ο (ευαίσθητη στο O<sub>2</sub>) λέγονται αντιστρεπτολυσίνες Ο. Η ανίχνευσή τους στο αίμα χρησιμεύει για τη διάγνωση της στρεπτοκοκκικής λοίμωξης και την παρακολούθηση της προέιας της νόσου (τίτλος ASO).
- Ένζυμα: Υαλουρονιδάση, στρεπτοκινάση, δεοξυριβονουκλεάσες κ.ά.

### V. ΠΑΘΟΓΟΝΟΣ ΔΡΑΣΗ

Η στρεπτοκοκκική αμυγδαλίτιδα είναι η συχνότερη νόσος από το *S. pyogenes*. Πριν την εισαγωγή των αντιβιοτικών, η στρεπτοκοκκική αμυγδαλίτιδα είχε σοβαρές επιπλοκές, όπως περιαμυγδαλικό απόστημα, οστρακιά, μέση πυώδη ωτίτιδα, ενδοκαρδίτιδα, μαστοειδίτιδα, μηνιγγίτιδα.

Ο ρευματικός πυρετός και η οξεία σπειραματονεφρίτιδα είναι επίσης δύο πολύ σοβαρές μεταστρεπτοκοκκικές λοιμώξεις που εμφανίζονται 2-3 εβδομάδες μετά από την οξεία πυώδη αμυγδαλίτιδα.

Το βακτήριο μπορεί ακόμα να προκαλέσει επιλόχειο πυρετό μετά τον τοκετό. Σήμερα λόγω της εφαρμογής της αντισηψίας και της χρήσης των αντιβιοτικών, ο επιλόχειος πυρετός καθώς και η οστρακιά εμφανίζονται σπάνια.

### VI. ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ

Γίνεται με:

- Μικροσκοπική εξέταση του υλικού από τις βλάβες, μετά από χρώση κατά Gram των παρασκευασμάτων, για την αναζήτηση του *S. pyogenes*.
- Το ύποπτο υλικό, που είναι δυνατόν να είναι φλεγμονώδη υλικά, πύο, υγρά κλειστών κοιλοτήτων, φαρυγγικό επίχρισμα, εξιδρώματα κ.ά., καλλιεργείται σε αιματούχο άγαρ.
- Μακροσκοπική μελέτη αποικιών και μικροσκοπική εξέταση παρασκευασμάτων χρωματισμένων κατά Gram από τις αποικίες που έχουν διαυγή ζώνη αιμόλυσης (β-αιμόλυση).

- Έλεγχο ευαισθησίας των ύποπτων αποικιών σε βακιτρασίνη 0,04 μονάδων.
- Ορολογική τυποποίηση κατά Lancefield.
- Αναζήτηση του τίτλου των αντισωμάτων απέναντι στα αντιγόνα και κυρίως της στρεπτολυσίνης Ο (τίτλος ASO).

### 3.3. *Streptococcus pneumoniae* (Πνευμονιόκοκκος)

#### I. ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ - ΧΡΩΣΗ

Ο *S. pneumoniae* είναι Gram θετικός κόκκος, ακίνητος, αερόβιος ή εκλεκτικά αναερόβιος, με σχήμα που μοιάζει με λόγχη ή φλόγα κεριού και περιβάλλεται από παχύ έλυτρο. Τα κύτταρά του διατάσσονται σε ζεύγη (διπλόκοκκος) ή σχηματίζουν μικρές αλυσίδες.



Σχήμα 3.2: *Streptococcus pneumoniae*

#### II. ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ

Η καλλιέργειά του γίνεται σε εμπλουτισμένα θρεπτικά υλικά που περιέχουν αίμα με άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης τους 37<sup>ο</sup> C. Η ανάπτυξή του ευνοείται σε ατμόσφαιρα CO<sub>2</sub> 10%. Οι αποικίες, μετά από 24ωρη επώαση στο αιματούχο άγαρ, είναι κυκλικές, γυαλιστερές, ημιδιαφανείς, φουσκωτές στην περιφέρεια και χαμηλότερες στο κέντρο (σαν πιατάκια). Περιβάλλονται από ζώνη αιμόλυσης (πράσινο χρώμα -μερική αιμόλυση). Στο σοκολατόχρωμο άγαρ το πράσινο χρώμα είναι εντονότερο και παρατηρείται επιπλέον ξάσπρισμα του υλικού κάτω από την αποικία. Ο αποχρωματισμός του σοκολατόχρωμου άγαρ οφείλεται στην παραγωγή υπεροξειδίου του υδρογόνου (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) και είναι διαφοροδιαγνωστικό στοιχείο του είδους.



Εικόνα 3.2: Αποικίες *Streptococcus pneumoniae* σε μεγέθυνση



### III. ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ

Οι σπουδαιότερες βιοχημικές ιδιότητες του *S. pneumoniae* είναι οι εξής:

- Η ανάπτυξή του αναστέλλεται από την οπτοχίνη.
- Κυτταρολύεται από την προσθήκη χολής (Δοκιμή διαλυτότητας στη χολή).
- Διασπά διάφορα σάκχαρα με παραγωγή οξέος, όπως τη γλυκόζη, τη φρουκτόζη, τη λακτόζη κ.ά.

	Δοκιμασία			Διάσπαση	
	Οπτοχίνη	Χολή	Γλυκόζη	Φρουκτόζη	Λακτόζη
<i>S. pneumoniae</i>	+	+	+	+	+

Πίνακας 3.2: Βιοχημικές ιδιότητες του *S. pneumoniae*

### IV. ΑΝΤΙΓΟΝΙΚΗ ΣΥΣΤΑΣΗ ΤΟΞΙΚΕΣ ΟΥΣΙΕΣ

Το παχύ έλυτρο, που περιβάλλει το κύτταρο του βακτηρίου, αυξάνει τη λοιμογόνο δράση του και το προστατεύει από τη φαγοκυττάρωση. Με βάση την αντιγονική σύσταση του ελύτρου που είναι ένα πολυσακχαριδικό αντιγόνο ο *S. pneumoniae* διαχωρίζεται σε ορολογικούς τύπους.

Οι κυριότερες τοξίνες του *S. pneumoniae* είναι:

- Η πνευμονολυσίνη-Ο: Προκαλεί λύση των ερυθρών αιμοσφαιρίων. Είναι ευαίσθητη στην παρουσία οξυγόνου και μοιάζει αντιγονικά με τη στρεπτολυσίνη-Ο.
- Πορφυρογόνοξ τοξίνη: Στη δράση της αποδίδεται το εξάνθημα που είναι δυνατόν να παρουσιαστεί κατά την πνευμονιοκοκκική νόσο.

### V. ΠΑΘΟΓΟΝΟΣ ΔΡΑΣΗ

Η παθογόνος δράση του *S. pneumoniae* οφείλεται στο παχύ έλυτρο, το οποίο τον προφυλάσσει από τις αμυντικές δυνάμεις του οργανισμού. Οι τοξίνες του ελάχιστα συμβάλλουν στην παθογόνο δράση του.

Οι πιο γνωστές πνευμονιοκοκκικές ασθένειες είναι οι: λοβώδης πνευμονία, μέση πυώδης ωτίτιδα και μηνιγγίτιδα. Με την κυκλοφο-



ρία του αίματος (μικροβαιμία) το βακτήριο μπορεί να εγκατασταθεί σε άλλα όργανα και να προκαλέσει ενδοκαρδίτιδα, παραρρινοκολπίτιδα, αρθρίτιδα κ.ά.

#### VI. ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ

Γίνεται με:

- Μικροσκοπική εξέταση του υλικού από τις βλάβες μετά από χρώση κατά Gram των παρασκευασμάτων για την αναζήτηση του *S. pneumoniae*.
- Καλλιέργεια του ύποπτου υλικού σε αιματούχο και σοκολατόχρωμο άγαρ. Το δείγμα μπορεί να είναι πτύελα, πύο αποστημάτων, εγκεφαλονωτιαίο υγρό (ΕΝΥ), υγρό εξιδρωμάτων, επιχρίσματα, αίμα κ.ά.
- Μακροσκοπική εξέταση αποικιών και χρώση κατά Gram ξηρών παρασκευασμάτων από τις ύποπτες αποικίες (σαν πιατάκι με α-αιμόλυση).
- Έλεγχο της ευαισθησίας των αποικιών στην οπτοχίνη.
- Δοκιμασία της χολής.
- Δοκιμή ευαισθησίας στα αντιβιοτικά.
- Αν χρειάζεται η ορολογική τυποποίηση του στελέχους που έχει απομονωθεί (σε επιδημίες), γίνεται η δοκιμασία εξοιδήσεως του ελύτρου με τους ειδικούς αντιορούς. Κατά τη δοκιμασία εξοιδήσεως, εάν αναμειχθεί ένα στέλεχος *S. pneumoniae* με τον αντίστοιχο αντιορό, παρατηρείται διόγκωση του ελύτρου, που φαίνεται σαν διαυγής περιοχή η οποία περιβάλλει το μικροβιακό κύτταρο.

### 3.4. *Enterococcus* (Εντερόκοκκοι)

#### A. Γενικά

Το γένος *Enterococcus* με βάση παλαιότερες ταξινομήσεις ανήκε στο γένος *Streptococcus*. Τα τελευταία χρόνια αποσπάστηκε και αποτελεί ένα καινούργιο γένος με 13 είδη. Οι βασικοί χαρακτήρες του γένους *Enterococcus*, που το διαχωρίζουν από το γένος *Streptococcus*, είναι ότι αναπτύσσεται σε υλικό που περιέχει NaCl 6,5%, καθώς και σε υλικά που περιέχουν εσκουλίνη και χολή.

## B. *Enterococcus Faecalis*

### I. ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ - ΧΡΩΣΗ

Ο *E. faecalis* είναι Gram θετικός, ωοειδής κόκκος. Τα κύτταρά του διατάσσονται κατά ζεύγη ή σε κοντές αλυσίδες και μερικά στελέχη είναι κινητά.

### II. ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ

Αναπτύσσεται σε κοινά και σε εκλεκτικά θρεπτικά υλικά. Στο αιματούχο άγαρ δίνει αποικίες λείες, περιγεγραμμένες, χωρίς ζώνη αιμόλυσης. Στο υλικό Mac Conkey No 2 παράγει μικρότερες αποικίες με βαθυπόρφυρο χρώμα. Έχει ως άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης τους 37<sup>ο</sup> C. Ο *E. faecalis* αναπτύσσεται αργά, γι' αυτό μια ουροκαλλιέργεια θεωρείται θετική και με λιγότερες από 100.000 c.f.u./ml ούρων.

### III. ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ

Οι σπουδαιότερες βιοχημικές ιδιότητες του *E. faecalis* είναι:

- Αναπτύσσεται σε υλικό με NaCl 6,5%.
- Υδρολύει την εσκουλίνη.
- Διασπά τη γλυκόζη, τη λακτόζη, τη μαννιτόλη και άλλα σάκχαρα.
- Δε ρευστοποιεί την πηκτή.



Εικόνα 3.3: Υδρόλυση Εσκουλίνης

	Ανάπτυξη	Υδρόλυση	Διάσπαση		Ρευστοποίηση	
	NaCl 6,5 %	Εσκουλίνη	Γλυκόζη	Μαννιτόλη	Λακτόζη	Πηκτή
<i>E. faecalis</i>	+	+	+	+	+	-

Πίνακας 3.3: Βιοχημικές ιδιότητες του *E. faecalis*

#### IV. ΑΝΤΙΓΟΝΙΚΗ ΣΥΣΤΑΣΗ - ΤΟΞΙΚΕΣ ΟΥΣΙΕΣ

Έχει το σακχαριδικό αντιγόνο της D ομάδας κατά Lancefield. Δεν παράγει αιμολυσίνες και καταλάση. Μερικά στελέχη παράγουν υαλουρονιδάση και διάφορες βακτηριοσίνες.

#### V. ΠΑΘΟΓΟΝΟΣ ΔΡΑΣΗ

Ο *E. faecalis* είναι βακτήριο της φυσιολογικής χλωρίδας του εντέρου. Όταν εισέλθει στην κυκλοφορία του αίματος, είναι δυνατόν να προκαλέσει λοιμώξεις, όπως π.χ. ενδοκαρδίτιδα. Προκαλεί ουρολοιμώξεις λόγω της ευκολίας επιμόλυνσης από την εντερική χλωρίδα στην ουρογεννητική περιοχή. Ευθύνεται για τη νεογνική μηνιγγίτιδα, ενδοοσσοκομειακές επιδημίες κ.ά.

#### VI. ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ

Γίνεται με:

- Εμβολιασμό του δείγματος σε αιματούχο και Mac Conkey άγαρ Νο 2. Το δείγμα μπορεί να είναι αίμα, ούρα και διάφορα παθολογικά υλικά.
- Μακροσκοπική μελέτη αποικιών και μικροσκοπική εξέταση παρασκευασμάτων με χρώση κατά Gram.
- Δοκιμασία υδρόλυσης της εσκουλίνης.
- Ανάπτυξη σε υλικό με NaCl 6,5%.

### Ανακεφαλαίωση

Το γένος *Streptococcus* είναι Gram θετικοί κόκκοι, σφαιρικοί ή ωοειδείς. Διατάσσονται σε ζεύγη ή σχηματίζουν αλυσίδες. Οι περισσότεροι είναι εκλεκτικά αναερόβιοι, μερικοί αυστηρά αερόβιοι και άλλοι απαιτούν ατμόσφαιρα CO<sub>2</sub>. Είναι καταλάση αρνητικά βακτήρια.

Με βάση το είδος της αιμόλυσης που προκαλούν στο αιματούχο άγαρ, οι Στρεπτόκοκκοι διαχωρίζονται σε β-αιμολυτικούς, α-αιμολυτικούς και μη-αιμολυτικούς.

Οι β-αιμολυτικοί Στρεπτόκοκκοι διαχωρίζονται σε 20 ορο-ομάδες (A, B, C, D...) με βάση το σακχαριδικό αντιγόνο C που βρίσκεται στο κυτταρικό τους τοίχωμα (ορολογική τυποποίηση κατά Lancefield).

Ο *S. pyogenes* είναι β - αιμολυτικός Στρεπτόκοκκος και ανήκει στην Α ομάδα. Διακρίνεται σε περισσότερους από 70 ορολογικούς τύπους με βάση την πρωτεΐνη M του κυτταρικού τους τοιχώματος. Είναι υπεύθυνος για τις περισσότερες στρεπτοκοκκικές λοιμώξεις.

Ο *S. pneumoniae* είναι Gram θετικός διπλόκοκκος, σχήματος λοχχοειδούς, και περιβάλλεται από παχύ έλυτρο. Είναι α-αιμολυτικός Στρεπτόκοκκος. Η ανάπτυξη του διευκολύνεται σε ατμόσφαιρα CO<sub>2</sub>. Δίνει θετική τη δοκιμασία της οπτοχίνης και τη δοκιμασία χολής. Αποτελεί το κύριο αίτιο της λοβώδους πνευμονίας.

Ο *E. faecalis* αποτελεί συχνό αίτιο ουρολοιμώξεων λόγω του ότι ανήκει στη φυσιολογική χλωρίδα του εντέρου και εύκολα επιμολύνει την ουρογεννητική περιοχή.

### Ερωτήσεις

1. Σε ποιες κατηγορίες διαχωρίζεται το γένος *Streptococcus* με βάση το είδος της αιμόλυσης που προκαλεί στο αιματούχο άγαρ;
2. Τι γνωρίζετε για τις αιμολυσίνες του *S. pneumoniae*;
3. Ποια είναι η εργαστηριακή διάγνωση του *S.pneumoniae*;
4. Περιγράψτε τη μακροσκοπική και τη μικροσκοπική εικόνα του *S.pneumoniae*.
5. Ποια είναι η παθογόνος δράση του *S. pneumoniae*;
6. Περιγράψτε τη μακροσκοπική εικόνα του *E. faecalis* στο αιματούχο και στο Mac Conkey άγαρ No 2.
7. Ποια είναι η παθογόνος δράση του *E. faecalis*;

## 4.1. Γενικά - είδη

Το γένος *Neisseria* ανήκει στην οικογένεια των *Neisseriaceae* και περιλαμβάνει 14 είδη. Δύο από αυτά, η *Neisseria meningitidis* και η *Neisseria gonorrhoeae*, είναι τα πιο παθογόνα βακτήρια για τον άνθρωπο από το γένος αυτό.

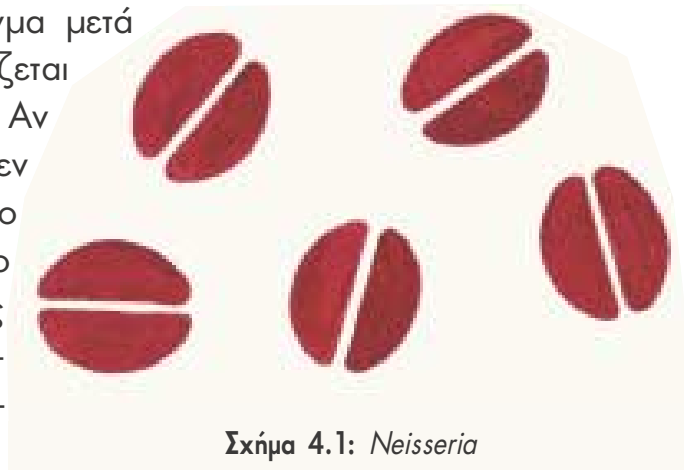
## 4.2. *Neisseria meningitidis* (Μηνιγγιτιδόκοκκος)

### I. ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ - ΧΡΩΣΗ

Η *N. meningitidis* είναι Gram αρνητικός διπλόκοκκος. Τα κύτταρά της έχουν σχήμα κόκκων καφέ με τις κοίλες επιφάνειές τους αντικριστές. Είναι βακτήριο ακίνητο, άσπορο, με έλυτρο και ινίδια.

### II. ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ

Η *N. meningitidis* αναπτύσσεται κάτω από αερόβιες συνθήκες. Σε ατμόσφαιρα CO<sub>2</sub> 10% ευνοείται η ανάπτυξη του βακτηρίου με άριστη θερμοκρασία τους 36°-37°C. Δεν αναπτύσσεται σε κοινά θρεπτικά υλικά, αλλά στο αιματούχο και το σοκολατόχρωμο άγαρ, καθώς επίσης σε βρασμένο αιματούχο άγαρ (Lewinthal άγαρ). Αναπτύσσεται καλά στο Thayer Martin, υλικό εμπλουτισμένο με αίμα και αντιβιοτικά. Το υλικό Thayer Martin βοηθά στην απομόνωση του βακτηρίου, όταν το δείγμα προέρχεται από περιοχή του σώματος που φέρει μικροβιακή χλωρίδα. Το δείγμα μετά τη λήψη πρέπει να εμβολιάζεται αμέσως στο θρεπτικό υλικό. Αν χρειαστεί να φυλαχτεί, δεν πρέπει να μπει στο ψυγείο αλλά σε κλίβανο 37°C. Στο αιματούχο άγαρ οι αποικίες είναι αρκετά μεγάλες, γυαλιστερές και ελαφρά γκριζωπές.



Σχήμα 4.1: *Neisseria*

## Κεφάλαιο 4<sup>ο</sup> *Neisseria* (Ναισσέριες)

### III. ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ

Οι σπουδαιότερες βιοχημικές ιδιότητες της *N. meningitidis* είναι:

- Παράγει οξειδάση.
- Παράγει καταλάση.
- Διασπά τη γλυκόζη και τη μαλτόζη χωρίς παραγωγή αερίου.
- Δεν αναπτύσσεται στους 22°C, όπως άλλα είδη σαπροφυτικών Ναισσεριών.

	Παραγωγή		Διάσπαση		Ανάπτυξη
	Καταλάση	Οξειδάση	Γλυκόζη	Μαλτόζη	22° C
<i>N. meningitidis</i>	+	+	+	+	-

Πίνακας 4.1: Βιοχημικές ιδιότητες της *N. meningitidis*

### IV. ΑΝΤΙΓΟΝΙΚΗ ΣΥΣΤΑΣΗ - ΤΟΞΙΚΕΣ ΟΥΣΙΕΣ

Με βάση το πολυσακχαριδικό αντιγόνο του ελύτρου χωρίζεται σε 13 ορολογικές ομάδες που σημειώνονται με κεφαλαία γράμματα του λατινικού αλφαβήτου. Άλλα αντιγόνα που βρίσκονται στην εξωτερική μεμβράνη είναι τα πρωτεϊνικά αντιγόνα, τα ινιδιακά αντιγόνα κ.ά.

### V. ΠΑΘΟΓΟΝΟΣ ΔΡΑΣΗ

Η μηνιγγίτιδα είναι η συχνότερη μηνιγγιτιδοκοκκική νόσος. Προσβάλλει κυρίως τα βρέφη (6 μηνών έως 1 έτους) και τα παιδιά. Αρχίζει ως μικροβιαμία με υψηλό πυρετό και αιμορραγικό εξάνθημα (πετεχειώδεις αιμορραγίες στο δέρμα). Στη μηνιγγίτιδα φλεγμαίνουν οι μήνιγγες με θρομβώσεις των μικρών αγγείων, αύξηση των πολυμορφοπυρήνων και παραγωγή πύου. Άλλες επιπλοκές της μηνιγγιτιδοκοκκικής μικροβιαμίας είναι η αρθρίτιδα, η ενδοκαρδίτιδα, η πυώδης επιπεφυκίτιδα κ.ά.

Η μηνιγγίτιδα από τη *N. meningitidis* εμφανίζεται με τη μορφή επιδημιών ή με τη μορφή σποραδικών κρουσμάτων.

### VI. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ

Η *N. meningitidis* βρίσκεται κυρίως στο στοματικό και φαρυγγικό βλεννογόνο και σπανιότερα στο ρινοφάρυγγα. Στις περιοχές

αυτές ζει ως μέλος της φυσιολογικής χλωρίδας τους. Το ποσοστό των φορέων του βακτηρίου φθάνει το 80% σε άτομα που ζουν πολλά μαζί, όπως είναι οι στρατιώτες.

Η *N. meningitidis* είναι ευπαθής στις συνθήκες του περιβάλλοντος και καταστρέφεται εύκολα. Η μετάδοση γίνεται με τα σταγονίδια αλλά σε πολύ περιορισμένη έκταση.

#### VII. ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ

Η διάγνωση της μηνιγγίτιδας γίνεται με την καλλιέργεια εγκεφαλονωτιαίου υγρού. Άλλα δείγματα στα οποία απομονώνεται η *N. meningitidis* είναι το αρθρικό υγρό, το υγρό από τις πετέχειες, το φαρυγγικό επίχρισμα, το αίμα κ.ά.

Η εργαστηριακή διάγνωση γίνεται ως εξής:

1. Φυγοκέντρηση του ΕΝΥ για 8-10 λεπτά και μικροσκοπική εξέταση παρασκευασμάτων από το ίζημα χρωματισμένων κατά Gram. Εάν βρεθούν οι τυπικοί Gram αρνητικοί καφεοειδείς διπλόκοκκοι, η εξέταση αυτή αρκεί, για να χαρακτηριστεί το βακτήριο ως *N.meningitidis*. Το εργαστήριο οφείλει να δώσει επειγόντως την απάντηση της μικροσκοπικής εξέτασης στο γιατρό, ώστε να αρχίσει η κατάλληλη θεραπεία της νόσου. Κάθε καθυστέρηση μπορεί να αποβεί μοιραία για τον ασθενή. Βέβαια το εργαστήριο συνεχίζει την καλλιέργεια μέχρι την τελική ταυτοποίηση του βακτηρίου.
2. Καλλιέργεια σε αιματούχο και σοκολατόχρωμο άγαρ σε ατμόσφαιρα CO<sub>2</sub> 10%, για 24 ώρες, σε θερμοκρασία 36° - 37°C.
3. Μακροσκοπική εξέταση αποικιών και μικροσκόπηση παρασκευασμάτων από τις ύποπτες αποικίες χρωματισμένων κατά Gram.
4. Οι ύποπτες αποικίες ελέγχονται για την παραγωγή οξειδάσης, για τη διάσπαση διαφόρων σακχάρων και την ικανότητα ανάπτυξης στους 22°C.
5. Καθορισμός της ορολογικής ομάδας με βάση το πολυσακχαριδικό αντιγόνο του ελύτρου. Η ορολογική τυποποίηση γίνεται με τους ειδικούς αντιορούς.



## Κεφάλαιο 4<sup>ο</sup> *Neisseria* (Ναισσέριες)

### VIII. ΠΡΟΦΥΛΑΞΗ

Υπάρχει εμβόλιο που χορηγείται συνήθως στα κέντρα νεοσύλλεκτων στρατιωτών και σε άτομα που έχουν υποβληθεί σε σπληνεκτομή. Γίνεται καταπολέμηση της φαρυγγικής μικροβιοφορίας στα άτομα που ζούσαν μαζί με τους ασθενείς (π.χ. οικογένειες, στρατώνες) με αντιβιοτικά. Επίσης δίνεται χημειοπροφύλαξη στα άτομα που ήρθαν σε άμεση επαφή με τον ασθενή (π.χ. οικογένεια, νοσηλευτικό, ιατρικό προσωπικό).

### 4.3. *Neisseria gonorrhoeae* (Γονόκοκκος).

#### I. ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ - ΧΡΩΣΗ

Η *N. gonorrhoeae* είναι Gram αρνητικός διπλόκοκκος. Τα κύτταρά της έχουν σχήμα κόκκων καφέ με τις κοίλες επιφάνειές τους αντικριστές. Είναι βακτήριο ακίνητο, άσπορο, αερόβιο, χωρίς έλυτρο, με ινίδια.

#### II. ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ

Αναπτύσσεται κάτω από αερόβιες συνθήκες. Η ανάπτυξή της ευνοείται σε ατμόσφαιρα CO<sub>2</sub> 10% και η επώαση γίνεται στους 35° C, για 24 ώρες.

Δεν αναπτύσσεται στα κοινά πεπτονούχα θρεπτικά υλικά αλλά σε εμπλουτισμένα, όπως το αιματούχο και το σοκολατόχρωμο άγαρ. Αναπτύσσεται καλά στο Thayer Martin άγαρ, υλικό εμπλουτισμένο με αίμα και αντιβιοτικά.

Στις ανακαλλιέργειες οι αποικίες της *N. gonorrhoeae* εμφανίζουν πολυμορφισμό ως προς τη μορφή, το μέγεθος και την όψη. Ο πολυμορφισμός αυτός είναι ένα χαρακτηριστικό διαχωριστικό γνώρισμα από τα άλλα Gram αρνητικά κοκκοβακτηρίδια των οποίων οι αποικίες είναι ομοιόμορφες.

#### III. ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ

Οι βασικότερες βιοχημικές ιδιότητες της *N. gonorrhoeae* είναι:

- Παράγει το ένζυμο οξειδάση.

- Παράγει το ένζυμο καταλάση.
- Η βασική διαχωριστική βιοχημική ιδιότητα της *N. gonorrhoeae* είναι η ζύμωση μόνο της γλυκόζης χωρίς παραγωγή αερίου.
- Δεν αναπτύσσεται στους 22°C.

	Παραγωγή		Διάσπαση		Ανάπτυξη
	Καταλάση	Οξειδάση	Γλυκόζη	Μαλτόζη	22° C
<i>N. gonorrhoeae</i>	+	+	+	-	-

Πίνακας 4.2: Βιοχημικές ιδιότητες της *N. gonorrhoeae*

#### IV. ΑΝΤΙΓΟΝΙΚΗ ΣΥΣΤΑΣΗ - ΤΟΞΙΚΕΣ ΟΥΣΙΕΣ

Τα κυριότερα αντιγόνα της *N. gonorrhoeae* είναι:

- Τα αντιγόνα της εξωτερικής μεμβράνης (πρωτεΐνες, φωσφολιπίδια, λιποπολυσακχαρίδια). Η πρωτεΐνη II είναι ένα από τα σπουδαιότερα αντιγόνα.
- Τα αντιγόνα των ινιδίων. Τα ινίδια έχουν σχέση με την παθογόνο δράση του βακτηρίου, επειδή βοηθούν στην προσκόλλησή του στις επιφάνειες των βλεννογόνων. Τα αντισώματα που παράγονται από τον οργανισμό έναντι των αντιγόνων αυτών εμποδίζουν την προσκόλληση του και μειώνουν την παθογόνο του δράση.

#### V. ΠΑΘΟΓΟΝΟΣ ΔΡΑΣΗ

Η *N. gonorrhoeae* προκαλεί τη γονοκοκκική ουρηθρίτιδα (βλεννόρροια), δηλαδή δημιουργεί πυώδεις φλεγμονές στην ουρήθρα. Το κυριότερο σύμπτωμα στους άντρες είναι η εκροή πυώδους υγρού από την ουρήθρα το πρωί πριν από την ούρηση. Μεταφερόμενο το βακτήριο με το αίμα μπορεί να προκαλέσει λοιμώξεις σε απομακρυσμένα όργανα, όπως αρθρίτιδα, ενδοκαρδίτιδα, μηνιγγίτιδα. Στα μικρά κορίτσια προκαλεί αιδοιοκολπίτιδα και στους ομοφυλόφιλους άνδρες ορθοπρωκτίτιδα. Στις γυναίκες μπορεί να επεκταθεί στις σάλπιγγες και στους άνδρες στους όρχεις με πιθανότητα στειρώσεως, αν δεν αντιμετωπιστεί. Στις γυναίκες προκαλεί επίσης τραχηλίτιδα (όχι κολπίτιδα).

## Κεφάλαιο 4<sup>ο</sup> *Neisseria* (Ναισσέριες)

Το νεογνό είναι δυνατόν να πάθει γονοκοκκική οφθαλμία (πάθηση σοβαρή, που μπορεί να οδηγήσει σε τύφλωση) κατά τη διάρκεια του τοκετού, περνώντας από τον τράχηλο της μήτρας που έχει μολυνθεί από τη *N. gonorrhoeae*. Για προφύλαξη στάζουμε στα μάτια του νιτρικό άργυρο ( $\text{AgNO}_3$ ) 1% ή πενικιλίνη.

### VI. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ

Η *N. gonorrhoeae* μεταδίδεται με άμεση επαφή, κυρίως γενετήσια. Είναι βακτήριο ευαίσθητο στο περιβάλλον, και καταστρέφεται γρήγορα.

### VII. ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ

Γίνεται με:

- Επίστρωση του εκκρίματος (ενδοτραχηλικού, ουρήθρας, ορθοπρωκτικού κ.τ.λ.) σε αντικειμενοφόρο πλάκα και χρωματισμό του με χρώση Gram. Gram αρνητικοί καφεοειδείς διπλόκοκοι, μέσα και έξω από τα πυοσφαίρια, μας οδηγούν σε θετικό αποτέλεσμα.
- Εμβολιασμό του δείγματος στα κατάλληλα θρεπτικά υλικά (αιματούχο, σοκολατόχρωμο και Thayer Martin άγαρ), επώαση σε ατμόσφαιρα  $\text{CO}_2$  10%, για 24 ώρες και σε θερμοκρασία  $35^\circ\text{C}$ .
- Μακροσκοπική και μικροσκοπική μελέτη αποικιών.
- Έλεγχο παραγωγής οξειδάσης, διάσπαση σακχάρων και ανάπτυξη στους  $22^\circ\text{C}$ .
- Άμεση ανίχνευση με ανοσοχημικές μεθόδους στο πύο της ουρήθρας ή στο επίχρισμα του ενδοτραχήλου.

Β  
Α  
Κ  
Τ  
Γ  
Ι  
Ρ  
Ι  
Α

## Ανακεφαλαίωση

Η *N. meningitidis* είναι Gram αρνητικός διπλόκοκκος. Τα κύτταρά της έχουν σχήμα κόκκων καφέ με τις κοίλες επιφάνειές τους αντικριστές. Αναπτύσσεται σε εμπλουτισμένα θρεπτικά υλικά, όπως το αιματούχο και το σοκολατόχρωμο άγαρ, καθώς και το Thayer Martin άγαρ, υλικό εμπλουτισμένο με αίμα και αντιβιοτικά. Η ανάπτυξη του βακτηρίου ευνοείται σε ατμόσφαιρα CO<sub>2</sub> 10%. Παράγει οξειδάση και καταλάση. Προκαλεί μεταξύ άλλων μηνιγγίτιδα, μια από τις περισσότερο σοβαρές ασθένειες για τον άνθρωπο.

Η *N. gonorrhoeae* έχει την ίδια μικροσκοπική εικόνα με τη *N. meningitidis* και αναπτύσσεται στα ίδια θρεπτικά υλικά και στις ίδιες συνθήκες επώασης. Προκαλεί γονοκοκκική ουρηθρίτιδα (βλεννόρροια), γονοκοκκική οφθαλμία στα νεογνά, αρθρίτιδα, ενδοκαρδίτιδα κ.ά.

## Ερωτήσεις

1. Ποια είναι η μικροσκοπική εικόνα της *N. meningitidis*;
2. Ποια είναι τα θρεπτικά υλικά και οι συνθήκες καλλιέργειας για τη *N. meningitidis*;
3. Ποια είναι η εργαστηριακή διάγνωση της *N. meningitidis*;
4. Ποιες είναι οι βιοχημικές ιδιότητες της *N. gonorrhoeae*;
5. Ποια είναι η παθογόνος δράση της *N. gonorrhoeae*;
6. Σε ποια δείγματα είναι δυνατόν να απομονωθεί η *N. gonorrhoeae* και πως γίνεται η εργαστηριακή διάγνωση;

## 5.1. Γενικά - είδη

Τα γένη της οικογένειας *Enterobacteriaceae* είναι βακτήρια που βρίσκονται κυρίως στο έντερο του ανθρώπου, αλλά και σε άλλες περιοχές του σώματος, καθώς και στα φυτά και στο έδαφος. Είναι Gram αρνητικά βακτηρίδια που αναπτύσσονται σε αερόβιες συνθήκες, άσπορα, κινητά ή ακίνητα. Όλα τα γένη ζυμώνουν τη γλυκόζη και μερικά με παραγωγή αερίου. Παράγουν καταλάση, δεν παράγουν οξειδάση και ανάγουν τα νιτρικά άλατα σε νιτρώδη.

Ανάλογα με το αν διασπούν (ζυμώνουν) τη λακτόζη στο θρεπτικό υλικό Mac Conkey άγαρ, χωρίζονται σε δύο ομάδες:

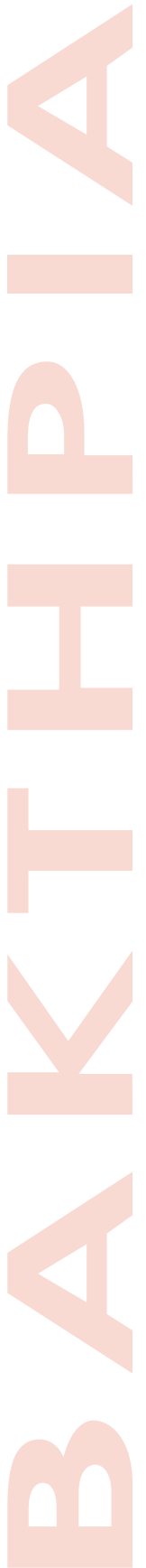
**1. Τα γένη που ζυμώνουν τη λακτόζη** και παράγουν κόκκινες αποικίες στο θρεπτικό υλικό. Είναι:

- *Escherichia* (Εσερίχειες)
- *Klebsiella* (Κλεμψιέλλες)
- *Enterobacter* (Εντεροβακτήρια)

**2. Τα γένη που δε ζυμώνουν τη λακτόζη** και παράγουν άχρωμες αποικίες. Είναι:

- *Salmonella* (Σαλμονέλλες)
- *Shigella* (Σιγκέλλες)
- *Serratia* (Σερράτιες)
- *Proteus* (Πρωτεΐς)

Για να ταυτοποιήσουμε τα γένη *Enterobacteriaceae*, χρησιμοποιούμε τη δοκιμασία IMViC, ενώ, για να ταυτοποιήσουμε τα είδη του κάθε γένους, μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε το υλικό Kligler, με το οποίο ελέγχουμε συγχρόνως τη ζύμωση της γλυκόζης, με ή χωρίς παραγωγή αερίου, τη ζύμωση της λακτόζης και την παραγωγή υδρόθειου. Το υλικό Kligler περιέχει γλυκόζη, λακτόζη, εναμμόνιο θειικό σίδηρο, θειοθειικό νάτριο, άγαρ και ως δείκτη του pH το ερυθρό της φαινόλης. Αν το βακτήριο ζυμώνει τη γλυκόζη με παραγωγή αερίου, παρατηρείται κίτρινο χρώμα στην ευθεία στήλη του υλικού και σχηματισμός φυσαλίδων. Αν ζυμώνει τη λακτόζη, παρατηρείται κίτρινο χρώμα σε όλο το υλικό (και στην ευθεία και στη λοξή επιφάνεια), γιατί η λακτόζη μέσα στο υλικό είναι δέκα



φορές περισσότερη από τη γλυκόζη. Η ζύμωση της γλυκόζης και της λακτόζης γίνεται στην ευθεία στήλη του υλικού. Αν παράγει  $H_2S$  εμφανίζεται μαύρο χρώμα στην ευθεία στήλη του υλικού.

Χρησιμοποιούμε επίσης τη δοκιμασία κινητικότητας, τη δοκιμασία απαμίνωσης της φαινυλαλανίνης (PPA) κ.ά.

Η δοκιμασία IMViC περιλαμβάνει τέσσερις αντιδράσεις:

1. Την παραγωγή ινδόλης (Indole). Η ινδόλη παράγεται από τη διάσπαση του αμινοξέος τρυπτοφάνη και την ανιχνεύουμε με το αντιδραστήριο Kovacs, οπότε το υλικό στο σωληνάριο παίρνει κόκκινο χρώμα.
2. Την ανάπτυξη κόκκινου χρώματος με την προσθήκη ερυθρού του μεθυλίου (Methyl-Red). Βασίζεται στη διάσπαση της γλυκόζης με παραγωγή όξινων προϊόντων.
3. Την ανάπτυξη επίσης κόκκινου χρώματος με την προσθήκη του αντιδραστηρίου Voges-Proskauer, η οποία γίνεται στο ίδιο σωληνάριο με το ερυθρό του μεθυλίου.
4. Την ανάπτυξη σε υλικό με κιτρικό νάτριο (Citrate) ως μόνη πηγή άνθρακα.

Χρησιμοποιούμε επίσης έτοιμα ταυτοποιητικά υλικά με τα οποία ελέγχουμε περισσότερες βιοχημικές ιδιότητες, όπως το API 20E που ελέγχει 22 ιδιότητες, το Enterotube κ.ά.



Εικόνα 5.1: Υλικό Kligler

A: μάρτυρας

B: ζύμωση γλυκόζης στην ευθεία στήλη

Γ: ζύμωση γλυκόζης και λακτόζης στην ευθεία και λοξή στήλη με παραγωγή αερίου

Δ: Παραγωγή υδρόθειου και παραγωγή αερίου.

# Κεφάλαιο 5<sup>ο</sup> *Enterobacteriaceae* (Εντεροβακτηριακά)

## 5.2. *Escherichia coli* (Κολοβακτηρίδιο)

### I. ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ - ΧΡΩΣΗ

Η *E. coli* είναι Gram αρνητικό βακτηρίδιο, συνήθως κινητό, με βλεφαρίδες σε όλη την επιφάνεια του σώματός του (περίτριχο). Όλα τα στελέχη έχουν τη δυνατότητα να παράγουν έλυτρο και ινίδια.

### II. ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ

Η καλλιέργεια της *E. coli* γίνεται σε όλα τα κοινά θρεπτικά υλικά. Αναπτύσσεται σε αερόβιες συνθήκες, με άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης τους 37° C.

### III. ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ

Οι βιοχημικές ιδιότητες της *E.coli* είναι:

- Ζυμώνει τη γλυκόζη με παραγωγή αερίου.
- Ζυμώνει τη λακτόζη και παράγει ροδοκόκκινες αποικίες στο θρεπτικό υλικό Mac Conkey άγαρ.
- Δίνει τη δοκιμασία της ινδόλης θετική.
- Δίνει τη δοκιμασία ερυθρού του μεθυλίου θετική.
- Δίνει τη δοκιμασία Voges-Proskauer αρνητική.
- Δίνει τη δοκιμασία των κιτρικών αρνητική.

Η δοκιμασία IMViC για την *E.coli* είναι: IMViC (+ + - -).



Εικόνα 5.2: *Escherichia coli*

	Ζύμωση			Δοκιμασία		
	Γλυκόζη	Λακτόζη	Ινδόλη	M.R	V.P	Κιτρικά
<i>E.coli</i>	+ (με αέριο)	+	+	+	-	-

Πίνακας 5.1: Βιοχημικές ιδιότητες της *E.coli*

### IV. ΑΝΤΙΓΟΝΙΚΗ ΣΥΣΤΑΣΗ

Υπάρχουν διάφοροι ορολογικοί τύποι της *E. coli* που καθορίζονται από το σωματικό αντιγόνο O, το βλεφαριδικό αντιγόνο H και

το αντιγόνο του ελύτρου K, όπως το εντεροαιμορραγικό στέλεχος (EHEC) O157: H7.

#### V. ΠΑΘΟΓΟΝΟΣ ΔΡΑΣΗ

Ορισμένοι ορότυποι προκαλούν γαστρεντερικές διαταραχές στα βρέφη και τα παιδιά κάτω των δύο ετών με τη μορφή επιδημιών σε παιδιατρικά νοσοκομεία και μαιευτήρια.

Κάποια από τα στελέχη παράγουν εντεροτοξίνη και προκαλούν τη διάρροια των ταξιδιωτών και κάποια άλλα είναι το συχνότερο αίτιο των ουρολοιμώξεων.

Είναι δυνατόν να προκαλέσει επίσης μικροβαιμία, μηνιγγίτιδα στα νεογνά, διαπυήσεις τραυμάτων και πυώδεις φλεγμονές, όπως χολοκυστίτιδα, περιτονίτιδα, προστατίτιδα κ.ά.

#### VI. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ

Η *E. coli* είναι το πιο άφθονο αερόβιο βακτήριο όχι μόνο της εντερικής αλλά και όλης της φυσιολογικής χλωρίδας του ανθρώπου.

#### VII. ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ

Γίνεται με:

- Εμβολιασμό του δείγματος σε αιματούχο και Mac Conkey άγαρ. Το δείγμα συνήθως είναι ούρα, κόπρανα, πύο και γενικά οποιοδήποτε παθολογικό υλικό.
- Ανάγνωση των καλλιιεργειών μετά από 24ωρη επώαση και χρώση κατά Gram ξηρών παρασκευασμάτων από τις αποικίες που αναπτύχθηκαν.
- Ταυτοποίηση με ειδικές βιοχημικές δοκιμασίες (Kligler, δοκιμασίες IMViC, API κ.ά)
- Δοκιμή ευαισθησίας στα αντιβιοτικά.
- Ορολογική τυποποίηση του στελέχους σε γαστρεντερίτιδες νεογνών.

#### VIII. ΠΡΟΦΥΛΑΞΗ

Η προφύλαξη είναι δύσκολη εξαιτίας της μεγάλης διασποράς του βακτηρίου στο περιβάλλον αλλά και στο ίδιο το σώμα μας. Περιλαμβάνει μέτρα γενικής δημόσιας υγιεινής, όπως σωστή ύδρευση και αποχέτευση, μέτρα ειδικής υγιεινής στα νοσοκομεία και σωστή ατομική καθαριότητα.



# Κεφάλαιο 5<sup>ο</sup> *Enterobacteriaceae* (Εντεροβακτηριακά)

## ΙΧ. ΘΕΡΑΠΕΙΑ.

Η *E. coli* είναι ευαίσθητη στα περισσότερα αντιβιοτικά.

## 5.3. *Shigella* (Σιγκέλλες)

Το γένος *Shigella* περιλαμβάνει 4 είδη με κύριο εκπρόσωπο τη *Shigella dysenteriae*.

### I. ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ - ΧΡΩΣΗ

Είναι Gram αρνητικά βακτηρίδια, ακίνητα, χωρίς έλυτρο.

### II. ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ

Αναπτύσσονται σε κοινά θρεπτικά υλικά, σε αερόβιες συνθήκες, με άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης τους 37° C. Υπάρχουν επίσης ειδικά θρεπτικά υλικά για την απομόνωσή τους.

### III. ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ

Οι χαρακτηριστικές τους ιδιότητες είναι:

- Ζυμώνουν τη γλυκόζη, χωρίς να παράγουν αέριο.
- Δε ζυμώνουν τη λακτόζη και δίνουν άχρωμες αποικίες στο Mac Conkey άγαρ.
- Δεν παράγουν υδρόθειο (σε αντίθεση με το γένος *Salmonella*).

	Ζύμωση		Παραγωγή
<i>Shigella</i>	Γλυκόζη + (χωρίς αέριο)	Λακτόζη -	H <sub>2</sub> S -

Πίνακας 5.2: Βιοχημικές ιδιότητες του γένους *Shigella*

### IV. ΑΝΤΙΓΟΝΙΚΗ ΣΥΣΤΑΣΗ

Διακρίνονται σε διάφορους ορολογικούς τύπους με βάση το σωματικό αντιγόνο O.

Α  
Π  
Ρ  
Η  
Τ  
Κ  
Α  
Β

#### V. ΠΑΘΟΓΟΝΟΣ ΔΡΑΣΗ

Η κυριότερη νόσος που προκαλούν είναι η μικροβιακή δυσεντερία. Τα συμπτώματά της είναι χαρακτηριστικός πόνος στην κοιλιά, πυρετός και βλεννοαιματηρές κενώσεις. Στα κόπρανα του ασθενούς υπάρχουν πολλά πυοσφαίρια, βλέννα και αίμα. Δεν προκαλούν μικροβιαμία.

Η δράση τους αυτή οφείλεται σε μια εξωτοξίνη που παράγουν και στην ιδιότητα που έχουν να διεισδύουν στα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου, να τα καταστρέφουν και να σχηματίζουν έλκη.

#### VI. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ

Η νόσος μεταδίδεται από άτομο σε άτομο με άμεση επαφή και με μολυσμένο νερό και τρόφιμα. Η συχνότητα της νόσου είναι μεγαλύτερη στα νεογνά και στα παιδιά της προσχολικής ηλικίας. Παρατηρείται κυρίως το καλοκαίρι.

#### VII. ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ

Γίνεται με:

- Καλλιέργεια κοπράνων σε Mac Conkey άγαρ και στο ειδικό θρεπτικό υλικό SS άγαρ.
- Ανάγνωση των καλλιεργειών μετά από 24ωρη επώαση.
- Ανακαλλιέργεια από τις ύποπτες αποικίες, για να απομονωθούν από τα άλλα βακτήρια του εντέρου.
- Βιοχημική ταυτοποίηση.
- Δοκιμή ευαισθησίας στα αντιβιοτικά.
- Ορολογική τυποποίηση.

#### VIII. ΘΕΡΑΠΕΙΑ - ΠΡΟΦΥΛΑΞΗ

Η νόσος αυτοθεραπεύεται, οι ασθενείς όμως εξακολουθούν να αποβάλλουν βακτήρια από τα κόπρανα. Γι' αυτό πρέπει:

- Να ελέγχονται αυτοί που εργάζονται σε εστιατόρια, για να μην προκαλούνται τροφιμογενείς επιδημίες.
- Να τηρούνται οι κανόνες της ατομικής και δημόσιας υγιεινής.
- Να απομακρύνονται οι μικροβιοφορείς από την επεξεργασία-συσσκευασία των τροφίμων.

## 5.4. *Salmonella* (Σαλμονέλλες)

Από το γένος *Salmonella* οι πιο συνηθισμένες είναι *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi* A, B και C και *Salmonella enteritidis*.

### I. ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ - ΧΡΩΣΗ

Είναι Gram αρνητικά βακτηρίδια, άσπορα, κινητά, περίτριχα.

### II. ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ

Αναπτύσσονται στα κοινά θρεπτικά υλικά, σε αερόβιες συνθήκες, με άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης τους 37° C. Υπάρχουν ειδικά εμπλουτιστικά υγρά και στερεά θρεπτικά υλικά, όπως το SS άγαρ, απαραίτητα για την απομόνωσή τους.

### III. ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ

Οι σπουδαιότερες βιοχημικές τους ιδιότητες είναι:

- Ζυμώνουν τη γλυκόζη και παράγουν αέριο (εξαιρείται η *S. Typhi*, η οποία δεν παράγει αέριο).
- Δε ζυμώνουν τη λακτόζη και δίνουν άχρωμες αποικίες στο θρεπτικό υλικό Mac Conkey άγαρ.
- Αναπτύσσονται σε υλικό που περιέχει κιτρικό νάτριο ως μόνη πηγή άνθρακα, εκτός από τη *S. Typhi*.
- Παράγουν υδρόθειο και, σε αντίθεση με το γένος *Proteus*, δεν προκαλούν απαμίνωση της φαινυλαλανίνης ούτε παράγουν ουρεάση.

	Ιδιότητες	<i>Salmonella</i>	<i>S. typhi</i>
Ζύμωση	Γλυκόζη	+ (με αέριο)	+ (χωρίς αέριο)
	Λακτόζη	-	-
Παραγωγή	H <sub>2</sub> S	+	+ (1-2 ημέρες)
	Ουρεάση	-	-
Απαμίνωση	Φαινυλαλανίνης	-	-
Ανάπτυξη	Κιτρικό νάτριο	+	+

Πίνακας 5.3: Βιοχημικές ιδιότητες του γένους *Salmonella*

#### IV. ΑΝΤΙΓΟΝΙΚΗ ΣΥΣΤΑΣΗ

Έχουν διάφορα σωματικά αντιγόνα O και βλεφαριδικά αντιγόνα H που αναγνωρίζονται εύκολα με ειδικούς αντιορούς και έτσι μπορούμε να διακρίνουμε τα στελέχη μεταξύ τους.

#### V. ΠΑΘΟΓΟΝΟΣ ΔΡΑΣΗ

Είναι παθογόνα για τον άνθρωπο και τα ζώα και προκαλούν εντερικές και εξωεντερικές ασθένειες.

##### Εντερικές σαλμονελλώσεις

Τυφοειδής πυρετός και παράτυφοι A,B,C: Προκαλούνται από τη *S. Typhi* και τις *S. paratyphi*. Το βακτήριο εισέρχεται στην κυκλοφορία του αίματος, εγκαθίσταται στο έντερο και αποβάλλεται από τα κόπρανα δύο εβδομάδες μετά τη μόλυνση. Η αποβολή συνεχίζεται μετά την ανάρρωση μέχρι και έξι μήνες. Από τους φορείς αυτούς προκαλούνται επιδημίες. Η μικροβιοφορία οφείλεται στην παραμονή των βακτηρίων στη χοληδόχο κύστη.

Εντερίτιδα από *Salmonella enteritidis*: Τα τελευταία χρόνια έχουν παρουσιασθεί μικρές ή μεγάλες επιδημίες στα παιδιατρικά κυρίως νοσοκομεία και ιδρύματα που οφείλονται στη *S. enteritidis*. Αποβάλλονται από τα κόπρανα από την πρώτη ημέρα της ασθένειας. Εντερίτιδα χωρίς μικροβιοαίμια προκαλούν όλα τα είδη της *Salmonella*.

Τροφική δηλητηρίαση: Οφείλεται αποκλειστικά στην παραγωγή εντεροτοξίνης και όχι στον πολλαπλασιασμό του βακτηρίου. Τα συμπτώματα εμφανίζονται λίγες ώρες μετά τη λήψη μολυσμένων τροφίμων. Τα τρόφιμα που προκαλούν εντερίτιδες είναι το κοτόπουλο, τα αυγά, το κρέας τα γαλακτοκομικά προϊόντα, τα ψάρια και τα θαλασσινά.

##### Εξωεντερικές σαλμονελλώσεις

Είναι οι:

- Οστεομυελίτιδα και σπητική αρθρίτιδα, που παρατηρείται συχνότερα στα παιδιά.
- Μηνιγγίτιδα.
- Ουρολοιμώξεις κ.ά.

Προκαλούνται σε ανοσοκατασταλμένα άτομα, σε ηλικιωμένους, σε άτομα μετά από μεταμόσχευση, σε ασθενείς με δρεπανοκυτταρική αναιμία, AIDS κ.ά.

## VI. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ

Οι κυριότερες πηγές μόλυνσης είναι:

- Οι άνθρωποι που νοσούν ή είναι φορείς. Όποιος προσβληθεί από την ασθένεια γίνεται φορέας του βακτηρίου και το αποβάλλει με τα κόπρανά του. Μερικοί τύποι του βακτηρίου αποβάλλονται για εβδομάδες και άλλοι ακόμα και για χρόνια.
- Τα άρρωστα ζώα, ή τα ζώα που είναι φορείς.
- Τα έντομα και τα τρωκτικά, το νερό και τα διάφορα οικιακά σκεύη μπορούν να αποτελέσουν πηγή μόλυνσης.

## VII. ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ

Καλλιέργεια αίματος: Στον τυφοειδή πυρετό γίνεται καλλιέργεια αίματος τις πρώτες 10 ημέρες σε εμπλουτισμένο θρεπτικό ζωμό.

Καλλιέργεια κοπράνων: Γίνεται:

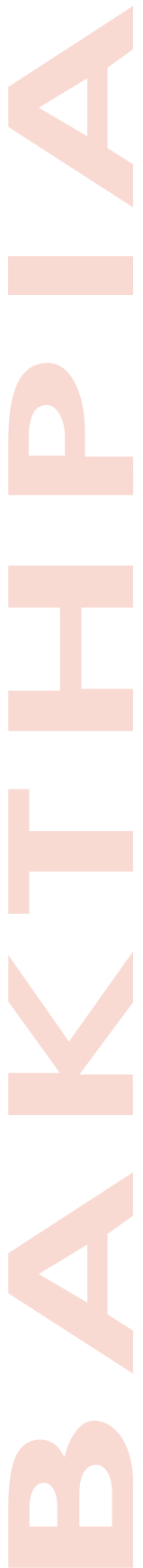
- Αρχικά με εμβολιασμό σε εμπλουτισμένους ζωμούς και κατόπιν σε στερεά θρεπτικά υλικά. Ειδικά στον τυφοειδή πυρετό γίνεται καλλιέργεια κοπράνων μετά τη δεύτερη εβδομάδα.
- Ανάγνωση των καλλιεργειών μετά από 24ωρη επώαση.
- Ανακαλλιέργεια από τις ύποπτες αποικίες, για να τις απομονώσουμε από τα άλλα βακτήρια του εντέρου.
- Βιοχημική ταυτοποίηση.
- Δοκιμή ευαισθησίας στα αντιβιοτικά.
- Ορολογική τυποποίηση με ειδικούς αντιορούς.

Ορολογική διάγνωση: Τα αντισώματα στον ορό του ασθενούς αυξάνουν μετά τη 10η ημέρα, οπότε τα ανιχνεύουμε με τη συγκολλητινοαντίδραση Widal.

## VIII. ΠΡΟΦΥΛΑΞΗ

Τα κυριότερα μέτρα προφύλαξης είναι:

- Να τηρούνται οι κανόνες υγιεινής στους χώρους παραγωγής των τροφίμων. Να μη χρησιμοποιούνται τα ίδια σκεύη (μαχαίρια, πιρούνια κ.τ.λ.) για ωμά και μαγειρεμένα τρόφιμα.
- Να τηρούνται σχολαστικά οι βασικοί κανόνες ατομικής υγιεινής.
- Για τον τυφοειδή και τους παράτυφους Α, Β και C γίνεται εμβολιασμός.



### ΙΧ. ΘΕΡΑΠΕΙΑ

Είναι ευαίσθητες σε αρκετά αντιβιοτικά με κυριότερα τη χλωραμφενικόλη, αμπικιλίνη κ.ά.

## 5.5. *Klebsiella pneumoniae* (Κλεμψιέλλα της πνευμονίας)

### I. ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ - ΧΡΩΣΗ

Η *K. pneumoniae* είναι Gram αρνητικό βακτηρίδιο, άσπορο, ακίνητο. Περιβάλλεται από έλυτρο που κάνει πολύ βλεννώδεις τις αποικίες του στα θρεπτικά υλικά.

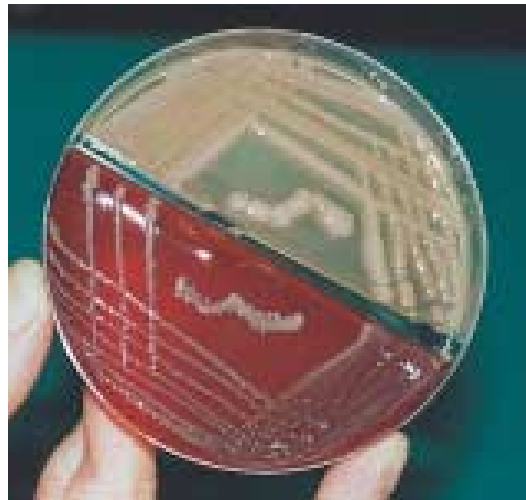
### II. ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ

Αναπτύσσεται εύκολα σε κοινά θρεπτικά υλικά, σε αερόβιες συνθήκες, με άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης τους 37° C.

### III. ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ

Οι σπουδαιότερες βιοχημικές της ιδιότητες είναι:

- Ζυμώνει τη γλυκόζη και παράγει αέριο.
- Ζυμώνει τη λακτόζη και οι αποικίες της είναι μεγάλες, κόκκινες, υδαρείς, πολύ γυαλιστερές και βλεννώδεις στο Mac Conkey άγαρ.
- Δεν παράγει ινδόλη, δίνει αρνητική τη δοκιμασία του ερυθρού του μεθυλίου, θετική τη δοκιμασία Voges - Proskauer και τη δοκιμασία του κιτρικού νατρίου. Η δοκιμασία IMViC στην *K. pneumoniae* δίνει το αποτέλεσμα IMViC ( - - + +).
- Παράγει ουρεάση και υδρολύει την ουρία.



Εικόνα 5.3: *Klebsiella pneumoniae*

	Ιδιότητες	<i>K. pneumoniae</i>
Ζύμωση	Γλυκόζη	+ (με αέριο)
	Λακτόζη	+
Παραγωγή	Ουρεάση	+
Δοκιμασία	Ινδόλη	-
	M.R	-
	V.P	+
	Κιτρικά	+

Πίνακας 5.4: Βιοχημικές ιδιότητες της *K. pneumoniae*

#### IV. ΑΝΤΙΓΟΝΙΚΗ ΣΥΣΤΑΣΗ

Διακρίνονται διάφοροι ορολογικοί τύποι που καθορίζονται από το σωματικό αντιγόνο O και το αντιγόνο του ελύτρου K.

#### V. ΠΑΘΟΓΟΝΟΣ ΔΡΑΣΗ

Η *K. pneumoniae* προκαλεί:

- Πνευμονία με δημιουργία πνευμονικών αποστημάτων σε άτομα με μειωμένη φυσική άμυνα ή με προϋπάρχουσες παθήσεις, όπως διαβήτη, ασθένειες του αναπνευστικού, αλκοολισμό.
- Ουρολοιμώξεις.
- Μηνιγγίτιδες.
- Νοσοκομειακές λοιμώξεις.

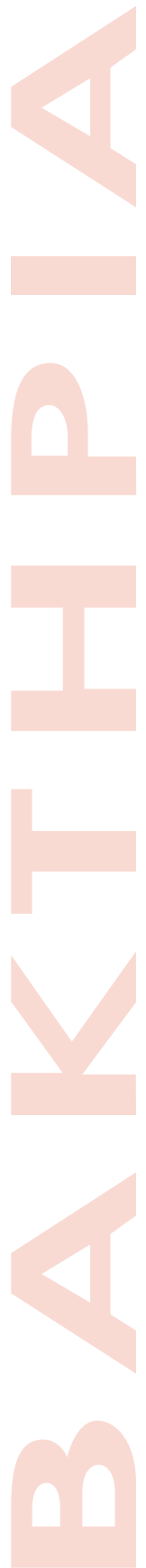
#### VI. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ

Η *K. pneumoniae* είναι βακτήριο της φυσιολογικής χλωρίδας του σώματος και του περιβάλλοντος, ευκαιριακά παθογόνο. Είναι από τα κυριότερα βακτήρια των νοσοκομειακών λοιμώξεων.

#### VII. ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ

Γίνεται με:

- Εμβολιασμό του δείγματος σε αιματούχο και Mac Conkey άγαρ. Το δείγμα συνήθως είναι πύελα, ούρα, αίμα, υγρά παρακεντήσεων κ.ά.
- Ανάγνωση των καλλιεργειών μετά από 24ωρη επώαση και χρώση κατά Gram ξηρών παρασκευασμάτων από τις αποικίες που αναπτύχθηκαν.
- Ταυτοποίηση με ειδικές βιοχημικές δοκιμασίες.
- Δοκιμή ευαισθησίας στα αντιβιοτικά.



**VIII. ΘΕΡΑΠΕΙΑ**

Η *K. pneumoniae* είναι περισσότερο ανθεκτική στα αντιβιοτικά από την *Escherichia coli*. Είναι ευαίσθητη στις κεφαλοσπορίνες και στις νεότερες αμινογλυκοσίδες.

**5.6. Proteus (Πρωτεΐς)**

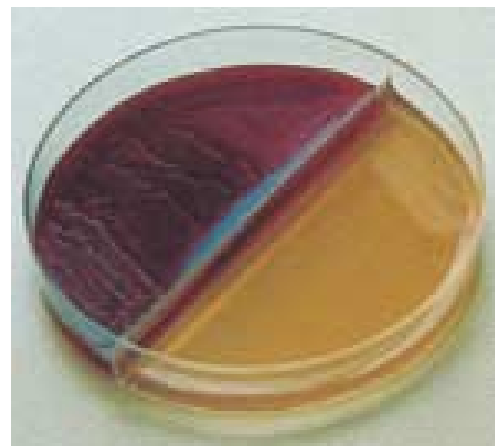
Οι κυριότεροι εκπρόσωποι του γένους *Proteus* είναι ο *Proteus mirabilis* και ο *Proteus vulgaris*.

**I. ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ - ΧΡΩΣΗ**

Είναι Gram αρνητικά βακτηρίδια, κινητά, περίτριχα, με πολύ μακριές βλεφαρίδες.

**II. ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ**

Αναπτύσσονται σε όλα τα κοινά θρεπτικά υλικά, σε αερόβιες συνθήκες, με άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης τους 37° C. Απλώνονται σε όλη την επιφάνεια του τρυβλίου, το οποίο περιέχει αιματούχο και θρεπτικό άγαρ, παρουσιάζοντας έτσι το φαινόμενο του ερπυσμού.

Εικόνα 5.4: *Proteus***III. ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ**

Οι σπουδαιότερες βιοχημικές τους ιδιότητες είναι:

- Ζυμώνουν τη γλυκόζη και παράγουν αέριο.
- Δε ζυμώνουν τη λακτόζη και δίνουν άχρωμες αποικίες στο Mac Conkey άγαρ.
- Παράγουν το ένζυμο ουρεάση που υδρολύει την ουρία.
- Παράγουν υδρόθειο.
- Χαρακτηριστική ιδιότητά τους είναι η απαμίνωση της φαινυλαλανίνης (PPA). Παρατηρείται μόνο στο γένος *Proteus* από όλα τα Εντεροβακτηριακά.
- Ο *P. vulgaris* παράγει ινδόλη από την οξείδωση της τρυπτοφάνης.



## Κεφάλαιο 5<sup>ο</sup> *Enterobacteriaceae* (Εντεροβακτηριακά)

	Ιδιότητες	<i>P.mirabilis</i>	<i>P.vulgaris</i>
<b>Ζύμωση</b>	Γλυκόζη	+ (με αέριο)	+(με αέριο)
	Λακτόζη	-	-
<b>Παραγωγή</b>	Ουρεάση	+	+
	H <sub>2</sub> S	+	+
<b>Δοκιμασία</b>	Ινδόλη	-	+
	Κιτρικά	-	-
<b>Απαμίνωση</b>	Φαινυλαανίνης	+	+

Πίνακας 5.5: Βιοχημικές ιδιότητες των *P.mirabilis* και *P.vulgaris*

### IV. ΠΑΘΟΓΟΝΟΣ ΔΡΑΣΗ

Το γένος *Proteus* προκαλεί:

- Ουρολοιμώξεις κυρίως μετά από καθετηριασμό ή κυστεοσκόπηση.
- Μολύνσεις εγκαυμάτων.
- Διαπυήσεις τραυμάτων.
- Νεογνική μηνιγγίτιδα.

### V. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ

Είναι από τα πιο συχνά βακτήρια του περιβάλλοντος και του ανθρώπου. Αποικίζουν συχνά το έντερο και την περιγεννητική περιοχή.

### VI. ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ

Γίνεται με:

- Εμβολιασμό του δείγματος σε αιματούχο και Mac Conkey άγαρ. Το δείγμα συνήθως είναι ούρα, πύο, αίμα, υγρά κατακλίσεων, εγκαυμάτων κ.ά.
- Ανάγνωση των καλλιεργειών μετά από 24ωρη επώαση και χρώση κατά Gram ξηρών παρασκευασμάτων από τις αποικίες που αναπτύχθηκαν.
- Ταυτοποίηση με ειδικές βιοχημικές δοκιμασίες.
- Δοκιμή ευαισθησίας στα αντιβιοτικά.

### VII. ΘΕΡΑΠΕΙΑ

Παρουσιάζουν μεγάλες διαφορές ως προς την ευαισθησία τους στα αντιβιοτικά. Περισσότερο ευαίσθητα είναι τα στελέχη του *P. mirabilis*. Είναι βακτήρια ευαίσθητα στις αμινογλυκοσίδες.

Α  
Π  
Ρ  
Η  
Τ  
Κ  
Α  
Β

<b>ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ</b>	<i>E. coli</i>	<i>Shigella</i>	<i>Salmonella</i>	<i>S. typhi</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>P. mirabilis</i>	<i>P. vulgaris</i>
<b>Ζύμωση</b>							
Γλυκόζη	+	+	+	+	+	+	+
	(με αέριο)	(χωρίς αέριο)	(με αέριο)	(χωρίς αέριο)	(με αέριο)	(με αέριο)	(με αέριο)
Λακτόζη	+	-	-	-	+	-	-
<b>Παραγωγή</b>							
Ουρεάση	-	-	-	-	+	+	+
H <sub>2</sub> S	-	-	+	+ (λίγο)	-	+	+
Καταλάση	+	+	+	+	+	+	+
Οξειδάση	-	-	-	-	-	-	-
<b>Δοκιμασία</b>							
Ινδόλη	+	-	-	-	-	-	+
M.R.	+	+	+	+	-	+	+
V.P.	-	-	-	-	+	-	-
Κιτρικά	-	-	+	-	+	-	-
<b>Απαμίνωση</b>							
Φαινυλαανίνη	-	-	-	-	-	+	+
<b>Αναγωγή</b>							
Νιτρικά σε νιτρώδη	+	+	+	+	+	+	+

Πίνακας 5.6: Βιοχημικές ιδιότητες της οικογένειας *Enterobacteriaceae*

### Ανακεφαλαίωση

Τα βακτήρια της οικογένειας *Enterobacteriaceae* είναι Gram αρνητικά βακτηρίδια, άσπορα, κινητά ή ακίνητα. Αναπτύσσονται σε αερόβιες συνθήκες. Ζυμώνουν όλα τη γλυκόζη, με ή χωρίς παραγωγή αερίου, και, ανάλογα με το αν διασπούν ή όχι τη λακτόζη στο θρεπτικό υλικό Mac Conkey άγαρ, τα χωρίζουμε σε δύο ομάδες.

Η ταυτοποίησή τους γίνεται με διάφορες βιοχημικές μεθόδους, η κυριότερη από τις οποίες είναι η δοκιμασία IMViC.

Η *E.coli* είναι Gram αρνητικό βακτηρίδιο κινητό, με έλυτρο και ινίδια. Ζυμώνει τη λακτόζη. Είναι το συχνότερο αίτιο των ουρολοιμώξεων.

Το γένος *Shigella* περιλαμβάνει Gram αρνητικά βακτηρίδια, ακίνητα, χωρίς έλυτρο. Δε ζυμώνουν τη λακτόζη και παράγουν άχρωμες αποικίες. Παράγουν εξωτοξίνη που προκαλεί τη μικροβιακή δυσεντερία. Καλλιεργούνται σε ειδικά θρεπτικά υλικά.

Το γένος *Salmonella* περιλαμβάνει Gram αρνητικά βακτηρίδια, άσπορα, κινητά. Δε ζυμώνουν τη λακτόζη και παράγουν υδρόθειο. Διάγνωση της λοίμωξης μπορεί να γίνει με τη συγκολλητινοαντίδραση Widal. Προκαλούν εντερικές σαλμονελλώσεις, όπως τυφοειδή πυρετό, παράτυφους, τροφική δηλητηρίαση (από την εντεροτοξίνη που παράγουν) και εξωεντερικές σαλμονελλώσεις, όπως οστεομυελίτιδα, μηνιγγίτιδα, ουρολοιμώξεις κ.ά.

Η *K. pneumoniae* είναι Gram αρνητικό βακτηρίδιο, άσπορο, ακίνητο, με έλυτρο. Ζυμώνει τη λακτόζη και παράγει χαρακτηριστικές ροζ, βλεννώδεις αποικίες. Είναι ευκαιριακά παθογόνο και προκαλεί πνευμονία, μηνιγγίτιδα, ουρολοιμώξεις, νοσοκομειακές λοιμώξεις.

Το γένος *Proteus* περιλαμβάνει Gram αρνητικά βακτηρίδια, κινητά, περίτριχα. Εμφανίζουν χαρακτηριστικό ερπυσμό στο αιματούχο και θρεπτικό άγαρ. Δε ζυμώνουν τη λακτόζη, παράγουν ουρεάση και υδρόθειο. Χαρακτηριστική τους ιδιότητα είναι η απαμίνωση της φαινυλαλανίνης. Προκαλούν ουρολοιμώξεις, διαπυήσεις τραυμάτων κ.ά.

## Ερωτήσεις

1. Ποιες είναι οι κυριότερες βιοχημικές ιδιότητες της οικογένειας *Enterobacteriaceae*;
2. Τι γνωρίζετε για τη δοκιμασία IMViC;
3. Ποιες ασθένειες προκαλεί η *E. coli*;
4. Τι γνωρίζετε για τη μικροβιακή δυσεντερία;
5. Ποια είναι τα κυριότερα είδη του γένους *Salmonella*;
6. Ποια βακτήρια της οικογένειας *Enterobacteriaceae* παράγουν υδρόθειο;
7. Που οφείλεται η τροφική δηλητηρίαση από είδη του γένους *Salmonella* και ποιά τρόφιμα την προκαλούν;
8. Τι γνωρίζετε για τον τυφοειδή πυρετό;
9. Ποιες είναι οι εντερικές ασθένειες από τα είδη του γένους *Salmonella*;
10. Ποιες είναι οι εξωεντερικές ασθένειες από τα είδη του γένους *Salmonella*;
11. Περιγράψτε τις αποικίες της *K. pneumoniae*. Ποιες ασθένειες προκαλεί;
12. Περιγράψτε τις αποικίες των ειδών του γένους *Proteus*. Ποια είναι η χαρακτηριστική τους ιδιότητα ;

# Κεφάλαιο 6<sup>ο</sup> *Mycobacteria* (Μυκοβακτηρίδια)

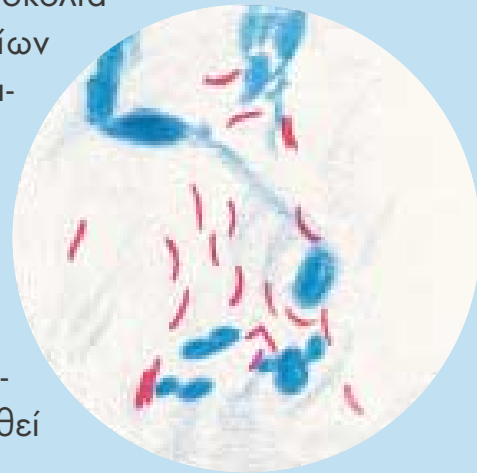
## 6.1. Γενικά - Είδη

Το γένος *Mycobacteria* περιλαμβάνει Gram θετικά, λεπτά, άσπορα, ακίνητα, αερόβια βακτηρίδια. Ταξινομούνται σε ομάδες με βάση την αργή ή γρήγορη ανάπτυξή τους. Ένα ιδιαίτερο χαρακτηριστικό τους είναι το πλήθος των λιπιδίων που βρίσκονται στο κυτταρικό τους τοίχωμα και στο κυτταρόπλασμα.

## 6.2. *Mycobacterium tuberculosis* (Μυκοβακτηρίδιο της φυματίωσης)

### I. ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ - ΧΡΩΣΗ

Το *M. tuberculosis* είναι λεπτό και ίσιο βακτηρίδιο, αν και μερικές φορές εμφανίζει κάμψη. Είναι ακίνητο, άσπορο, αερόβιο, οξεάντοχο. Τα κύτταρά του διατάσσονται σε ζεύγη παράλληλα το ένα προς το άλλο ή σε μικρούς σωρούς. Είναι Gram θετικό βακτηρίδιο, η χρώση του όμως είναι πολύ δύσκολη. Η δυσκολία οφείλεται στην ύπαρξη πολλών λιπιδίων στο κυτταρικό του τοίχωμα, που καθιστούν την επιφάνειά του υδρόφοβη. Μόνο εάν θερμανθεί το μικροβιακό κύτταρο, εισέρχονται χρωστικές στο κυτταρόπλασμα. Η ειδική χρώση που χρησιμοποιείται είναι η χρώση Ziehl-Neelsen, η οποία το χρωματίζει κόκκινο. Δεν αποχρωματίζεται, όταν προστεθεί στο παρασκεύασμα αιθυλική αλκοόλη που περιέχει HCl 3%. Ακριβώς γι' αυτόν το λόγο, επειδή δηλαδή δεν αποχρωματίζεται με οξέα και αλκοόλη, χαρακτηρίζεται ως οξεάντοχο και αλκοολάντοχο βακτηρίδιο.



Σχήμα 6.1:  
*Mycobacterium tuberculosis*  
με οξεάντοχη χρώση

### II. ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ

Το *M. tuberculosis* αναπτύσσεται σε αερόβιες συνθήκες και η ανάπτυξή του ευνοείται σε ατμόσφαιρα CO<sub>2</sub> 10%. Έχει άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης τους 37°C. Δεν αναπτύσσεται στα συνηθισμέ-

Α  
Ι  
Ρ  
Η  
Τ  
Η  
Κ  
Τ  
Α  
Β

να εμπλουτισμένα ή εκλεκτικά θρεπτικά υλικά του εργαστηρίου, αλλά σε ειδικά θρεπτικά υλικά που περιέχουν ζωικό λεύκωμα. Τέτοιο υλικό είναι το Löwenstein-Jensen, το οποίο φέρεται σε λοξή θέση μέσα σε σωληνάρια που κλείνουν με κοχλιωτό ή ελαστικό πώμα.

Το *M. tuberculosis* αναπτύσσεται με αργό ρυθμό. Το υλικό ελέγχεται για την ανάπτυξη του βακτηριδίου κάθε εβδομάδα και για έξι συνολικά εβδομάδες. Οι αποικίες του στο Löwenstein-Jensen είναι μικρές, ξηρές, υποκίτρινες με ρυτιδώδη επιφάνεια και ανώμαλη περιφέρεια.



Εικόνα 6.1: Αποικίες *M. Tuberculosis* σε θρεπτικό υλικό Löwenstein-Jensen,

**III. ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ**

Οι πιο χαρακτηριστικές ιδιότητες του *M. tuberculosis* είναι η παραγωγή νιασίνης, η αναγωγή νιτρικών αλάτων και η μη παραγωγή καταλάσης στους 68°C.

Όλα τα είδη του γένους *Mycobacteria* παράγουν καταλάση. Στο *M. tuberculosis* δεν παρατηρείται παραγωγή καταλάσης μετά από θέρμανση των αποικιών στους 68°C για 20 min.

Η παραγωγή νιασίνης, όπως και το αρνητικό αποτέλεσμα στη δοκιμασία παραγωγής καταλάσης στους 68°C, αρκούν, για την ταυτοποίηση του *M. tuberculosis* στο εργαστήριο.

	Παραγωγή		Αναγωγή
	Νιασίνη	Καταλάση 68°C	Νιτρικά σε νιτρώδη
<i>M. tuberculosis</i>	+	-	+

Πίνακας 6.1: Βιοχημικές ιδιότητες του *M. tuberculosis*

**IV. ΑΝΤΙΓΟΝΙΚΗ ΣΥΣΤΑΣΗ - ΤΟΞΙΚΕΣ ΟΥΣΙΕΣ**

Το κυτταρικό τοίχωμα του γένους *Mycobacteria* αποτελείται από πολλά λιπίδια. Η κυτταρική μεμβράνη του *M. tuberculosis* περιβάλλεται από:

- Λεπτό στρώμα πεπτιδογλυκάνης.

## Κεφάλαιο 6<sup>ο</sup> *Mycobacteria* (Μυκοβακτηρίδια)

- Στρώμα από γλυκίδια, πρωτεΐνες, γλυκερίνη και ένζυμα.
- Ένα παχύ λιπιδικό στρώμα πάνω από αυτά, το οποίο αποτελείται από μυκολικό οξύ (στην ύπαρξη του μυκολικού οξέος οφείλεται η οξείαντοχή του).
- Στρώμα βλεννοπρωτεϊδών εξωτερικά.

Κατά τη νόσο αναπτύσσονται αντισώματα προς όλα τα αντιγόνα του κυτταρικού τοιχώματος, τα οποία όμως δεν προφυλάσσουν από αυτήν.

### V. ΠΑΘΟΓΟΝΟΣ ΔΡΑΣΗ

Το *M. tuberculosis* προκαλεί τη νόσο φυματίωση. Η δράση του αποδίδεται στο ότι επιζεί στα φαγοκύτταρα για μεγάλο χρονικό διάστημα. Η πρώτη μόλυνση με το βακτηρίδιο προκαλεί φλεγμονή στον πνεύμονα και ακολουθεί η προσβολή των πυλαίων λεμφαδένων. Η φλεγμονή του πνεύμονα μαζί με την προσβολή των λεμφαδένων ονομάζεται «πρωτοπαθές σύμπλεγμα». Συνήθως η πρωτολοίμωξη αυτοθεραπεύεται και το άτομο απλώς εμφανίζει θετική φυματινοαντίδραση Μαντουχ. Σε ορισμένες περιπτώσεις ακολουθεί αιματογενής διασπορά και εγκατάσταση του *M. tuberculosis* στις μνιγγες, στα οστά, στους νεφρούς ή σε άλλα όργανα.

Αναζωπύρωση της νόσου μπορεί να γίνει μετά από χρόνια, επειδή μερικά βακτήρια παραμένουν ζωντανά. Ένα πολύ μεγάλο ποσοστό των δευτερογενών λοιμώξεων (75%) οφείλεται σε αναζωπύρωση της αρχικής μόλυνσης.

Η φυματίωση προσβάλλει κυρίως τις φτωχότερες ομάδες του πληθυσμού στις υπό ανάπτυξη χώρες. Μετά από μια εντυπωσιακή μείωση, τα τελευταία χρόνια παρατηρείται αύξηση των κρουσμάτων, η οποία συμπίπτει με την αύξηση των κρουσμάτων του AIDS.

### VI. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ

Ο άνθρωπος μολύνεται από το *M. tuberculosis* συνήθως στην παιδική ηλικία με όλους τους τρόπους άμεσης ή έμμεσης μετάδοσης. Ο πιο συνηθισμένος τρόπος μετάδοσης είναι με τα σταγονίδια από το βήχα ή την ομιλία.

### VII. ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ

Γίνεται με:

- Μικροσκοπική εξέταση άμεσων παρασκευασμάτων χρωματι-



σμένων με τη χρώση *Ziehl - Neelsen*. Αν το δείγμα προέρχεται από υλικό χωρίς φυσιολογική χλωρίδα (π.χ. ΕΝΥ) και παρατηρηθεί στη μικροσκοπική εξέταση ύπαρξη οξεάντοχων βακτηριδίων, δίνεται θετική απάντηση, χωρίς να περιμένουμε το αποτέλεσμα της καλλιέργειας. Αν το δείγμα προέρχεται από περιοχή με φυσιολογική χλωρίδα, περιμένουμε το αποτέλεσμα της καλλιέργειας, για να δώσουμε απάντηση, γιατί υπάρχουν σαπροφυτικά Μυκοβακτηρίδια και Ακτινομύκητες με την ίδια μικροσκοπική εικόνα.

- Καλλιέργεια του δείγματος σε ειδικά θρεπτικά υλικά και επώαση 40 ημερών περίπου. Το δείγμα που συνήθως εξετάζεται είναι πτύελα, ούρα και εγκεφαλονωτιαίο υγρό.
- Μακροσκοπική και μικροσκοπική μελέτη των ύποπτων αποικιών.
- Οι ύποπτες αποικίες ελέγχονται για την παραγωγή νιασίνης, την παραγωγή νιτρικών και την παραγωγή θερμοανθεκτικής καταλάσης στους 68<sup>ο</sup> C.

Πριν από την καλλιέργεια, δείγματα τα οποία έχουν φυσιολογική χλωρίδα (π.χ. πτύελα) επεξεργάζονται με διάφορες μεθόδους από τις οποίες η πιο συνηθισμένη είναι η μέθοδος Petroff.

Τα στάδια της μεθόδου αυτής είναι τα παρακάτω:

- Τοποθετούμε ποσότητα από βλεννοπυώδη πτύελα σε σωληνάριο, προσθέτουμε τριπλάσια ποσότητα διαλύματος NaOH 4% και αναμειγνύουμε.
- Τοποθετούμε το σωληνάριο για επώαση σε κλίβανο 37<sup>ο</sup>C για 30 min.
- Φυγοκεντρούμε στις 2000-3000 στροφές για 10 min.
- Αφαιρούμε το υπερκείμενο υγρό και προσθέτουμε στο ίζημα διάλυμα HCl 8%, για να εξουδετερώσουμε την αλκαλική αντίδραση.
- Στρώνουμε από το ίζημα επιχρίσματα τα οποία χρωματίζουμε με χρώση Ziehl-Neelsen και εμβολιάζουμε τα κατάλληλα υλικά για την καλλιέργεια.

Υπάρχουν σήμερα ταχύτερες μέθοδοι ρευστοποίησης και χρωματισμού κατά Ziehl-Neelsen χωρίς τη χρησιμοποίηση φλόγας (cold stain).



# Κεφάλαιο 6<sup>ο</sup> *Mycobacteria* (Μυκοβακτηρίδια)

## VIII. ΠΡΟΦΥΛΑΞΗ

Για προληπτικούς λόγους γίνεται το εμβόλιο BCG. Εμβολιάζονται τα βρέφη και τα παιδιά, όταν υπάρχει άρρωστος από φυματίωση στην οικογένεια. Προηγείται έλεγχος με τη φυματινοαντίδραση Μαντουχ, που γίνεται με ενδοδερμική ένεση φυματίνης στο βραχίονα. Η φυματίνη είναι ένα πολυσακχαρίδιο ενωμένο με θερμοανθεκτικές πρωτεΐνες, ο οποίες παραλαμβάνονται από το διήθημα καλλιέργηματος του *M. tuberculosis* σε υγρό θρεπτικό υλικό.

Σε θετική αντίδραση εμφανίζεται σκλήρυνση του δέρματος με διάμετρο τουλάχιστον 10mm μετά από 48-72 ώρες. Η θετική αντίδραση Μαντουχ δείχνει ότι το άτομο έχει έρθει σε επαφή με το *M. tuberculosis*. Σε περίπτωση αρνητικού αποτελέσματος γίνεται εμβολιασμός.

## 6.3. *Mycobacterium leprae* ( Μυκοβακτηρίδιο της λέπρας)

### I. ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ-ΧΡΩΣΗ

Το *M. leprae* είναι οξεάντοχο και αλκοολάντοχο βακτηρίδιο και έχει την ίδια μορφολογία με το *M. tuberculosis*.

### II. ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ

Χαρακτηριστικό του *M. leprae* είναι ότι μέχρι σήμερα δεν έχει γίνει δυνατή η καλλιέργειά του σε τεχνητά θρεπτικά υλικά.

### III. ΠΑΘΟΓΟΝΟΣ ΔΡΑΣΗ

Το *M. leprae* προκαλεί στον άνθρωπο τη λέπρα, η οποία είναι χρόνια νόσος.

Η νόσος εμφανίζεται με δύο κλινικές μορφές, τη φυματώδη και τη λεπροματώδη λέπρα.

Στη φυματώδη λέπρα εμφανίζονται οζίδια στο δέρμα ή μεγάλες επίπεδες πλάκες στο πρόσωπο, στα άκρα και στον κορμό, που ξεχωρίζουν σαφώς από το υγιές δέρμα. Είναι η καλοήθης μορφή της λέπρας, που μερικές φορές αυτοθεραπεύεται, δεν είναι μεταδοτική και δεν αναγνωρίζεται εύκολα.

Στη λεπροματώδη λέπρα υπάρχουν εκτεταμένες και διεισδυτικές δερματικές βλάβες στο πρόσωπο, όπως η καθίζηση της μύτης λόγω



απώλειας των ρινικών οστών και χόνδρων.

Επιπλέον και στις δύο μορφές της νόσου προσβάλλονται τα περιφερικά νεύρα, με αποτέλεσμα την απώλεια της αίσθησης του πόνου και της θερμότητας.

#### IV. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ

Πηγή του *M. leprae* είναι ο πάσχων άνθρωπος, από τα εκκρίματα του οποίου μεταδίδεται η νόσος. Η επιβίωσή του ευνοείται από τις χαμηλές θερμοκρασίες και αυτό δικαιολογεί την εντόπιση των λεπρικών βλαβών κατά προτίμηση στο δέρμα του προσώπου και των άκρων.

Η μολυσματικότητα του *M. leprae* αποδείχτηκε στατιστικά ότι είναι μικρή, ενώ ο χρόνος επώασης μεγάλος. Όταν εκδηλώνεται ως φυματώδης λέπρα, θεραπεύεται ή τουλάχιστον ελέγχεται. Για τους λόγους αυτούς καταργήθηκε το απάνθρωπο μεσαιωνικό σύστημα απομόνωσης των ασθενών στα λεπροκομεία, όπως στη Σπιναλόγκα. Μόνο οι πάσχοντες από βαριές επιπλοκές λεπροματώδους λέπρας νοσηλεύονται σε ειδικά νοσοκομεία.

#### V. ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ

Η εργαστηριακή διάγνωση γίνεται με την αναζήτηση οξεάντοχων βακτηριδίων σε άμεσα παρασκευάσματα χρωματισμένα με τη χρώση Ziehl-Neelsen. Το δείγμα μπορεί να προέρχεται από ξέσματα του βλεννογόνου της μύτης, από τις αλλοιώσεις του δέρματος ή από μια σταγόνα αίματος από το λοβίο του αυτιού.

#### VI. ΠΡΟΦΥΛΑΞΗ

Για προληπτικούς λόγους υπάρχει εμβόλιο το οποίο γίνεται συγχρόνως με το BCG, επειδή παρατηρήθηκε ότι οι εμβολιασμένοι με το BCG παρουσιάζουν αντοχή στη λοίμωξη από λέπρα.

Οι τελευταίες έρευνες της Παγκόσμιας Οργάνωσης Υγείας (ΠΟΥ) αυξάνουν τις ελπίδες ότι θα μειωθεί ο αριθμός των λεπρών και η νόσος θα μπει κάτω από τον έλεγχο των υγειονομικών αρχών.

### Ανακεφαλαίωση

Το *M. tuberculosis* είναι λεπτό, ίσιο βακτηρίδιο, αν και μερικές φορές εμφανίζει κάμψη. Με τη χρώση Ziehl - Neelsen χρωματίζεται κόκκινο και τα κύτταρά του διατάσσονται σε ζεύγη παράλληλα το ένα προς το άλλο ή σε μικρούς σωρούς. Ο χρωματισμός του είναι δύσκολος λόγω της ύπαρξης πολλών λιπιδίων και ιδιαίτερα του μυκολικού οξέος. Μόνο αν θερμανθεί το μικροβιακό κύτταρο, εισέρχονται οι χρωστικές στο κυτταρόπλασμα. Δεν αποχρωματίζεται με την προσθήκη αιθυλικής αλκοόλης που περιέχει HCl 3% και γι' αυτό θεωρείται οξεάντοχο και αλκοολάντοχο βακτηρίδιο.

Το *M. tuberculosis* αναπτύσσεται σε αερόβιες συνθήκες και καλλιεργείται σε ειδικά θρεπτικά υλικά που περιέχουν ζωικό λεύκωμα, όπως το Löwenstein - Jensen.

Η παραγωγή νιασίνης, όπως και το αρνητικό αποτέλεσμα στη δοκιμασία παραγωγής καταλάσης στους 68°C, αρκούν για την ταυτοποίηση του *M. tuberculosis* στο εργαστήριο.

Προκαλεί τη νόσο φυματίωση. Η φυματίνη, η οποία παραλαμβάνεται από το διήθημα του καλλιεργήματος του *M. tuberculosis*, χρησιμοποιείται για την εκτέλεση της φυματινοαντίδρασης Μαντουχ. Με αυτήν ελέγχουμε αν κάποιο άτομο έχει μολυνθεί στο παρελθόν από το *M. tuberculosis*.

Το *M. leprae* προκαλεί στον άνθρωπο τη νόσο λέπρα. Μέχρι σήμερα δεν έχει γίνει δυνατή η καλλιέργειά του σε τεχνητά θρεπτικά υλικά. Πηγή είναι ο πάσχων άνθρωπος. Η νόσος μπορεί να εμφανιστεί με δύο μορφές, τη φυματώδη και τη λεπροματώδη λέπρα. Η εργαστηριακή διάγνωση γίνεται με την αναζήτηση οξεάντοχων βακτηριδίων σε άμεσα παρασκευάσματα χρωματισμένα με χρώση Ziehl - Neelsen.

## Ερωτήσεις

1. Ποια είναι η μικροσκοπική εικόνα του *M. tuberculosis*;
2. Γιατί το *M. tuberculosis* χαρακτηρίζεται οξεάντοχο και αλκοολάντοχο βακτήριο;
3. Ποιες είναι οι σπουδαιότερες βιοχημικές ιδιότητες του *M. tuberculosis*;
4. Ποια είναι η πορεία της εργαστηριακής διάγνωσης του *M. tuberculosis*;
5. Με ποιες κλινικές μορφές εμφανίζεται η λέπρα στον άνθρωπο και ποια τα βασικά χαρακτηριστικά τους;
6. Πώς γίνεται η εργαστηριακή διάγνωση του *M. leprae*;

## Κεφάλαιο 7<sup>ο</sup> *Corynebacteriae* (Κορυνοβακτηρίδια)

### 7.1. Γενικά - είδη

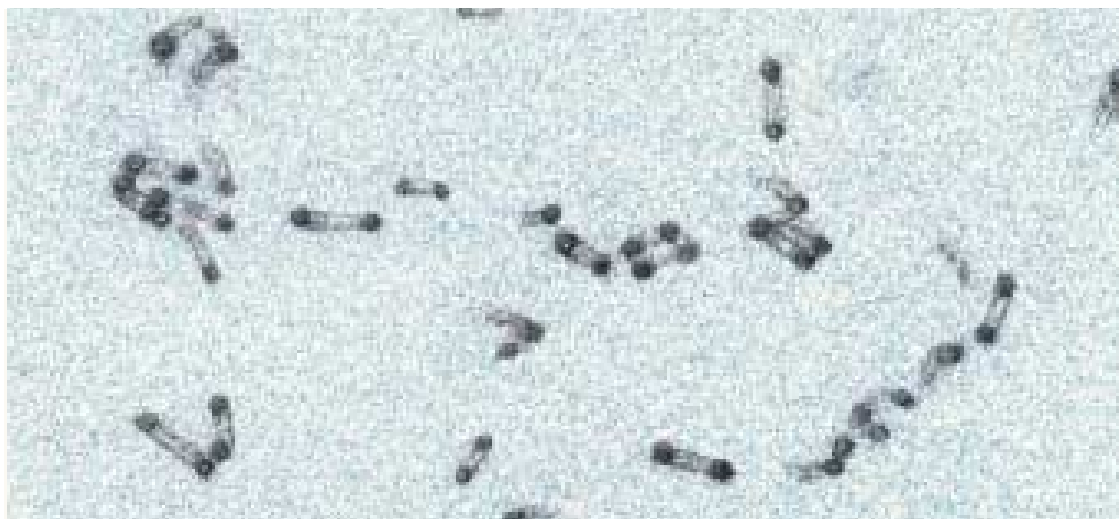
Είναι Gram θετικά βακτηρίδια, ίσια ή με ελαφρά κάμψη, με διόγκωση στο ένα άκρο ή στη μέση. Είναι αερόβια και μικροαερόφιλα, ακίνητα, δεν έχουν βλεφαρίδες και δε σχηματίζουν έλυτρο ή σπόρους. Παράγουν καταλάση και μερικά είδη παράγουν εξωτοξίνες.

Στο γένος *Corynebacterium* κατατάσσονται πολλά βακτήρια που αποικίζουν το σώμα ζώων και ανθρώπων. Παθογόνο για τον άνθρωπο είναι το *Corynebacterium diphtheriae*.

### 7.2. *Corynebacterium diphtheriae* (Κορυνοβακτηρίδιο της διφθερίτιδας)

#### I. ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ - ΧΡΩΣΗ

Το *C. diphtheriae* είναι Gram θετικό βακτηρίδιο, λεπτό, με ελαφρά κάμψη, διογκωμένο στο ένα άκρο ή στη μέση ή και στα δύο άκρα. Διατάσσεται σε ζεύγη ή σε σχηματισμούς σαν L ή V και, όταν είναι πολλά μαζί, μοιάζουν με κινέζικα γράμματα. Το χαρακτηριστικό στη μορφολογία των κυττάρων του είναι τα αλλόχρωμα κοκκία ή κοκκία βολουτίνης στο κυτταρόπλασμά τους, τα οποία χρωματίζονται διαφορετικά από το υπόλοιπο κύτταρο, όταν χρησιμοποιούνται ειδικές χρώσεις (Neisser ή Albert), και βρίσκονται κυρίως στους πόλους του κυττάρου.



Σχήμα 7.1: *Corynebacterium diphtheriae*

## II. ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ

Δεν αναπτύσσεται εύκολα σε κοινά θρεπτικά υλικά. Αναπτύσσεται στο αιματούχο άγαρ και γενικά σε θρεπτικά υλικά με αίμα ή ορό, σε αερόβιες συνθήκες, σε θερμοκρασία 37° C, για 24 ώρες. Για την απομόνωσή του χρησιμοποιούμε το ειδικό θρεπτικό υλικό Loeffler, που επιτρέπει τη γρήγορη ανάπτυξή του.

## III. ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ

Οι βασικές βιοχημικές ιδιότητες του *C. diphtheriae* είναι:

- Παράγει καταλάση.
- Διασπά αερόβια τη γλυκόζη και μαλτόζη με παραγωγή οξέος.
- Δε διασπά τη σουκρόζη και τη λακτόζη.
- Δεν παράγει ουρεάση και δε διασπά την ουρία.
- Ανάγει τα νιτρικά σε νιτρώδη.

	Ιδιότητες	<i>C. diphtheriae</i>
<b>Διάσπαση</b>	Γλυκόζη	+ (οξύ)
	Μαλτόζη	+ (οξύ)
	Σουκρόζη	-
	Λακτόζη	-
<b>Παραγωγή</b>	Ουρεάση	+
	Καταλάση	+
<b>Αναγωγή</b>	Νιτρικά σε νιτρώδη	+

Πίνακας 7.1: Βιοχημικές ιδιότητες του *C. diphtheriae*

## IV. ΑΝΤΙΓΟΝΙΚΗ ΣΥΣΤΑΣΗ

Παράγει τη διφθεριτική τοξίνη, η οποία έχει μεγάλη αντιγονική δύναμη. Με την επίδραση της φορμόλης χάνει την τοξικότητά της, διατηρεί όμως την αντιγονική της ικανότητα και μετατρέπεται σε ατοξίνη, η οποία χρησιμοποιείται ως εμβόλιο κατά της διφθερίτιδας.

## V. ΠΑΘΟΓΟΝΟΣ ΔΡΑΣΗ

Το *C. diphtheriae* προκαλεί τη διφθερίτιδα με τη δράση της τοξίνης του. Παραμένει στο σημείο της εισόδου του, που είναι συνήθως οι αμυγδαλές. Εκεί πολλαπλασιάζεται, παράγει τη διφθεριτική τοξίνη και προκαλεί τοπική φλεγμονή, με αποτέλεσμα να δημιουργεί μια ψευδομεμβράνη, τη διφθέρα, η οποία έχει βρώμικη όψη και ξεκολλάει δύσκολα. Η τοξίνη με την κυκλοφορία μεταφέρεται στο μυοκάρδιο και στο νευρικό ιστό και προκαλεί βλάβες.

## VI. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ

Το *C. diphtheriae* ζει στο φάρυγγα των φορέων. Μεταδίδεται κυρίως με τα σταγονίδια από τους πάσχοντες και τους φορείς. Σπανιότερα μεταδίδεται με αντικείμενα, μολυσμένο γάλα ή άλλες τροφές. Μετά τον εμβολιασμό όλων των παιδιών, η ασθένεια προσβάλλει στην εποχή μας εφήβους ή ενήλικες που έχασαν την ανοσία από το εμβόλιο. Τα κρούσματα προκαλούνται από την προσέλευση φορέων μεταναστών ή τουριστών από τις υπό ανάπτυξη χώρες.

## VII. ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ

Εξετάζεται το επίχρισμα, που παίρνουμε από τις διφθέρες της περιοχής που πάσχει. Οι εξετάσεις που γίνονται είναι:

- Μικροσκοπική εξέταση του επιχρίσματος του φάρυγγα:
  1. Με χρώση Gram, κατά την οποία διαπιστώνουμε ότι το *C. diphtheriae* είναι Gram θετικό βακτήριο με κάποιες περιοχές αρνητικές.
  2. Με ειδική χρώση Neisser, κατά την οποία παρατηρούμε τα αλλόχρωμα κοκκία.
- Καλλιέργεια στο ειδικό θρεπτικό υλικό Loeffler για την απομόνωσή του και σε αιματούχο άγαρ, για να αποκλείσουμε την πιθανότητα ύπαρξης στρεπτοκοκκικής αμυγδαλίτιδας.
- Μετά την απομόνωση γίνεται ταυτοποίηση με τις βιοχημικές δοκιμασίες και έλεγχος για την παραγωγή τοξίνης.
- Άμεσος ανοσοφθορισμός.

## VIII. ΠΡΟΦΥΛΑΞΗ

Γίνεται με εμβολιασμό κατά το πρώτο τρίμηνο της ζωής, μαζί με το εμβόλιο του κοκκύτη και του τετάνου, με τη μορφή τριπλού εμβολίου.

## IX. ΘΕΡΑΠΕΙΑ

Δίνεται αντιδιφθεριτικός ορός ή γ-σφαιρίνη, μόλις γίνει κλινική διάγνωση της διφθερίτιδας, χωρίς να περιμένουμε την απάντηση του εργαστηρίου. Παράλληλα χορηγούμε πενικιλίνη και ερυθρομυκίνη. Τα αντιβιοτικά, σκοτώνοντας το βακτήριο, ελαττώνουν το ποσό της τοξίνης που παράγεται και καταπολεμούν την μικροβιοφορία μετά την ανάρρωση. Επιβάλλεται απομόνωση των ασθενών σε ειδικές μονάδες.



## Ανακεφαλαίωση

Το σπουδαιότερο παθογόνο βακτήριο για τον άνθρωπο στο γένος *Corynebacterium* είναι το *C. diphtheriae*. Είναι Gram θετικό βακτηρίδιο, λεπτό, με ελαφρά κάμψη, διογκωμένο στο ένα άκρο ή στη μέση ή και στα δύο άκρα.

Αναπτύσσεται στο αιματούχο άγαρ και απομονώνεται στο ειδικό θρεπτικό υλικό Loeffler, σε αερόβιες συνθήκες, σε θερμοκρασία 37° C.

Παράγει καταλάση, διασπά αερόβια τη γλυκόζη και μαλτόζη, δε διασπά τη σουκρόζη και τη λακτόζη, δε διασπά την ουρία και ανάγει τα νιτρικά σε νιτρώδη.

Η διφθεριτική τοξίνη έχει μεγάλη αντιγονική δύναμη.

Το *C. diphtheriae* έχει συνήθως πύλη εισόδου του στον άνθρωπο τις αμυγδαλές, όπου και πολλαπλασιάζεται, παράγει την τοξίνη και προκαλεί τοπική φλεγμονή, με αποτέλεσμα να δημιουργεί μια ψευδομεμβράνη, τη διφθέρα, που έχει βρώμικη όψη και ξεκολλάει δύσκολα.

Μεταδίδεται κυρίως με τα σταγονίδια από τους ασθενείς και τους φορείς. Οι εξετάσεις που γίνονται για τη διάγνωση είναι η μικροσκοπική εξέταση, η καλλιέργεια στο ειδικό θρεπτικό υλικό Loeffler και σε αιματούχο άγαρ και η ταυτοποίηση με τις βιοχημικές δοκιμασίες.

Η προφύλαξη γίνεται με εμβολιασμό και η θεραπεία με χορήγηση αντιδιφθεριτικού ορού ή γ-σφαιρίνης και αντιβιοτικών.

## Ερωτήσεις

1. Με ποιες χρώσεις χρωματίζεται το *C. diphtheriae*;
2. Τι γνωρίζετε για τη μορφολογία του *C. diphtheriae*;
3. Σε ποια υλικά καλλιεργείται το *C. diphtheriae*;
4. Ποιες είναι οι βασικές βιοχημικές ιδιότητες του *C. diphtheriae*;
5. Τι είναι η διφθέρα και ποιες οι ιδιότητές της;



## Κεφάλαιο 8<sup>ο</sup> *Pseudomonas* (Ψευδομονάδες)

### 8.1. Γενικά - είδη

Στο γένος *Pseudomonas* ανήκουν πολλά είδη, τα οποία ζούν στο φυσικό περιβάλλον (νερό, χώμα, θάλασσα και αλλού) και είναι ευκαιριακά παθογόνα για τον άνθρωπο, τα ζώα και τα φυτά.

Είναι Gram αρνητικά βακτηρίδια, κινητά, με μια ή περισσότερες πολικές βλεφαρίδες, με σώμα ίσιο ή με ελαφρά κάμψη. Είναι αυστηρά αερόβια, δε διασπούν τη λακτόζη και παράγουν οξειδάση και καταλάση.

### 8.2. *Pseudomonas aeruginosa* (Ψευδομονάδα η πυοκυανική)

#### I. ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ - ΧΡΩΣΗ

Η *P. aeruginosa* είναι Gram αρνητικό βακτηρίδιο, κινητό, με μια βλεφαρίδα σε κάθε πόλο.

#### II. ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ

Αναπτύσσεται σε όλα τα κοινά θρεπτικά υλικά, μόνο σε αερόβιες συνθήκες, με άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης τους 37<sup>ο</sup> C. Στο αιματούχο άγαρ μερικά στελέχη προκαλούν αιμόλυση. Στο Mac Conkey άγαρ οι αποικίες είναι άχρωμες, γιατί δε διασπούν τη λακτόζη, γυαλιστερές, υδαρείς, με μεταλλική λάμψη. Από τις αποικίες διαχέεται στο θρεπτικό υλικό κυανοπράσινη χρωστική, η πυοκυανίνη, και στο άνοιγμα του τρυβλίου γίνεται αντιληπτή μια ευχάριστη αρωματική οσμή, όπως του γιασεμιού. Πολλά στελέχη παράγουν πρασινοκίτρινη χρωστική, τη φθορεσεΐνη, άλλα μια κοκκινωπή χρωστική, την πυορουμπίνη, και κάποια μια καστανόμαυρη χρωστική, την πυομελανίνη.



Εικόνα 8.1: *Pseudomonas aeruginosa*

### III. ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ

Οι βασικές βιοχημικές ιδιότητες της *P. aeruginosa* είναι:

- Παράγει καταλάση και οξειδάση.
- Δε ζυμώνει τη γλυκόζη, αλλά τη διασπά οξειδωτικά χωρίς παραγωγή αερίου.
- Δε διασπά τη λακτόζη και τα άλλα σάκχαρα και στο Mac Conkey άγαρ δίνει άχρωμες αποικίες.
- Αναπτύσσεται σε υλικά που έχουν ως μόνη πηγή άνθρακα το κιτρικό νάτριο.
- Δεν παράγει υδρόθειο.
- Υδρολύει την αργινίνη.
- Αναπτύσσεται στους 42<sup>ο</sup> C και έτσι διαφοροποιείται από τα άλλα είδη του γένους *Pseudomonas*.

	Ιδιότητες	<i>P. aeruginosa</i>
Διάσπαση	Γλυκόζη	+
	Λακτόζη	-
Ζύμωση	Γλυκόζη	-
Παραγωγή	Καταλάση	+
	Οξειδάση	+
	H <sub>2</sub> S	-
Υδρόλυση	Αργινίνη	+
Ανάπτυξη	Κιτρικό Νάτριο	+
	στους 42 <sup>ο</sup> C	+

Πίνακας 8.1: Βιοχημικές ιδιότητες της *P. aeruginosa*

### IV. ΑΝΤΙΓΟΝΙΚΗ ΣΥΣΤΑΣΗ

Διακρίνεται σε διάφορους ορολογικούς τύπους που καθορίζονται από το πολυσακχαριδικό αντιγόνο O, που είναι η ενδοτοξίνη. Η παθογένεια και η τοξικότητα των διαφόρων στελεχών της *P. aeruginosa* καθορίζονται από τις τοξίνες ενδοτοξίνη O, εξωτοξίνη A, εντεροτοξίνη, τις αιμολυσίνες, τις πρωτεάσες, τα ένζυμα, τις χρωστικές και την επιφανειακή βλέννα που παράγουν.

### V. ΠΑΘΟΓΟΝΟΣ ΔΡΑΣΗ

Λοιμώξεις από την *P. aeruginosa* παρατηρούνται σε ασθενείς με λευχαιμία, σε άτομα με εγκαύματα, σε νεογνά, σε ασθενείς που

## Κεφάλαιο 8<sup>ο</sup> *Pseudomonas* (Ψευδομονάδες)

παίρνουν ανοσοκατασταλτικά φάρμακα ή ακτινοβολούνται και σε άτομα που έχουν υποστεί σοβαρές χειρουργικές επεμβάσεις. Προκαλεί σηψαιμία, πνευμονία, μέση πυώδη ωτίτιδα, μηνιγγίτιδα, βαριά γαστρεντερίτιδα (κυρίως σε νεογνά), ουρολοιμώξεις σε ασθενείς με μόνιμο καθετήρα, διαπυήσεις τραυμάτων κ.ά.

### VI. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ

Η *P. aeruginosa* βρίσκεται στην εντερική χλωρίδα του 10% περίπου των ανθρώπων και στα υγρά μέρη του υγιούς δέρματος (μασχάλη και βουβωνική χώρα). Βρίσκεται επίσης στα λύματα, στα σκεύη, στα διάφορα αντικείμενα, στο δάπεδο των νοσοκομείων, ακόμα και στα αντισηπτικά διαλύματα. Επιμολύνει εγκαύματα, τραύματα, έλκη. Μαζί με τους Σταφυλόκοκκους είναι το συχνότερο αίτιο των νοσοκομειακών λοιμώξεων.

### VII. ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ

Γίνεται με:

- Εμβολιασμό του δείγματος σε αιματούχο και Mac Conkey άγαρ. Το δείγμα μπορεί είναι ούρα, επιχρίσματα, πτύελα, υγρά παρακεντήσεων κ.ά.
- Ανάγνωση της καλλιέργειας μετά από 24ωρη επώαση και χρώση κατά Gram των ξηρών παρασκευασμάτων από τις αποικίες που αναπτύχθηκαν.
- Ταυτοποίηση με ειδικές βιοχημικές δοκιμασίες. Η παραγωγή πυοκυανίνης είναι ένδειξη ανάπτυξης της *P. aeruginosa* και επιβεβαιώνεται με βιοχημικές δοκιμές, όπως τη δοκιμή οξειδάσης, για να ταυτοποιήσουμε τις ψευδομονάδες που δεν παράγουν χρωστική, τον έλεγχο κινητικότητας κ.ά.
- Δοκιμή ευαισθησίας στα αντιβιοτικά.

### VIII. ΘΕΡΑΠΕΙΑ

Η θεραπεία θα γίνει με βάση το αντιβιογράμμα. Η *P. aeruginosa* είναι ευαίσθητη στις αμινογλυκοσίδες και στα νεότερα ειδικά αντιψευδομοναδικά αντιβιοτικά. Από τις κεφαλοσπορίνες η πιο δραστήρια είναι η κεφταζινίμη.



## Ανακεφαλαίωση

Η *P. aeruginosa* είναι Gram αρνητικό βακτηρίδιο, κινητό, με μια βλεφαρίδα σε κάθε πόλο. Αναπτύσσεται σε όλα τα κοινά θρεπτικά υλικά, μόνο σε αερόβιες συνθήκες, με άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης τους 37<sup>ο</sup> C. Διαφοροποιείται από τα άλλα είδη του γένους *Pseudomonas*, επειδή μπορεί και αναπτύσσεται και στους 42<sup>ο</sup> C.

Διακρίνεται σε διάφορους ορολογικούς τύπους που καθορίζονται από το πολυσακχαριδικό αντιγόνο O. Προκαλεί σηψαιμία, πνευμονία, μέση πυώδη ωτίτιδα, μπνιγγίτιδα, βαριά γαστρεντερίτιδα (κυρίως σε νεογνά), ουρολοιμώξεις σε ασθενείς με μόνιμο καθετήρα, διαπυήσεις τραυμάτων.

Βρίσκεται στην εντερική χλωρίδα του 10% περίπου των ανθρώπων, στα λύματα, στα σκεύη, στα διάφορα αντικείμενα, στο δάπεδο των νοσοκομείων, ακόμα και στα αντισηπτικά διαλύματα. Μαζί με τους Σταφυλόκοκκους είναι το συχνότερο αίτιο των νοσοκομειακών λοιμώξεων.

Η εργαστηριακή διάγνωση γίνεται κυρίως με καλλιέργεια σε αιματούχο και Mac Conkey άγαρ, με τη δοκιμή οξειδάσης, με τον έλεγχο κινητικότητας κ.τ.λ.

Η *P. aeruginosa* είναι ευαίσθητη στις αμινογλυκοσίδες και στα νεότερα ειδικά αντιψευδομοναδικά αντιβιοτικά.

## Ερωτήσεις

1. Τι γνωρίζετε για την καλλιέργεια της *P. aeruginosa*;
2. Ποιες είναι οι βασικές βιοχημικές ιδιότητες της *P. aeruginosa*;
3. Ποιοι παράγοντες καθορίζουν την παθογένεια και την τοξικότητα των διαφόρων στελεχών της *P. aeruginosa*;
4. Τι γνωρίζετε για την παθογόνο δράση και την επιδημιολογία της *P. aeruginosa*;

## 9.1. Γενικά - είδη

Το γένος *Treponema* είναι ένα από τα γένη της οικογένειας των *Spirochetaceae*.

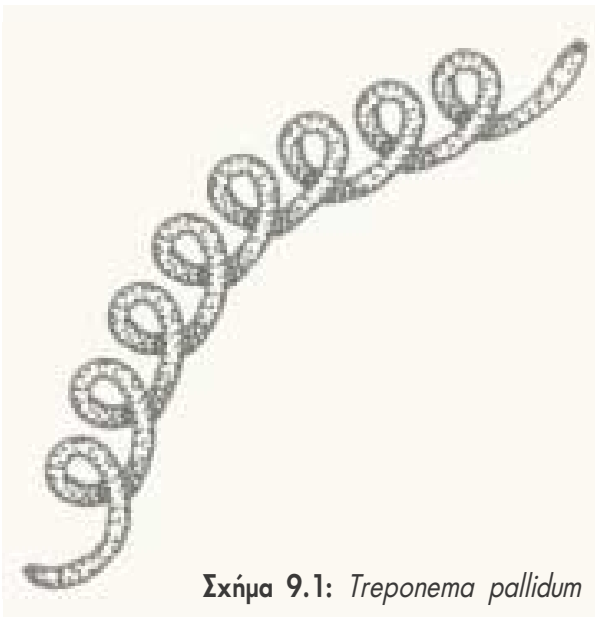
**Στα αναερόβια** βακτήρια του γένους *Treponema* ανήκουν διάφορα είδη που βρίσκονται στη φυσιολογική χλωρίδα του στόματος και των γεννητικών οργάνων του ανθρώπου και τα οποία σπάνια είναι παθογόνα. Χρωματίζονται με τη χρώση Giemsa και καλλιεργούνται σε υγρά ή στερεά θρεπτικά υλικά σε αναερόβιες συνθήκες.

**Στα αερόβια** βακτήρια του γένους *Treponema* ανήκουν 4 είδη παθογόνα για τον άνθρωπο με κοινά χαρακτηριστικά. Το κυριότερο είναι το *Treponema pallidum* (ωχρή Σπειροχαίτη).

## 9.2. *Treponema pallidum* (ωχρή Σπειροχαίτη)

### I. ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ - ΧΡΩΣΗ

Το *T. pallidum* είναι σπειροειδές βακτήριο με 6-12 κανονικές σπείρες. Περιβάλλεται από ινίδια, στα οποία οφείλεται η ελικοειδής γύρω από τον άξονά του κίνηση που το χαρακτηρίζει. Δε χρωματίζεται με τη χρώση Gram αλλά με τη βραδεία Giemsa, με τη μέθοδο Fontana και άλλες ειδικές χρώσεις. Μπορούμε να το δούμε σε πρόσφατα νωπά παρασκευάσματα με μικροσκόπηση σε σκοτεινό πεδίο. Πολλαπλασιάζεται με εγκάρσια διχοτόμηση.



Σχήμα 9.1: *Treponema pallidum*

### II. ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ

Δεν καλλιεργείται σε κανένα θρεπτικό υλικό και καταστρέφεται πολύ γρήγορα έξω από τον οργανισμό σε ξηρό περιβάλλον. Ζει όμως 24 ώρες στο αίμα του ανθρώπου, πράγμα που έχει σημασία για τις μεταγίσεις πρόσφατου αίματος. Μπορεί επίσης να ζήσει λίγες ημέρες κάτω από αναερόβιες συνθήκες σε υγρό περιβάλλον.

### III. ΠΑΘΟΓΟΝΟΣ ΔΡΑΣΗ

Προκαλεί τη νόσο σύφιλη. Η μόλυνση από το *T. pallidum* γίνεται, όταν υπάρχει λύση της συνέχειας του δέρματος ή των βλεννογόνων των γεννητικών οργάνων κατά την σεξουαλική επαφή. Μετά από 10-60 ημέρες εμφανίζεται το συφιλιδικό έλκος, που είναι σκληρό και ανώδυνο και συνοδεύεται από διόγκωση των λεμφαδένων της περιοχής του έλκους.

Αν δε γίνει θεραπεία, η νόσος μεταπίπτει στο δεύτερο στάδιο, κατά το οποίο εμφανίζεται η ροδάνθη, το χαρακτηριστικό εξάνθημα της σύφιλης στο δέρμα και τους βλεννογόνους.

Τα συμπτώματα στα δύο αυτά στάδια μπορεί να μην είναι σαφή και η νόσος να αυτοθεραπευθεί και να μεταπέσει σε χρόνια. Σε ένα μεγάλο ποσοστό τα άτομα αυτά θα εμφανίσουν το τρίτο στάδιο της νόσου, που χαρακτηρίζεται από καρδιαγγειακές βλάβες, βλάβες στο κεντρικό νευρικό σύστημα κ.τ.λ.

Οι πάσχοντες από AIDS αρκετές φορές πάσχουν συγχρόνως και από σύφιλη. Κατά την εγκυμοσύνη το *T. pallidum* περνάει από το αίμα της μητέρας μέσω του πλακούντα στο παιδί, το οποίο νοσεί από γενικευμένη σύφιλη. Αν το παιδί δε γεννηθεί νεκρό, θα εμφανίσει αργότερα συμπτώματα σύφιλης.

### IV. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ

Η μετάδοση της σύφιλης γίνεται με τη σεξουαλική επαφή από άτομα που πάσχουν και βρίσκονται στα δύο πρώτα στάδια της νόσου για 2-5 χρόνια. Στο τρίτο στάδιο της νόσου δε γίνεται μετάδοση.

### V. ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ

Γίνεται με:

- Την ανεύρεση του *T. pallidum* στον ορό του συφιλιδικού έλκους, στις δερματικές βλάβες ή στους λεμφαδένες με μικροσκόπηση σε σκοτεινό οπτικό πεδίο.
- Την αναζήτηση αντισωμάτων στον ορό του ασθενούς. Τα αντισώματα αυτά είναι *ειδικά* και *μη ειδικά*. Μη ειδικά αντισώματα αναζητούμε με τις αντιδράσεις Wassermann, Kahn, VDRL, RPR κ.ά. Οι εξετάσεις αυτές δεν είναι ειδικές και μπο-

ρεί να δώσουν ψευδή θετικά αποτελέσματα σε εγκυμοσύνη, έμμηνο ρύση, φυματίωση κ.ά. Η επιβεβαίωση του θετικού αποτελέσματος γίνεται με την αναζήτηση ειδικών για το *T. pallidum* αντισωμάτων, όπως π.χ. με την αντίδραση TPI (κατά την οποία τα αντισώματα που αναπτύσσονται στον ασθενή ακινητοποιούν ένα στέλεχος *T. pallidum*) και με τη μέθοδο του έμμεσου ανοσοφθορισμού (FTA).

### VI. ΠΡΟΦΥΛΑΞΗ

Η σύφιλη θεωρείται κοινωνική νόσος και η πολιτεία έχει θεσπίσει ειδικά μέτρα για την αντιμετώπισή της, όπως ιατρικό έλεγχο των σεξουαλικά εκδιδομένων ατόμων και δήλωση των κρουσμάτων, διαφώτιση της νεολαίας κ.τ.λ.

### VII. ΘΕΡΑΠΕΙΑ

Η θεραπεία της νόσου γίνεται με πενικιλίνη και θα πρέπει να γίνεται σωστά και έγκαιρα.

## Ανακεφαλαίωση

**Τα αναερόβια** βακτήρια του γένους *Treponema* αποικίζουν το στόμα και τα γεννητικά όργανα του ανθρώπου, χωρίς να προκαλούν ασθένεια.

**Τα αερόβια** είναι παθογόνα και προκαλούν διαφορετικές ασθένειες το κάθε είδος.

Το *T. pallidum* είναι σπειροειδές βακτήριο και περιβάλλεται από ινίδια. Προκαλεί τη νόσο σύφιλη.

Μεταδίδεται με τη σεξουαλική επαφή.

Δεν καλλιεργείται σε κανένα θρεπτικό υλικό, μπορεί όμως να επιζήσει λίγες ημέρες σε υγρό περιβάλλον σε αναερόβιες συνθήκες και στο αίμα για ένα 24ωρο.

Η διάγνωση της νόσου γίνεται με την ανεύρεση του *T. pallidum* στις συφιλιδικές βλάβες στα πρώτα στάδια της νόσου και την αναζήτηση ειδικών και μη ειδικών αντισωμάτων στο αίμα του ασθενούς.

## Ερωτήσεις

1. Τι γνωρίζετε για τα αναερόβια βακτήρια του γένους *Treponema*;
2. Περιγράψτε το *T. pallidum*.
3. Τι γνωρίζετε για την παθογόνο δράση του *T. pallidum*;
4. Τι γνωρίζετε για τους τρόπους μετάδοσης και τη θεραπεία της σύφιλης;
5. Πώς χρωματίζουμε το *T. pallidum*;
6. Ποιες διαγνωστικές αντιδράσεις γνωρίζετε για τη σύφιλη;



### 10.1. Γενικά - είδη

Τα βακτήρια του γένους *Haemophilus* είναι Gram αρνητικά, πολύ μικρά κοκκοβακτηρίδια, ακίνητα, άσπορα, αερόβια και προαιρετικά αναερόβια. Μερικά είδη έχουν έλυτρο και εμφανίζουν έντονο πολυμορφισμό. Για την ανάπτυξή τους χρειάζονται τους παράγοντες X και V που βρίσκονται στο αίμα του ανθρώπου και των ζώων (ο παράγοντας X είναι αιματίνη και ο παράγοντας V είναι το συνένζυμο NAD). Παράγουν καταλάση, όχι όμως οξειδάση.

Είναι βακτήρια αυστηρά παρασιτικά και ζουν στους βλεννογόνους του ανθρώπου και των ζώων. Στο γένος *Haemophilus* ανήκουν 16 είδη και από αυτά τα 9 προκαλούν λοιμώξεις στον άνθρωπο με πιο συχνό τον *Haemophilus influenzae*.

### 10.2. *Haemophilus influenzae* ( Αιμόφιλος της γρίπης )

#### I. ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ - ΧΡΩΣΗ

Ο *H. Influenzae* είναι πολύ μικρό, Gram αρνητικό βακτηρίδιο, με έντονο πολυμορφισμό. Εμφανίζεται με τη μορφή κοκκοβακτηρίδιου ή με επιμήκεις και κυματοειδείς μορφές, ιδίως σε παρασκευάσματα από ENY. Είναι ακίνητο, με έλυτρο, άσπορο και αερόβιο.

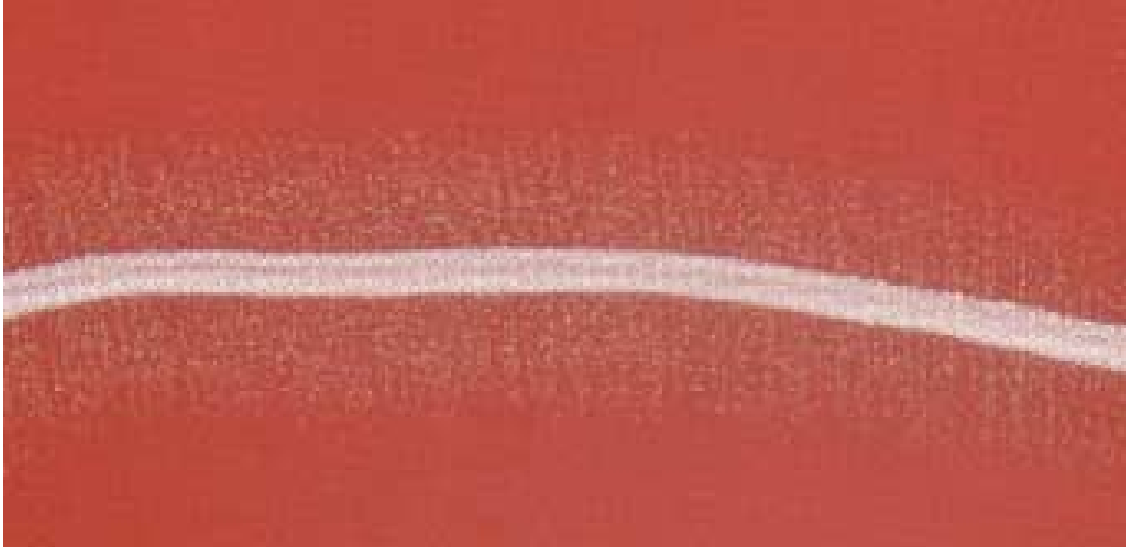
#### II. ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ

Δεν αναπτύσσεται στα κοινά θρεπτικά υλικά, γιατί έχει ανάγκη τους δύο παράγοντες X και V που βρίσκονται στο αιμολυμένο αίμα. Για την πρωτοκαλλιέργεια και τις ανακαλλιέργειες χρησιμοποιούνται το σοκολατόχρωμο άγαρ, το Lewinthal άγαρ και το αιματούχο άγαρ. Στα στερεά αυτά υλικά οι αποικίες είναι μικρές, άχρωμες, διαφανείς σαν δροσοσταλίδες και ημισφαιρικές μετά από επώαση 24-48 ωρών και φαίνονται καλύτερα με πλάγιο φωτισμό. Οι αποικίες στα ελυτροφόρα στελέχη είναι βλεννώδεις. Ευνοϊκή θερμοκρασία ανάπτυξης είναι οι 37° C σε ατμόσφαιρα CO<sub>2</sub> 5%, που βοηθά στην ταχύτερη ανάπτυξή του.

Σε μεικτές καλλιέργειες ο *H. influenzae* αναπτύσσεται καλύτερα και οι αποικίες του είναι μεγαλύτερες, όταν βρίσκεται κοντά στις αποικίες των Σταφυλόκοκκων. Το φαινόμενο αυτό λέγεται δορυ-



φορισμός και οφείλεται στην παραγωγή του παράγοντα V από τους Σταφυλόκοκκους.



Εικόνα 10.1: *H. influenzae* - Δοκιμασία δορυφορισμού

### III. ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ

Οι βασικές βιοχημικές ιδιότητες του *H. influenzae* είναι:

- Διασπά τη γλυκόζη αερόβια.
- Δε διασπά τη σουκρόζη, λακτόζη και μαννιτόλη.
- Παράγει ινδόλη και καταλάση.
- Παράγει ουρεάση και υδρολύει την ουρία.
- Ανάγει τα νιτρικά άλατα σε νιτρώδη.
- Δεν προκαλεί αιμόλυση σε αιματούχο άγαρ από αίμα ανθρώπου.

	Ιδιότητες	<i>H. influenzae</i>
<b>Διάσπαση</b>	Γλυκόζη	+
	Σουκρόζη	-
	Λακτόζη	-
	Μαννιτόλη	-
<b>Παραγωγή</b>	Ινδόλη	+
	Ουρεάση	+
	Καταλάση	+
<b>Αιμόλυση</b>		-
<b>Αναγωγή</b>	Νιτρικών σε νιτρώδη	+

Πίνακας 10.1: Βιοχημικές ιδιότητες του *H. influenzae*

#### IV. ΑΝΤΙΓΟΝΙΚΗ ΣΥΣΤΑΣΗ

Τα ελυτροφόρα στελέχη του *H. influenzae* διακρίνονται σε έξι ορολογικούς τύπους (a, b, c, d, e, f) που καθορίζονται από το πολυσακχαριδικό αντιγόνο του ελύτρου, το οποίο δεν είναι το ίδιο για όλα τα στελέχη.

Ο ορότυπος b είναι το συχνότερο αίτιο των λοιμώξεων. Η κατάταξη των ελυτροφόρων στελεχών σε ορότυπους γίνεται με τη δοκιμασία εξοιδίσεως του ελύτρου, με συγκολλητινοαντίδραση κ.ά.

#### V. ΠΑΘΟΓΟΝΟΣ ΔΡΑΣΗ

Η παθογόνος δράση του οφείλεται στα αντιγόνα που παράγει. Οι περισσότερες και βαρύτερες λοιμώξεις οφείλονται στα ελυτροφόρα στελέχη του ορότυπου b τα οποία προκαλούν το 95% των λοιμώξεων σε παιδιά κάτω των 5 ετών. Οι πιο συνηθισμένες είναι:

- Μηνιγγίτιδα
- Ρινοφαρυγγίτιδα
- Επιγλωττίτιδα
- Μέση πυώδη ωτίτιδα
- Μικροβιαμία
- Πνευμονία

Στην Ελλάδα είναι το δεύτερο αίτιο της οξείας πυώδους μηνιγγίτιδας στα παιδιά μετά τη *Neisseria meningitidis*. Η επιγλωττίτιδα, αν και σπάνια, είναι βαριά και επικίνδυνη για τα παιδιά.

#### VI. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ

Ο *H. influenzae* βρίσκεται μόνο στον άνθρωπο. Οι υγιείς φορείς του βακτηρίου είναι 1-2% περίπου των παιδιών και σπανιότερα οι ενήλικες, οι οποίοι αποικίζονται από μη ελυτροφόρα στελέχη. Η μετάδοσή του γίνεται με σταγονίδια και μετά την ασθένεια καταλείπεται ανοσία.

#### VII. ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ

Το υλικό που εξετάζεται για την απομόνωση του *H. influenzae* είναι πύελα σε λοιμώξεις του αναπνευστικού συστήματος, πυώδες έκκριμα σε ωτίτιδα και εγκεφαλονωτιαίο υγρό σε μηνιγγίτιδα.

Αν πρόκειται να εξετάσουμε υλικό χωρίς μικροβιακή χλωρίδα,





όπως είναι το εγκεφαλονωτιαίο υγρό, γίνεται:

Άμεσο παρασκεύασμα από το ίζημα του ΕΝΥ, το οποίο χρωματίζεται κατά Gram και μικροσκοπείται.

Δοκιμή εξοιδήσεως του ελύτρου με τον ειδικό αντιορό b στο ίζημα του ΕΝΥ.

Καλλιέργεια σε σοκολατόχρωμο άγαρ, Lewinthal άγαρ, αιματούχο άγαρ και επώαση σε θερμοκρασία 37° C, σε ατμόσφαιρα CO<sub>2</sub> 5%, για 24-48 ώρες.

- Ανάγνωση της καλλιέργειας, όπου αναζητούνται μικρές αποικίες χωρίς αιμόλυση και γίνεται χρώση κατά Gram των ξηρών παρασκευασμάτων από τις αποικίες αυτές.
- Ταυτοποίηση με βιοχημικές δοκιμασίες, δηλαδή με δοκιμή δορυφορισμού, δοκιμή εξάρτησης από τους παράγοντες X και V και παραγωγή αιμόλυσης. Αν το βακτήριο χρειάζεται και τους δύο παράγοντες X και V για την ανάπτυξή του και δεν παράγει αιμόλυση, χαρακτηρίζεται ως *H. influenzae*
- Δοκιμή ευαισθησίας στα αντιβιοτικά.

Ορολογική τυποποίηση με:

- Ειδικούς αντιορούς, με τη μέθοδο εξοιδήσεως του ελύτρου.
- Συγκολλητινοαντίδραση πάνω σε πλάκα.
- Ανοσοφθορισμό κ.ά.

Σε υλικά με χλωρίδα, όπως τα πύελα, ακολουθείται η ίδια διαδικασία, με τη διαφορά ότι το άμεσο παρασκεύασμα, που χρωματίζεται κατά Gram και μικροσκοπείται, δεν προσφέρει ουσιαστική βοήθεια, επειδή και άλλα είδη του γένους *Haemophilus* βρίσκονται ως φυσιολογική χλωρίδα στο αναπνευστικό σύστημα.

#### VIII. ΠΡΟΦΥΛΑΞΗ

Γίνεται με εμβόλιο που λαμβάνεται από στελέχη με έλυτρο τύπου b. Προστατεύει από τη μηνιγγίτιδα και τη σηψαιμία, αλλά δεν είναι αποτελεσματικό σε παιδιά μικρότερα των 18 μηνών.

#### IX. ΘΕΡΑΠΕΙΑ

Το φάρμακο εκλογής για τον *H. influenzae* είναι η αμπικιλίνη, είναι όμως ευαίσθητος και σε άλλα αντιβιοτικά.

## Ανακεφαλαίωση

Τα βακτήρια του γένους *Haemophilus* είναι Gram αρνητικά, πολύ μικρά κοκκοβακτηρίδια, ακίνητα, άσπορα, αερόβια και προαιρετικά αναερόβια. Μερικά είδη έχουν έλυτρο και έντονο πολυμορφισμό. Είναι αυστηρά παρασιτικά και ζουν στους βλεννογόνους του ανθρώπου και των ζώων.

Ο *H. influenzae* εμφανίζεται με τη μορφή κοκκοβακτηριδίου ή με επιμήκεις και κυματοειδείς μορφές, ιδίως σε παρασκευάσματα από ENY. Για την πρωτοκαλλιέργεια και τις ανακαλλιέργειες χρησιμοποιούνται το σοκολατόχρωμο άγαρ, το Lewinthal άγαρ και το αιματούχο άγαρ. Σε μεικτές καλλιέργειες ο *H. influenzae* αναπτύσσεται καλύτερα και οι αποικίες του είναι μεγαλύτερες, όταν βρίσκεται κοντά στις αποικίες των Σταφυλόκοκκων. Το φαινόμενο αυτό λέγεται δορυφορισμός και οφείλεται στην παραγωγή του παράγοντα V από τους Σταφυλόκοκκους.

Τα ελυτροφόρα στελέχη του *H. influenzae* διακρίνονται σε 6 ορολογικούς τύπους (α, β, c, d, e, f) που καθορίζονται από το πολυσακχαριδικό αντιγόνο του ελύτρου. Ο ορότυπος β είναι το συχνότερο αίτιο των λοιμώξεων.

Η εργαστηριακή διάγνωση γίνεται με την εξέταση του υλικού που λαμβάνεται από το σημείο που εντοπίζεται η λοίμωξη. Σε λοίμωξη του αναπνευστικού συστήματος εξετάζονται πύελα, σε ωτίτιδα εξετάζεται πυώδες έκκριμα και σε μηνιγγίτιδα το εγκεφαλονωτιαίο υγρό.

Η προφύλαξη γίνεται με εμβόλιο και η θεραπεία με χορήγηση αμπικιλίνης.

## Ερωτήσεις

1. Τι γνωρίζετε για την καλλιέργεια του *H. influenzae*;
2. Πώς γίνεται η ταυτοποίηση του *H. influenzae*;
3. Τι γνωρίζετε για τις λοιμώξεις που προκαλεί ο *H. influenzae*;
4. Πώς γίνεται η εργαστηριακή διάγνωση του *H. influenzae* στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό;
5. Πώς γίνεται η προφύλαξη από τον *H. influenzae*;

### 11.1. Γενικά - είδη

Τα βακτήρια του γένους *Bordetella* είναι Gram αρνητικά κοκκοβακτηρίδια, ακίνητα, άσπορα, αερόβια και πολύ απαιτητικά για την ανάπτυξή τους. Χρειάζονται αίμα ή άλλο λευκωματούχο υλικό, για να εξουδετερώνει τις ανασταλτικές ουσίες οι οποίες βρίσκονται στα θρεπτικά υλικά ή παράγονται κατά την ανάπτυξη των κοινών βακτηρίων και διαχέονται στο άγαρ.

Το γένος *Bordetella* περιλαμβάνει τρία είδη από τα οποία το σπουδαιότερο είναι η *Bordetella pertussis*.

### 11.2. *Bordetella pertussis* (Μπορντετέλλα του κοκκύτη)

#### I. ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ - ΧΡΩΣΗ

Η *B. pertussis* είναι μικρό Gram αρνητικό κοκκοβακτηρίδιο, ακίνητο και άσπορο. Διατάσσεται μεμονωμένα, σε ζεύγη ή σε μικρές αλυσίδες. Φαίνεται σαν διπολικό, γιατί με τη χρώση Gram χρωματίζεται δύσκολα. Χρειάζεται περισσότερο χρόνο στο μεταχρωματισμό με τη σαφρανίνη.

#### II. ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ

Δεν αναπτύσσεται στα κοινά θρεπτικά υλικά. Αναπτύσσεται στο ειδικό θρεπτικό υλικό Bordet-Gengou, σε αερόβιες συνθήκες, με ευνοϊκή θερμοκρασία ανάπτυξης τους 35°C. Οι αποικίες αναπτύσσονται στο υλικό μετά από τέσσερις ημέρες. Είναι μικρές, περιγεγραμμένες, φουσκωτές και γυαλιστερές. Με πλάγιο φωτισμό μοιάζουν με μαργαριτάρια ή σταγόνες υδραργύρου με ζώνη αιμόλυσης. Δεν αναπτύσσονται στο Mac Conkey άγαρ.

#### III. ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ

Οι βασικές βιοχημικές της ιδιότητες είναι:

- Δε ζυμώνει τα σάκχαρα ούτε τη γλυκόζη (αζυμωτικό βακτήριο).
- Παράγει καταλάση και οξειδάση.
- Δεν παράγει ουρεάση και δεν υδρολύει την ουρία.
- Δεν αναπτύσσεται σε υλικό με κιτρικό νάτριο ως μόνη πηγή άνθρακα.

	Ιδιότητες	<i>B. pertussis</i>
<b>Ζύμωση</b>		
<b>Παραγωγή</b>	Γλυκόζη	-
	Ουρεάση	-
	Καταλάση	+
	Οξειδάση	+
<b>Ανάπτυξη</b>	Κιτρικό Νάτριο	-

Πίνακας 11.1: Βιοχημικές ιδιότητες της *B. pertussis*

#### IV. ΑΝΤΙΓΟΝΙΚΗ ΣΥΣΤΑΣΗ

Οι πιο γνωστές κυτταρικές και εξωκυτταρικές αντιγονικές ουσίες είναι:

- Το θερμοανθεκτικό σωματικό αντιγόνο O.
- Τα ινιδιακά αντιγόνα.
- Τα πρωτεϊνικά αντιγόνα.
- Η τοξίνη.

Οι αντιγονικές ουσίες χρησιμοποιούνται για την ταυτοποίηση των στελεχών και την παραγωγή του εμβολίου. Όλα τα αντιγόνα ευθύνονται για την τοξικότητα του βακτηρίου.

#### V. ΠΑΘΟΓΟΝΟΣ ΔΡΑΣΗ

Στον άνθρωπο προκαλεί τον κοκκύτη, ο οποίος προσβάλλει κυρίως τα βρέφη και τα παιδιά. Τα συμπτώματα εμφανίζονται μετά από επώαση 8-12 ημερών. Χαρακτηρίζεται από έντονους παροξυσμούς βήχα.

#### V. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ

Η μετάδοση του κοκκύτη γίνεται από την αναπνευστική οδό με τα σταγονίδια τα οποία εκπέμπονται με το βήχα του ασθενούς. Τα σταγονίδια αυτά περιέχουν άφθονα βακτήρια κατά τα πρώτα στάδια της ασθένειας.

#### VI. ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ

Η διάγνωση γίνεται με:

Καλλιέργεια του ρινοφαρυγγικού εκκρίματος στο ειδικό θρεπτικό υλικό Bordet-Gengou και επώαση στους 35<sup>ο</sup> C για τέσσερις ημέρες. Καλό είναι στο υλικό αυτό να ενσωματώνεται πενικιλ-



λίνη, για να εμποδίζει την ανάπτυξη των βακτηρίων της φυσιολογικής χλωρίδας του ρινοφάρυγγα. Το έκκριμα λαμβάνεται με τη βοήθεια εύκαμπτου βαμβακοφόρου σπειλεού που εισάγεται από τη μύτη ή από το στόμα.

- Ανάγνωση της καλλιέργειας μετά τις τέσσερις ημέρες, αναζήτηση των μικρών μαργαριταροειδών αποικιών και παρατεινόμενη χρώση κατά Gram των ξηρών παρασκευασμάτων από τις αποικίες αυτές.
- Ανακαλλιέργεια στο ειδικό θρεπτικό υλικό Bordet - Gengou για την απομόνωση καθαρών αποικιών.
- Ταυτοποίηση με βιοχημικές δοκιμασίες και ορολογική ταυτοποίηση με συγκόλληση εναιωρήματος του βακτηρίου με τον ειδικό αντιορό.

Μικροσκοπική αναζήτηση του βακτηρίου στα εκκρίματα του αναπνευστικού με άμεσο ανοσοφθορισμό.

Ορολογικές εξετάσεις στον ορό αίματος. Αναζήτηση αντισωμάτων (στα βρέφη μετά την τρίτη εβδομάδα της ασθένειας).

#### **VII. ΠΡΟΦΥΛΑΞΗ**

Για την προφύλαξη από τον κοκκύτη γίνεται εμβολιασμός από τον τρίτο μήνα της ηλικίας, γιατί ο κοκκύτης είναι ιδιαίτερα επικίνδυνος για βρέφη ηλικίας κάτω του ενός έτους. Το εμβόλιο περιέχει νεκρά κύτταρα του βακτηρίου και χορηγείται μαζί με το εμβόλιο του τετάνου και της διφθερίτιδας με τη μορφή τριπλού εμβολίου.

#### **VIII. ΘΕΡΑΠΕΙΑ**

Χορηγείται ερυθρομικίνη ή κωτριμοξαζόλη από το στόμα. Η κωτριμοξαζόλη δίνεται ως προφύλαξη στα άτομα του περιβάλλοντος του ασθενούς για δεκατέσσερις ημέρες.

## Ανακεφαλαίωση

Το γένος *Bordetella* περιλαμβάνει Gram αρνητικά κοκκοβακτηρίδια, ακίνητα, άσπορα, αερόβια και πολύ απαιτητικά για την ανάπτυξή τους. Η *B. pertussis* φαίνεται σαν διπολικό βακτηρίδιο, γιατί με τη χρώση Gram χρωματίζεται δύσκολα.

Αναπτύσσεται στο ειδικό θρεπτικό υλικό Bordet-Gengou και είναι αζυμωτικό βακτήριο. Οι αντιγονικές της ουσίες χρησιμοποιούνται για την ταυτοποίηση των στελεχών και την παραγωγή εμβολίου. Είναι υπεύθυνες για την τοξικότητα του βακτηρίου.

Στον άνθρωπο προκαλεί τον κοκκύτη που χαρακτηρίζεται από έντονους παροξυσμούς βήχα. Η μόλυνση γίνεται από την αναπνευστική οδό.

Η διάγνωση γίνεται με ρινοφαρυγγικό έκκριμα, το οποίο λαμβάνεται από τη μύτη ή το στόμα.

Η προφύλαξη γίνεται με το τριπλό εμβόλιο (διφθερίτιδας-κοκκύτη-τετάνου) και η θεραπεία με χορήγηση ερυθρομικίνης από το στόμα.

## Ερωτήσεις

1. Τι γνωρίζετε για τη μορφολογία της *B. pertussis*;
2. Ποιες είναι οι βασικές βιοχημικές ιδιότητες της *B. pertussis*;
3. Περιγράψτε την *B. pertussis*.
4. Τι γνωρίζετε για την ασθένεια που προκαλεί η *B. pertussis*;
5. Πώς γίνεται η διάγνωση της *B. pertussis*;
6. Τι γνωρίζετε για τη θεραπεία και την προφύλαξη από τον κοκκύτη;

### 12.1. Γενικά - είδη

Είναι Gram αρνητικά, μικρά κοκκοβακτηρίδια, ακίνητα, αερόβια, τα οποία δε ζυμώνουν τα σάκχαρα και παράγουν καταλάση και οξειδάση.

Το γένος *Brucella* περιλαμβάνει έξι είδη και από αυτά η *Brucella melitensis* (της κασίικας), η *Brucella abortus* (της αγελάδας) και η *Brucella suis* (του χοίρου) είναι παθογόνα για τον άνθρωπο. Ο άνθρωπος μολύνεται μετά από επαφή με τα άρρωστα ζώα ή από τα προϊόντα τους.

### 12.2. *Brucella melitensis-Brucella abortus-Brucella suis*

#### I. ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ - ΧΡΩΣΗ

Είναι Gram αρνητικά, μικρά, ωσειδή βακτηρίδια, με άκρα αποστρογγυλεμένα. Διατάσσονται μεμονωμένα ή κατά ζεύγη. Είναι ακίνητα, άσπορα, εκλεκτικά αερόβια, μικροαερόφιλα.

#### II. ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ

Δεν αναπτύσσονται στα κοινά θρεπτικά υλικά, αλλά σε θρεπτικά υλικά πλούσια σε τρυπτικάση, όπως το τρυπτικάση-σόγια άγαρ (Trypticase Soye Agar TSA) και το *Brucella* άγαρ. Επίσης αναπτύσσονται σε ζωμό με τρυπτικάση-σόγια (TSB), σε αερόβιες συνθήκες, σε θερμοκρασία 37° C και ατμόσφαιρα CO<sub>2</sub> (που ευνοεί την ανάπτυξή τους), μετά από δύο ημέρες. Στα θρεπτικά αυτά υλικά οι αποικίες είναι περιγεγραμμένες, λίγο φουσκωτές, άχρωμες, με επιφάνεια λεία και γυαλιστερή. Στο Mac Conkey άγαρ δεν αναπτύσσονται ή αναπτύσσονται πολύ αργά και με πολύ μικρές άχρωμες αποικίες. Στο αιματούχο άγαρ δεν προκαλούν αιμόλυση.

#### III. ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ

Οι βασικές βιοχημικές τους ιδιότητες είναι:

- Παράγουν οξειδάση και καταλάση.
- Δε ζυμώνουν κανένα σάκχαρο.
- Παράγουν ουρεάση και υδρολύουν την ουρία.
- Παράγουν υδρόθειο (εκτός από την *B. Melitensis*).
- Ανάγουν τα νιτρικά σε νιτρώδη.

Το γένος *Brucella* διαχωρίζεται σε είδη ανάλογα με το αν αναπτύσσονται σε ατμόσφαιρα CO<sub>2</sub>, σε θρεπτικό υλικό που περιέχει θειονίνη ή βασική φουξίνη και αν παράγουν υδρόθειο και ουρεάση (Πίνακας 12.1).

Είδη Βρουκελλών	Ανάγκη CO <sub>2</sub>	Παραγωγή H <sub>2</sub> S	Ανάπτυξη σε θειονίνη φουξίνη		Παραγωγή ουρεάσης
<i>B. melitensis</i>	-	-	+	+	αργά
<i>B. abortus</i>	+	+	-	+	+ (1-2 h)
<i>B. suis</i>	-	+	+	-	+ (30 min)

Πίνακας 12.1: Βιοχημικές διαφορές των παθογόνων για τον άνθρωπο Βρουκελλών.

#### IV. ΑΝΤΙΓΟΝΙΚΗ ΣΥΣΤΑΣΗ

Τα βακτήρια του γένους *Brucella* έχουν στην επιφάνειά τους δύο κοινά αντιγόνα, το A και το M, σε διαφορετική ποσότητα. Κατά τη λοίμωξη με το ένα είδος βακτηρίου (π.χ. μόνο *B. melitensis*) παράγονται αντισώματα στον ορό του ασθενούς τα οποία συγκολλούν τα κύτταρα και των τριών βακτηρίων. Η συγκολλητινοαντίδραση Wright μας δίνει την πληροφορία μόνο ότι υπάρχει η ασθένεια, χωρίς να μας προσδιορίζει το είδος του βακτηρίου που την προκαλεί.

#### V. ΠΑΘΟΓΟΝΟΣ ΔΡΑΣΗ

Οι ασθένειες που προκαλούνται από το γένος *Brucella* είναι ζωονόσοι και λέγονται βρουκελλώσεις. Στον άνθρωπο η *B. melitensis* προκαλεί το μελιταίο πυρετό. Η τυπική μορφή αυτής της ασθένειας εμφανίζεται μετά από επώαση 1-6 εβδομάδων και προκαλεί μικροβιαμία με χαρακτηριστικό κυματοειδή πυρετό και νυκτερινή εφίδρωση. Συνυπάρχει διόγκωση των λεμφαδένων, του σπλήνα και του ήπατος και διαρκεί μερικές εβδομάδες ή μήνες.

Η ασθένεια χαρακτηρίζεται ως χρόνια, όταν διαρκεί ή παρουσιάζει υποτροπές για ένα χρόνο ή περισσότερο. Παρουσιάζονται διάφορες επιπλοκές στη σπονδυλική στήλη, το νευρικό σύστημα, το ήπαρ, το καρδιαγγειακό και το ουρογεννητικό σύστημα.

## VI. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ

Πηγή των βακτηρίων είναι τα ζώα. Ο άνθρωπος μολύνεται από αυτά είτε απευθείας είτε από το άβραστο γάλα και τα γαλακτοκομικά προϊόντα που προέρχονται από ζώα που πάσχουν. Η άμεση μετάδοση γίνεται με επαφή του δέρματος του ανθρώπου με τα λόγια και το κρέας των άρρωστων ζώων (κτηνίατροι-κτηνοτρόφοι). Επίσης άμεση μετάδοση γίνεται στο προσωπικό των μικροβιολογικών εργαστηρίων από τις καλλιέργειες των βακτηρίων. Σπάνια γίνεται η μετάδοση με την εισπνοή σκόνης, μολυσμένης με τα βακτήρια αυτά.

## VII. ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ

Η διάγνωση των βρουκελλώσεων γίνεται με αιμοκαλλιέργεια και συχνότερα με ορολογική αναζήτηση των αντισωμάτων στο ορό του ασθενούς. Σε εντοπισμένες μορφές τα δείγματα είναι εγκεφαλονωτιαίο υγρό, πύο οστεομυελίτιδας αρθρικό, περιτοναϊκό υγρό ή άλλα υγρά παρακεντήσεων, σπέρμα και ούρα. Επειδή η μικροβιαμία δεν είναι συνεχής, πρέπει να λαμβάνονται αιμοκαλλιέργειες σε τρεις διαδοχικές ημέρες.

### A. Αιμοκαλλιέργεια

- Η καλλιέργεια αίματος γίνεται σε ζυμό τρυπτικάσης με γλυκόζη ή σε διφασικό θρεπτικό υλικό τύπου Castaneda και επώαζεται σε θερμοκρασία 37° C, σε ατμόσφαιρα CO<sub>2</sub> 5%, για 21 ημέρες. Η *B. melitensis* αναπτύσσεται συνήθως τη δεύτερη εβδομάδα.
- Καθημερινά εξετάζεται η αιμοκαλλιέργεια, για να διαπιστώσουμε αν υπάρχει θόλωση του ζυμού εξαιτίας της ανάπτυξης του βακτηρίου.
- Εάν παρατηρηθεί θόλωση, γίνεται:
  1. Εμβολιασμός μέρους του ζυμού στο στερεό θρεπτικό υλικό τρυπτικάση-σόγια άγαρ (TSA) και επώαση σε θερμοκρασία 37° C, σε ατμόσφαιρα CO<sub>2</sub> 5%, για 24-48 ώρες.
  2. Ανάγνωση της καλλιέργειας και χρώση κατά Gram των ξηρών παρασκευασμάτων από τις αποικίες που αναπτύχθηκαν.
  3. Από το στέλεχος που απομονώνεται βρίσκεται με τις βιοχημικές δοκιμασίες το είδος της *Brucella* που προκαλεί την ασθένεια.

**4. Δοκιμή ευαισθησίας στα αντιβιοτικά.**

- Εάν δεν παρατηρηθεί θόλωση του ζωμού, γίνονται ανακαλλιέργειες στα στερεά θρεπτικά υλικά κάθε τέσσερις ημέρες.
- Εάν μετά από 21 ημέρες ο ζωμός δε θολώσει, η αιμοκαλλιέργεια θεωρείται αρνητική.

**B. Ορολογική διάγνωση με τη συγκολλητινοαντίδραση Wright**

Η συγκολλητινοαντίδραση Wright είναι συνήθως θετική από την 7η - 10η ημέρα της ασθένειας. Τίτλος συγκόλλησης  $\geq 1:160$  φανερώνει οξεία λοίμωξη. Μεγαλύτερη σημασία έχει η αύξηση του τίτλου του ορού στο τετραπλάσιο κατά την εξέταση δύο διαδοχικών δειγμάτων του ορού.

**VIII. ΠΡΟΦΥΛΑΞΗ**

Τα σπουδαιότερα μέτρα για την προφύλαξη από τις βρουκελλώσεις είναι:

- Υγειονομικός έλεγχος στην παραγωγή και διάθεση των γαλακτοκομικών προϊόντων.
- Αποφυγή άμεσης επαφής των κτηνοτρόφων και κτηνιάτρων με τα μολυσμένα ζώα και τα προϊόντα τους.
- Προστασία των ζώων από τη μόλυνση.
- Μείωση των άρρωστων ζώων.

**IX. ΘΕΡΑΠΕΙΑ**

Γίνεται κυρίως με χορήγηση τετρακυκλίνης. Ο συνδυασμός τετρακυκλίνης με αμινογλυκοσίδες δίνει καλύτερα αποτελέσματα σε περιπτώσεις υποτροπής της ασθένειας.

## Ανακεφαλαίωση

Τα βακτήρια του γένους *Brucella* είναι Gram αρνητικά, μικρά, ωοειδή βακτηρίδια, τα οποία αναπτύσσονται σε θρεπτικά υλικά, πλούσια σε τρυπτικάσπ. Παθογόνα για τον άνθρωπο είναι η *B. melitensis*, η *B. abortus* και η *B. suis*. Χωρίζονται στα διάφορα είδη, ανάλογα με το αν αναπτύσσονται σε ατμόσφαιρα CO<sub>2</sub>, σε θρεπτικό υλικό στο οποίο υπάρχει η χρωστική θειονίνη ή η βασική φουζίνη και αν παράγουν υδρόθειο και ουρεάση.

Η *B. melitensis* προκαλεί το μελιταίο πυρετό. Κατά τη νόσο παρατηρείται μικροβαιμία με χαρακτηριστικό κυματοειδή πυρετό και νυκτερινή εφίδρωση.

Τα βακτήρια του γένους *Brucella* έχουν στην επιφάνειά τους δύο κοινά αντιγόνα, το A και το M. Η διάγνωση της ασθένειας γίνεται με αιμοκαλλιέργεια και συχνότερα με τη συγκολλητινοαντίδραση Wright.

Η συγκολλητινοαντίδραση Wright μας δίνει την πληροφορία μόνο ότι υπάρχει ασθένεια, χωρίς να μας προσδιορίζει το είδος του βακτηρίου που προκαλεί την ασθένεια.

Ο άνθρωπος μολύνεται από τα ζώα είτε απευθείας είτε από το άβραστο γάλα και τα γαλακτοκομικά προϊόντα.

Η προφύλαξη γίνεται κυρίως με υγειονομικό έλεγχο στην παραγωγή και διάθεση των γαλακτοκομικών προϊόντων και η θεραπεία με τη χορήγηση τετρακυκλίνης.

## Ερωτήσεις

1. Τι γνωρίζετε για τη μορφολογία των βακτηρίων του γένους *Brucella* και ποια είδη είναι παθογόνα για τον άνθρωπο;
2. Σε ποια θρεπτικά υλικά αναπτύσσονται τα βακτήρια του γένους *Brucella* και τι μορφή έχουν οι αποικίες τους;
3. Πώς ταξινομούνται τα είδη του γένους *Brucella* ανάλογα με τις βιοχημικές τους ιδιότητες;
4. Τι πληροφορίες μας δίνει η συγκολλητινοαντίδραση Wright;
5. Ποια είναι τα χαρακτηριστικά του μελιταίου πυρετού;
6. Πώς μεταδίδεται ο μελιταίος πυρετός;
7. Πώς γίνεται η εργαστηριακή διάγνωση του μελιταίου πυρετού με αιμοκαλλιέργεια;
8. Γιατί είναι απαραίτητος ο υγειονομικός έλεγχος των γαλακτοκομικών προϊόντων;



### 13.1. Γενικά - είδη

Τα βακτήρια του γένους *Clostridium* είναι Gram θετικά βακτηρίδια, σπορογόνα και αναερόβια. Δεν παράγουν οξειδάση και καταλάση και είναι κινητά, με εξαίρεση το *Clostridium perfringens*. Βρίσκονται σε αφθονία στο έδαφος, στη φυσιολογική εντερική χλωρίδα των ανθρώπων και των ζώων, στο νερό των υπονόμων και γενικά στο γλυκό νερό.

Στο γένος των *Clostridium* ανήκουν πολλά είδη δυνητικά παθογόνα, και κάποια κατεξοχήν παθογόνα για τον άνθρωπο.

### 13.2. *Clostridium tetani* (Κλωστηρίδιο του τετάνου)

#### I. ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ - ΧΡΩΣΗ

Το *C. tetani* είναι Gram θετικό βακτηρίδιο, αναερόβιο, σπορογόνο, λεπτό και μακρύ. Έχει βλεφαρίδες και κινείται. Ο σπόρος είναι στρογγυλός, βρίσκεται στο ένα άκρο του βακτηρίου, το διογκώνει και μοιάζει με πλήκτρο τυμπάνου.



Σχήμα 13.1: *Clostridium tetani*

#### II. ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ

Αναπτύσσεται στα κοινά θρεπτικά υλικά, ιδιαίτερα στα σακχαρούχα, σε αυστηρά αναερόβιες συνθήκες, σε θερμοκρασία 37° C. Στο αιματούχο άγαρ οι αποικίες, μετά από επώαση 48 - 72 ωρών, είναι μικρές ή μεγάλες, αιμολυτικές. Αν υπάρχει αρκετή υγρασία, απλώνονται σε όλη την επιφάνεια του τρυβλίου, παρουσιάζοντας έτσι το φαινόμενο του ερπυσμού. Στην περιοχή του ερπυσμού δεν παρατηρείται αιμόλυση.

#### III. ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ

Οι βασικές βιοχημικές του ιδιότητες είναι:

- Δε ζυμώνει τα σάκχαρα.
- Δεν πήζει το γάλα.



- Ρευστοποιεί αργά την πηκτή.
- Έχει μικρή πρωτεολυτική ικανότητα, γι' αυτό μαυρίζει το κρέας, όταν αναπτυχθεί σε ζωμό με κρέας.
- Παράγει ινδόλη.
- Μερικά στελέχη παράγουν υδρόθειο.

#### IV. ΑΝΤΙΓΟΝΙΚΗ ΣΥΣΤΑΣΗ

Το *C. tetani* έχει κοινό σωματικό αντιγόνο, αλλά διακρίνεται σε 10 ορολογικούς τύπους με βάση την αντιγονική σύσταση των βλεφαρίδων.

#### V. ΠΑΘΟΓΟΝΟΣ ΔΡΑΣΗ

Το *C. tetani* προκαλεί στον άνθρωπο τον τέτανο. Η ασθένεια οφείλεται στη δράση της ισχυρής εξωτοξίνης που παράγει (τετανοσπασμίνη). Το βακτήριο παραμένει στο σημείο εισόδου, κάποιο μικρό ή μεγάλο τραύμα, χωρίς να προκαλεί φλεγμονή. Όταν υπάρχουν ευνοϊκές συνθήκες, αναπτύσσεται και παράγει τοξίνη, η οποία εισέρχεται στα νευρικά κύτταρα και φτάνει στο κεντρικό νευρικό σύστημα. Η επώαση διαρκεί από τέσσερις ημέρες έως εβδομάδες.

#### VI. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ

Το *C. tetani* βρίσκεται στο έδαφος, στα κόπρανα των οικιακών ζώων και σε μικρή συχνότητα στα κόπρανα του ανθρώπου. Οι σπόροι ζουν πολλά χρόνια στη σκόνη. Ο άνθρωπος μολύνεται μετά από τραυματισμό.

#### VII. ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ

Η διάγνωση θα γίνει από τα κλινικά στοιχεία και το λεπτομερές ιστορικό. Οι εξετάσεις που επιβεβαιώνουν τη διάγνωση είναι:

- Μικροσκοπική εξέταση υλικού από το εξίδρωμα της φλεγμονής μετά από χρώση κατά Gram.
- Καλλιέργεια με:
  1. Εμβολιασμό του ύποπτου υλικού σε ζωμό με κρέας και σε αιματούχο άγαρ Columbia με νεομυκίνη. Επώαση σε αυστηρά αναερόβιες συνθήκες για τέσσερις ημέρες.
  2. Ανάγνωση των καλλιεργειών μετά από τέσσερις ημέρες και χρώση κατά Gram των ζηρών παρασκευασμάτων από τις

αποικίες που αναπτύχθηκαν.

3. Ταυτοποίηση με τις βιοχημικές δοκιμασίες.

- Εμβολιασμός πειραματόζωου.
- Προσδιορισμός τίτλου αντιτετανικών αντισωμάτων.

#### VIII. ΠΡΟΦΥΛΑΞΗ

Το αντιτετανικό εμβόλιο προφυλάσσει 100% από την ασθένεια. Ως εμβόλιο χρησιμοποιείται η τετανική ατοξίνη. Ο εμβολιασμός πρέπει να γίνεται στο πρώτο έτος της ζωής και συνδυάζεται με το αντιδιφθεριτικό και αντικοκκυτικό εμβόλιο (τριπλό εμβόλιο). Κατά τον αρχικό εμβολιασμό χορηγούνται τρεις δόσεις με μεσοδιάστημα 4-8 εβδομάδων. Μετά ένα έτος από την τελευταία ένεση χορηγείται μια αναμνηστική δόση του εμβολίου. Αναμνηστικές δόσεις χορηγούνται κατά την είσοδο στο σχολείο και μετά κάθε 10 χρόνια. Η ανοσία του διαρκεί 5-10 χρόνια.

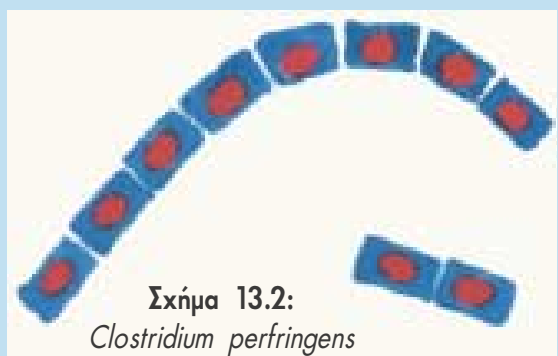
#### IX. ΘΕΡΑΠΕΙΑ

Η θεραπεία πρέπει να γίνεται έγκαιρα με χορήγηση ανθρώπινης τετανικής ανοσοσφαιρίνης. Ταυτόχρονα χορηγούνται μεγάλες δόσεις πενικιλίνης και γίνεται φαρμακευτικός και χειρουργικός καθαρισμός του τραύματος. Εάν δεν υπάρχει η τετανική ανοσοσφαιρίνη, δίνεται αντιτετανικός ορός ζώου.

### 13.3. *Clostridium perfringens* (Κλωστηρίδιο το διαθλαστικό)

#### I. ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ - ΧΡΩΣΗ

Το *C. perfringens* είναι Gram θετικό βακτηρίδιο, αναερόβιο, σπορογόνο, ακίνητο, με έλυτρο. Είναι σχετικά μεγάλο και οι άκρες του έχουν σχήμα ορθής γωνίας. Στις φλεγμονές των ιστών δεν παράγει σπόρους. Οι σπόροι του είναι ωοειδείς, εντοπίζονται στο κέντρο του βακτηρίου και δεν το διογκώνουν.



Σχήμα 13.2:  
*Clostridium perfringens*

## II. ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ

Αναπτύσσεται στα κοινά θρεπτικά υλικά, σε αναερόβιες συνθήκες, σε θερμοκρασία 37° C, μετά από επώαση 48 ωρών. Στο αιματούχο άγαρ παράγει αποικίες μεσαίες, κυκλικές, ομαλές, μερικές με γραμμώσεις, με ζώνη β-αιμόλυσης. Αν το αιματούχο άγαρ είναι με αίμα προβάτου, παράγει διπλή ζώνη αιμόλυσης. Μερικά είδη παράγουν βλεννώδεις αποικίες.

## III. ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ

Οι βασικές βιοχημικές ιδιότητες του *C. perfringens* είναι:

- Διασπά τη γλυκόζη, τη λακτόζη, τη σουκρόζη και τη μαλτόζη με ταυτόχρονη παραγωγή αερίου.
- Πήζει το γάλα με παραγωγή αερίου.
- Ρευστοποιεί την πηκτή.
- Έχει μικρή πρωτεολυτική ικανότητα.
- Δεν παράγει ουρεάση και ινδόλη.
- Δεν παράγει καταλάση.
- Παράγει υδρόθειο και λεκιθινάση.
- Ανάγει τα νιτρικά σε νιτρώδη.

## IV. ΑΝΤΙΓΟΝΙΚΗ ΣΥΣΤΑΣΗ

Το *C. perfringens* έχει ένα ειδικό αντιγόνο ελύτρου που προκαλεί την παραγωγή αντισωμάτων με τα οποία αντιδρά και διάφορα μη ειδικά σωματικά Ο αντιγόνα. Παράγει 13 εξωτοξίνες που ονομάζονται με τα μικρά γράμματα του ελληνικού αλφάβητου (α,β,γ,δ,.....ν.). Οι τοξίνες που παράγονται από τα διάφορα στελέχη έχουν αντιγονικές διαφορές με βάση τις οποίες το βακτήριο χωρίζεται σε έξι ορολογικούς τύπους Α, Β, C, D, E και F.

## V. ΠΑΘΟΓΟΝΟΣ ΔΡΑΣΗ

Ο τύπος Α του *C. perfringens* προκαλεί στον άνθρωπο την αεριογόνο γάγγραινα.

Η αεριογόνος γάγγραινα οφείλεται σε μόλυνση τραυμάτων στα οποία γίνεται θλάση ή καταστροφή των μυών, όπως είναι τα ανοικτά τροχαία τραύματα που συνοδεύονται από κατάγματα ή τα εργατικά τραύματα. Όταν το βακτήριο εισέρχεται στο τραύμα από το

έδαφος, οι σπόροι βλαστάνουν, πολλαπλασιάζονται γρήγορα και παράγουν την τοξίνη α. Η τοξίνη εισέρχεται στις μυϊκές ίνες και τις διαλύει. Παράγει αέριο που ψηλαφάται στον υποδόριο ιστό. Μέσα σε λίγες ώρες εμφανίζεται οίδημα, πόνος και επιδεινώνεται η γενική κατάσταση του ασθενούς. Στη συνέχεια η τοξίνη μπαίνει στην κυκλοφορία, προκαλεί βαριά τοξιναιμία, σοκ και νεφρική ανεπάρκεια. Η ασθένεια καταλήγει σε θάνατο, αν δεν εφαρμοστεί έγκαιρα θεραπεία.

#### VI. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ

Το *C. perfringens* είναι μέρος της φυσιολογικής χλωρίδας του παχέος εντέρου του ανθρώπου και των ζώων. Βρίσκεται στο δέρμα του περινέου και σε άλλες περιοχές του δέρματος και σε ποσοστό 5% στον κόλπο ενήλικων γυναικών. Οι σπόροι του βακτηρίου βρίσκονται στο έδαφος, το νερό, το γάλα τη σκόνη και τα λύματα.

#### VII. ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ

Το βακτήριο αναζητείται σε υλικό ή σε υδαρές έκκριμα από την περιοχή του τραύματος. Γίνεται:

- Μικροσκοπική εξέταση του δείγματος μετά από χρώση κατά Gram. Εάν υπάρχει μόλυνση από το βακτήριο, παρατηρούνται μεγάλα Gram θετικά βακτηρίδια και έλλειψη ουδετερόφιλων λευκοκυττάρων, ενδεικτικό στοιχείο νέκρωσης των μυών.
- Καλλιέργεια με:
  1. Εμβολιασμό του δείγματος σε αιματούχο άγαρ, σε υλικό με λέκιθο του αυγού και σε υλικό με βρασμένο κρέας και επώαση σε αναερόβιες συνθήκες, σε θερμοκρασία 37° C, για 2-3 ημέρες.
  2. Ανάγνωση των καλλιεργειών μετά από επώαση 2-3 ημερών.
  3. Ταυτοποίηση με τις βασικές βιοχημικές δοκιμασίες και τη διάσπαση σακχάρων.

#### VIII. ΘΕΡΑΠΕΙΑ

Η θεραπεία στην αεριογόνο γάγγραινα είναι χειρουργικός καθαρισμός των νεκρωμένων ιστών, χορήγηση μεγάλων δόσεων πενικιλίνης και τοποθέτηση του αρρώστου σε θάλαμο υπερβαρικού οξυγόνου.



ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ	<i>C. tetani</i>	<i>C. perfringens</i>
<b>Ζύμωση</b>		
Γλυκόζη	-	+ (με αέριο)
Λακτόζη	-	+ (με αέριο)
Σουκρόζη	-	+ (με αέριο)
Μαλτόζη	-	+ (με αέριο)
<b>Παραγωγή</b>		
Ουρεάση	- (ποικίλλει κατά στέλεχος)	-
H <sub>2</sub> S	+ (μερικά στελέχη)	+
Καταλάση	-	-
Οξειδάση	-	-
Ινδόλη	+	-
Λεκιθινάση	-	+
<b>Αναγωγή</b>		
Νιτρικά σε νιτρώδη	+	+
<b>Πήξη γάλακτος</b>	-	+ (με αέριο)
<b>Ρευστοποίηση πηκτής</b>	+ (με αργό ρυθμό)	+
<b>Πρωτεολυτική ικανότητα</b>	+	+

Πίνακας 13.1: Βιοχημικές ιδιότητες του γένους *Clostridium*

## Ανακεφαλαίωση

Δύο από τα κατεξοχήν παθογόνα βακτήρια του γένους *Clostridium*, παθογόνα για τον άνθρωπο, είναι το *C. tetani* και το *C. perfringens*. Είναι και τα δύο Gram θετικά βακτηρίδια, αναερόβια και σπορογόνα. Το πρώτο προκαλεί τον τέτανο και το δεύτερο την αεριογόνο γάγγραινα, ασθένειες οι οποίες οφείλονται στην παραγωγή εξωτοξινών.

Το *C. tetani* δε ζυμώνει τα σάκχαρα και δεν πήζει το γάλα. Βρίσκεται στο έδαφος και στα κόπρανα των οικιακών ζώων και του ανθρώπου. Οι σπόροι του ζουν πολλά χρόνια στη σκόνη. Η διάγνωση γίνεται από τα κλινικά στοιχεία και το λεπτομερές ιστορικό, ενώ παράλληλα για επιβεβαίωση γίνονται μικροσκοπική εξέταση, καλλιέργεια, εμβολιασμός πειραματόζωου και προσδιορισμός τίτλου αντιτετανικών αντισωμάτων. Η πρόφύλαξη γίνεται με το τριπλό εμβόλιο και η θεραπεία με καθαρισμό του τραύματος και χορήγηση ανθρώπινης τετανικής ανοσοσφαιρίνης.

Το *C. perfringens* διασπά τη γλυκόζη, τη λακτόζη, τη σουκρόζη και τη μαλτόζη με ταυτόχρονη παραγωγή αερίου και πήζει το γάλα με παραγωγή επίσης αερίου. Ο ορολογικός τύπος Α προκαλεί στον άνθρωπο την αεριογόνο γάγγραινα. Όταν το βακτήριο εισέρχεται στο τραύμα από το έδαφος, οι σπόροι βλαστάνουν, πολλαπλασιάζονται γρήγορα και παράγουν την τοξίνη α, η οποία εισέρχεται στις μυϊκές ίνες, τις διαλύει και παράγεται αέριο υποδόρια. Οι σπόροι του βακτηρίου βρίσκονται στο έδαφος, το νερό, το γάλα τη σκόνη και τα λύματα. Η διάγνωση γίνεται με μικροσκοπική εξέταση και καλλιέργεια. Η θεραπεία της αεριογόνου γάγγραινας γίνεται με χειρουργικό καθαρισμό των νεκρωμένων ιστών και μεγάλες δόσεις πενικιλίνης.

## Ερωτήσεις

1. Ποια είναι τα κοινά μορφολογικά χαρακτηριστικά των *C. tetani* και *C. perfringens*;
2. Ποιες είναι οι διαφορές και οι ομοιότητες των βασικών βιοχημικών ιδιοτήτων των *C. tetani* και *C. perfringens*;
3. Ποια είναι η παθογόνος δράση του *C. tetani*;
4. Τι γνωρίζετε για την αεριογόνο γάγγραινα;
5. Πώς γίνεται η εργαστηριακή διάγνωση του *C. tetani*;
6. Ποια είναι η θεραπεία και η προφύλαξη από τον τέτανο;
7. Πως γίνεται η εργαστηριακή διάγνωση του *C. Perfringens*;



## 14.1. Γενικά - είδη

Το γένος των *Vibrio* περιλαμβάνει πάνω από 35 είδη. Τα βακτήρια αυτού του γένους είναι Gram αρνητικά βακτηρίδια, άσπορα, κινητά, λοφιότριχα, αερόβια και προαιρετικά αναερόβια.

14.2. *Vibrio cholerae* (Δονάκιο της χολέρας)

## I. ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ-ΧΡΩΣΗ

Το *V. cholerae* είναι μικρό Gram αρνητικό βακτηρίδιο, ευθύ ή με κάμψη. Όταν έχει κάμψη, μοιάζει με κόμμα. Κινείται με τη βοήθεια της βλεφαρίδας που έχει σε κάθε πόλο του κυττάρου του.

## II. ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ

Αναπτύσσεται στα κοινά θρεπτικά υλικά με αργό ρυθμό και σε ειδικά υλικά σε αερόβιες συνθήκες με άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης τους 37°C. Αναπτύσσεται σε αλκαλικό περιβάλλον με pH = 8-9. Η ανάπτυξη σε αλκαλικό περιβάλλον χρησιμεύει για την απομόνωσή του από τα κόπρανα, επειδή σε αυτές τις συνθήκες δεν αναπτύσσεται η *Escherichia coli*.

## III. ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ

Οι βασικές βιοχημικές ιδιότητες του *V. cholerae* είναι:

- Παράγει οξειδάση και καταλάση.
- Διασπά τη γλυκόζη, χωρίς να παράγει αέριο.
- Διασπά τη σουκρόζη.
- Διασπά αργά τη λακτόζη.
- Παράγει ινδόλη από την οξείδωση της τρυπτοφάνης.
- Δεν παράγει υδρόθειο.

	Ιδιότητες	<i>V. cholerae</i>
Διάσπαση	Γλυκόζη	+ (οξύ)
	Σουκρόζη	+
	Λακτόζη	+ (αργά)
Παραγωγή	Ινδόλη	+
	H <sub>2</sub> S	-
	Καταλάση	+
	Οξειδάση	+

Πίνακας 14.1: Βιοχημικές ιδιότητες του *V. cholerae*

#### IV. ΑΝΤΙΓΟΝΙΚΗ ΣΥΣΤΑΣΗ

Διακρίνεται σε έξι ορολογικούς τύπους που καθορίζονται από το σωματικό αντιγόνο O. Τα στελέχη του ορότυπου O:1 προκαλούν τη χολέρα.

#### V. ΠΑΘΟΓΟΝΟΣ ΔΡΑΣΗ

Το *V. cholerae*, μετά την εγκατάστασή του στο έντερο, παράγει μια εντεροτοξίνη που προκαλεί τη χολέρα. Τα συμπτώματα της χολέρας είναι:

- Μυϊκές συσπάσεις στην κοιλιά με πόνο.
- Εμετοί.
- Διαρροϊκές κενώσεις που μοιάζουν με ρυζόνερο, γιατί περιέχουν βλέννα. Το *V. cholerae* δεν προκαλεί βλάβη στο βλεννογόνο του εντέρου, όμως ο ασθενής έχει απώλεια υγρών και ηλεκτρολυτών, που είναι δυνατόν να επιφέρουν το θάνατο από αφυδάτωση.

#### VI. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ

Ο άνθρωπος μολύνεται με την άμεση επαφή και με μολυσμένο νερό και τρόφιμα. Οι μεγάλες επιδημίες χολέρας οφείλονται κυρίως στο μολυσμένο νερό.

#### VII. ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ

Το βακτήριο απομονώνεται από τις υδαρείς κενώσεις. Συγκεκριμένα:

- Πρόσφατα κόπρανα εμβολιάζονται σε σωληνάριο με αλκαλικό πεπτονούχο ζωμό και επωάζονται σε θερμοκρασία 37° C, για 6-8 ώρες, σε αερόβιες συνθήκες.
- Από τον πεπτονούχο ζωμό γίνεται ανακαλλιέργεια στο στερεό θρεπτικό υλικό TCBS άγαρ και επώαση σε θερμοκρασία 37° C, για 24 ώρες, σε αερόβιες συνθήκες. Μέρος των κοπράνων εμβολιάζεται απευθείας στο στερεό θρεπτικό υλικό TCBS άγαρ.
- Από το τρυβλίο με το στερεό θρεπτικό υλικό επιλέγουμε αποικίες που ζυμώνουν τη σουκρόζη (κίτρινες αποικίες) και γίνεται ανακαλλιέργεια στο υλικό Kligler.
- Από αποικίες του υλικού Kligler γίνονται οι βιοχημικές δοκι-

μασίες και οι δοκιμασίες συγκόλλησης με τον ειδικό πολυδύναμο αντί Ο-1 ορό πάνω σε αντικειμενοφόρο πλάκα. Εάν υπάρχει συγκόλληση, το στέλεχος χαρακτηρίζεται ως *V. cholerae*.

### VIII. ΠΡΟΦΥΛΑΞΗ

Τα σπουδαιότερα μέτρα για την προφύλαξη από τη χολέρα είναι:

- Αναφορά των κρουσμάτων, για να προλαμβάνονται τυχόν επιδημίες.
- Έργα για βελτίωση της υγειονομικής στάθμης των κατοικιών, της ύδρευσης και της αποχέτευσης.
- Βράσιμο του νερού και αποφυγή ωμών τροφών σε περίοδο επιδημίας.
- Εμβολιασμός των ατόμων που επισκέπτονται χώρες στις οποίες παρατηρούνται κρούσματα χολέρας.

### IX. ΘΕΡΑΠΕΙΑ

Χωρηγούμε ορούς, για να αποκαταστήσουμε την αφυδάτωση και τους ηλεκτρολύτες. Χημειοθεραπευτικά χορηγούνται, για να μειώσουν τον αριθμό του *V. cholerae* στο έντερο, καθώς και τη διάρκεια της μικροβιοφορίας μετά την ανάρρωση. Το *V. cholerae* είναι ευαίσθητο σε πολλά αντιβιοτικά, κυρίως όμως στην τετρακυκλίνη, που θεωρείται φάρμακο εκλογής.

## Ανακεφαλαίωση

Το *V. cholerae* είναι μικρό Gram αρνητικό βακτηρίδιο. Καλλιεργείται στα κοινά θρεπτικά υλικά με αργό ρυθμό και σε ειδικά υλικά. Παράγει οξειδάση και καταλάση, διασπά τη σουκρόζη και τη γλυκόζη, χωρίς να παράγει αέριο.

Τα στελέχη του ορότυπου O:1 προκαλούν τη χολέρα. Ο ασθενής έχει απώλεια υγρών με κίνδυνο αφυδάτωσης.

Οι μεγάλες επιδημίες χολέρας οφείλονται κυρίως στο μολυσμένο νερό. Η διάγνωση γίνεται με εμβολιασμό των κοπράνων σε υγρά και στερεά θρεπτικά υλικά (αλκαλικό πεπτονούχο ζυμό, TCBS άγαρ, Kligler).

Η προφύλαξη γίνεται κυρίως με βράσιμο του νερού και αποφυγή ωμών τροφών σε περιπτώσεις επιδημίας. Προληπτικά χορηγείται εμβόλιο.

Η θεραπεία γίνεται με ορούς και αντιβιοτικά.

## Ερωτήσεις

1. Σε ποια κατηγορία βακτηρίων ανήκει το *V. cholerae*;
2. Ποιες είναι οι βασικές βιοχημικές ιδιότητες του *V. cholerae*;
3. Ποιο στέλεχος του *V. cholerae* προκαλεί τη χολέρα;
4. Ποια είναι τα συμπτώματα της χολέρας;
5. Πώς γίνεται η εργαστηριακή διάγνωση του *V. cholerae*;
6. Πώς γίνεται η προφύλαξη και η θεραπεία από το *V. cholerae*;

### 15.1. Γενικά - είδη

Τα βακτήρια του γένους *Mycoplasma* είναι οι μικρότεροι από τους γνωστούς μικροοργανισμούς. Έχουν στον πυρήνα τους και DNA και RNA και επομένως δεν είναι ιοί. Είναι Gram αρνητικά βακτηρίδια, ακίνητα, χωρίς κυτταρικό τοίχωμα. Περιβάλλονται μόνο από κυτταρική μεμβράνη και επομένως δεν έχουν σταθερό σχήμα ούτε μεταβάλλονται σε κανονικά βακτήρια. Είναι παράσιτα και μερικά από αυτά είναι παθογόνα για τον άνθρωπο.

Αναπτύσσονται μόνο σε ειδικά θρεπτικά υλικά που περιέχουν ορό αίματος και εκχύλισμα Μυκήτων. Οι αποικίες τους είναι πολύ μικρές και μοιάζουν σαν τηγανητά αυγά μάτια.

Στο γένος αυτό ανήκουν 69 είδη. Παθογόνα για τον άνθρωπο είναι κυρίως το *Mycoplasma pneumoniae*, από τα μυκοπλάσματα του αναπνευστικού, καθώς και το *Mycoplasma hominis* και το *Ureaplasma urealyticum*, τα οποία βρίσκονται στη φυσιολογική χλωρίδα ή στα παθολογικά εκκρίματα του ουρογεννητικού συστήματος του ανθρώπου.

### 15.2. *Mycoplasma pneumoniae* (Μυκόπλασμα της πνευμονίας)

#### I. ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ - ΧΡΩΣΗ

Το σχήμα του *M. pneumoniae* ποικίλει. Μπορεί να είναι κοκκοειδές ή νηματοειδές κύτταρο με διακλαδώσεις. Δε χρωματίζεται εύκολα με τη χρώση Gram. Χρωματίζεται καλύτερα με ενισχυμένη χρώση Giemsa ή ειδικές χρώσεις.

#### II. ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ

Καλλιεργείται σε ειδικά για τα μυκοπλάσματα, υγρά και στερεά, θρεπτικά υλικά που περιέχουν ορό ίππου και εκχύλισμα Μυκήτων, εμπλουτισμένα με αντιβιοτικά, για να εμποδίζουν την ανάπτυξη άλλων μικροοργανισμών. Είναι αερόβιο και αναερόβιο, με άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης τους 37°C.

Αναπτύσσεται δύσκολα και οι αποικίες του είναι πολύ μικρές. Μοιάζουν με τηγανητά αυγά, επειδή το κέντρο της αποικίας ανα-

πτύσσεται μέσα στο θρεπτικό υλικό, ενώ η περιφέρειά της στην επιφάνεια του υλικού. Είναι διαφανείς και φαίνονται καλύτερα με φακό ή στο μικροσκόπιο με μικρή μεγέθυνση.

### III. ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ

Οι βασικές βιοχημικές ιδιότητες του *M. pneumoniae* είναι:

- Διασπά τη γλυκόζη.
- Παράγει αιμοσυγκολλητίνη που συγκολλά τα ερυθρά αιμοσφαίρια του ανθρώπου.
- Δεν υδρολύει την αργινίνη.
- Δεν υδρολύει την ουρία.

	Ιδιότητες	<i>M. pneumoniae</i>
Διάσπαση	Γλυκόζη	+
Παραγωγή	Αιμοσυγκολλητίνη	+
Υδρόλυση	Αργινίνη	-
	Ουρία	-

Πίνακας 15.1: Βιοχημικές ιδιότητες του *M. pneumoniae*

### IV. ΑΝΤΙΓΟΝΙΚΗ ΣΥΣΤΑΣΗ

Το *M. pneumoniae* παράγει ένα αντιγόνο της μεμβράνης το οποίο προκαλεί την παραγωγή αντισωμάτων. Τα αντισώματα αυτά ανιχνεύονται με όλες τις γνωστές οροδιαγνωστικές μεθόδους.

Υπάρχει μια πρωτεΐνη στην επιφάνειά του η οποία διευκολύνει την προσκόλλησή του στα επιθηλιακά κύτταρα της τραχείας και ευθύνεται για την παθογόνο δράση του.

### V. ΠΑΘΟΓΟΝΟΣ ΔΡΑΣΗ

Προκαλεί την πρωτοπαθή άτυπη πνευμονία, η οποία έχει πολύ έντονα ακτινολογικά ευρήματα, δυσανάλογα προς την κλινική εικόνα του ασθενούς. Η ασθένεια μπορεί να αυτοθεραπευθεί. Τα συμπτώματα (πυρετός, βήχας, βλενώδη πτύελα) είναι έντονα ή ήπια. Προκαλεί επίσης κάποιες άλλες ασθένειες, όπως ωτίτιδα, αρθρίτιδα, μηνιγγίτιδα κ.ά.

## VI. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ

Μεταδίδεται από το αναπνευστικό σύστημα κυρίως σε χώρους που μένουν πολλά άτομα μαζί, όπως σχολεία και στρατώνες. Είναι πιο συνηθισμένη στα παιδιά και στους νέους.

## VII. ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ

Γίνεται με:

### 1. Μικροβιολογικές εξετάσεις:

- Καλλιέργεια του ύποπτου υλικού, που συνήθως είναι πύελα, βρογχικές εκκρίσεις, ΕΝΥ κ.ά.
- Εμβολιασμός στα κατάλληλα θρεπτικά υλικά, δηλαδή ζωμό και άγαρ (δύο τρυβλία) ειδικά για το γένος *Mycoplasma*. Επωάζονται σε θερμοκρασία 37° C, το ένα τρυβλίο και ο ζωμός σε ατμόσφαιρα CO<sub>2</sub> 5% και το άλλο σε αναερόβιες συνθήκες.
- Ανάγνωση των καλλιεργειών μετά από 4 ημέρες με φακό ή με μικρή μεγέθυνση στο μικροσκόπιο.
- Χρώση των αποικιών με κυανό του μεθυλενίου, το οποίο χρωματίζει το *M. pneumoniae* γαλάζιο για πολλές ώρες, ενώ τα άλλα βακτήρια αποχρωματίζονται μετά από 30 min.
- Ανακαλλιέργεια σε βασικό ζωμό με γλυκόζη, για να το διαχωρίσουμε από τα άλλα βακτήρια του γένους *Mycoplasma*.

### 2. Ορολογικές εξετάσεις αναζήτησης των αντισωμάτων με την :

- Ανοσοενζυμική μέθοδο Elisa.
- Σύνδεση συμπληρώματος.
- Δοκιμή συγκόλλησης Latex.
- Δοκιμή έμμεσου ανοσοφθορισμού κ.ά.

## VIII. ΘΕΡΑΠΕΙΑ

Θεραπεία εκλογής είναι η θεραπεία με ερυθρομυκίνη. Είναι επίσης ευαίσθητο στις τετρακυκλίνες. Επειδή δεν έχει κυτταρικό τοίχωμα είναι ανθεκτικό στις πενικιλίνες και τα β-λακταμικά αντιβιοτικά.

### 15.3. *Mycoplasma hominis*

#### I. ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ -ΧΡΩΣΗ

Το *M. hominis* είναι κοκκοειδές ή νηματοειδές κύτταρο που αλλάζει μέγεθος και μορφή. Δε χρωματίζεται εύκολα με τη χρώση Gram. Χρωματίζεται καλύτερα με τη χρώση Giemsa.

#### II. ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ

Καλλιεργείται σε ειδικά θρεπτικά υλικά για το γένος *Mycoplasma*. Χρησιμοποιούμε έναν ειδικό θρεπτικό ζωμό, που περιέχει αργινίνη, για την αναγνώρισή του.

#### III. ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ

Οι βασικές βιοχημικές ιδιότητες του *M. hominis* είναι:

- Δε διασπά τη γλυκόζη.
- Υδρολύει την αργινίνη.
- Δεν υδρολύει την ουρία.
- Έχει μεγάλη αντοχή στην ερυθρομικίνη.

#### IV. ΑΝΤΙΓΟΝΙΚΗ ΣΥΣΤΑΣΗ

Έχει τρία επιφανειακά αντιγόνα με τα οποία διαχωρίζεται σε επτά ορότυπους.

#### V. ΠΑΘΟΓΟΝΟΣ ΔΡΑΣΗ

Προκαλεί φλεγμονές του ουρογεννητικού συστήματος, όπως οξεία σαλπινγίτιδα, αποστήματα των ωοθηκών, πυελονεφρίτιδες, μη γονοκοκκική ουρηθρίτιδα, κολπίτιδα, προστατίτιδα.

Προκαλεί όμως και άλλες ασθένειες, όπως νεογνική μηνιγγίτιδα από τη μεταφορά του *M. hominis* με τα λευκά αιμοσφαίρια πάνω στα οποία προσκολλάται.

#### VI. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ

Παρασιτεί στο κατώτερο ουρογεννητικό σύστημα του ανθρώπου και σπανιότερα στο στοματοφάρυγγα.

#### VII. ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ

Γίνεται με:

- Καλλιέργεια του ύποπτου υλικού, συνήθως εκκρίματος ουρη-



- θρικού, τραχηλικού ή κολπικού, στα ειδικά θρεπτικά υλικά.
- Εμβολιασμό στα κατάλληλα θρεπτικά υλικά, δηλαδή ζωμό και άγαρ δύο τρυβλία. Επωάζονται σε θερμοκρασία 37° C, το ένα τρυβλίο και ο ζωμός σε ατμόσφαιρα CO<sub>2</sub> 5% και το άλλο σε αναερόβιες συνθήκες.
  - Ανάγνωση των καλλιεργειών μετά από 4 ημέρες με φακό ή στο μικροσκόπιο.
  - Ανακαλλιέργεια σε βασικό ζωμό αργινίνης, για να το διαχωρίσουμε από τα άλλα Μυκοπλάσματα.

### VIII. ΘΕΡΑΠΕΙΑ

Είναι ανθεκτικό στην ερυθρομυκίνη και ευαίσθητο στη λινκομυκίνη και τις τετρακυκλίνες.

## 15.4. *Ureaplasma urealyticum*

### I. ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ - ΧΡΩΣΗ

Το *U. urealyticum* δεν έχει κυτταρικό τοίχωμα, αλλά δεν αλλάζει σχήμα, σε αντίθεση με τα άλλα Μυκοπλάσματα. Περιβάλλεται από μεμβράνη με προεκβολές, όπως τα ινίδια.

### II. ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ

Αναπτύσσεται στα ειδικά θρεπτικά υλικά των Μυκοπλασμάτων, αλλά οι αποικίες του είναι πολύ μικρές και δεν είναι σαν τηγανητά αυγά μάτια.

### III. ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ

- Οι βασικές βιοχημικές ιδιότητες του *U. urealyticum* είναι:
- Δε διασπά τα σάκχαρα.
  - Δεν υδρολύει την αργινίνη.
  - Υδρολύει την ουρία, ιδιότητα που το διαχωρίζει από τα άλλα Μυκοπλάσματα.

### IV. ΠΑΘΟΓΟΝΟΣ ΔΡΑΣΗ

Προκαλεί ουρηθρίτιδα και προστατίτιδα στους άνδρες και είναι το συχνότερο αίτιο μη γονοκοκκικής ουρηθρίτιδας μετά τα Χλαμύδια.



Στις γυναίκες προκαλεί κολπίτιδα, τραχηλίτιδα, σαλπινγγίτιδα και στις εγκυμονούσες είναι δυνατόν να προκαλέσει αυτόματη αποβολή, επιλόχειο πυρετό κ.ά. Πολύ σπάνια προκαλεί ασθένειες σε άλλα συστήματα εκτός από το ουρογεννητικό.

#### V. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ

Παρασιτεί στην ανδρική ουρήθρα, στο γυναικείο κόλπο και σπέρμα στο ορθό και στη στοματοφαρυγγική κοιλότητα.

#### VI. ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ

Γίνεται με:

- Καλλιέργεια του ύποπτου υλικού, συνήθως εκκρίματος ουρηθρικού, τραχηλικού ή κολπικού, σε ειδικά θρεπτικά υλικά.
- Εμβολιασμό στα κατάλληλα θρεπτικά υλικά, δηλαδή ζωμό και άγαρ (δύο τρυβλία). Επώάζονται όλα σε θερμοκρασία 37° C, το ένα τρυβλίο και ο ζωμός σε ατμόσφαιρα CO<sub>2</sub> 5% και το άλλο τρυβλίο σε αναερόβιες συνθήκες.
- Ανάγνωση των καλλιεργειών μετά από 4 ημέρες με φακό ή με μικρή μεγέθυνση στο μικροσκόπιο.
- Ανακαλλιέργεια σε βασικό ζωμό με ουρία, για να το διαχωρίσουμε από τα άλλα Μυκοπλάσματα.
- Για να διαχωρίσουμε το *M. hominis* από το *U. urealyticum*, ανακαλλιεργούμε επίσης σε στερεό καλλιέργημα με ένα δισκίο εμποτισμένο με ορό αντι- *M. hominis*. Γύρω από το δισκίο δε θα αναπτυχθεί το *M. hominis*, ενώ αντίθετα θα αναπτυχθεί το *U. urealyticum*.
- Δοκιμή ευαισθησίας στα αντιβιοτικά σε σωληνάρια που περιέχουν ζωμό Μυκοπλασμάτων.

#### VII. ΘΕΡΑΠΕΙΑ

Είναι ευαίσθητο στην ερυθρομυκίνη και τις τετρακυκλίνες και ανθεκτικό στη λινκομυκίνη.

Ιδιότητες	<i>M. pneumoniae</i>	<i>M. hominis</i>	<i>U. urealyticum</i>
<b>Διάσπαση</b>			
Γλυκόζη	+	-	-
<b>Παραγωγή</b>			
Αιμοσυγκολλητίνη	+	-	-
<b>Υδρόλυση</b>			
Αργινίνη	-	+	-
Ουρία	-	-	+
<b>Αντοχή</b>			
Ερυθρομικίνη	-	+	-

Πίνακας 15.2: Βιοχημικές ιδιότητες των Μυκοπλασμάτων

## Ανακεφαλαίωση

Τα Μυκοπλάσματα είναι τα μικρότερα βακτήρια. Δεν έχουν κυτταρικό τοίχωμα ούτε σταθερό σχήμα, έχουν όμως στον πυρήνα τους και DNA και RNA και επομένως δεν είναι ιοί.

Αναπτύσσονται σε ειδικά θρεπτικά υλικά. Οι αποικίες τους είναι πολύ μικρές και μοιάζουν με τηγανητά αυγά μάτια.

Παθογόνα για τον άνθρωπο είναι κυρίως τα *M. pneumoniae*, *M. hominis* και *U. urealyticum*.

Το *M. pneumoniae* προκαλεί την ασθένεια άτυπη πνευμονία, η οποία προσβάλλει κυρίως τα παιδιά και τους νέους και μεταδίδεται με τα σταγονίδια του βήχα σε χώρους που συγκεντρώνονται πολλά άτομα, όπως σχολεία και στρατώνες.

Το *M. hominis* και το *U. urealyticum* προκαλούν κυρίως ασθένειες στο ουρογεννητικό σύστημα, όπως ουρηθρίτιδες, προστατίτιδες, κολπίτιδες, σαλπγγίτιδες κ.ά.

## Ερωτήσεις

1. Τι γνωρίζετε για τα Μυκοπλάσματα;
2. Πού καλλιεργούνται τα Μυκοπλάσματα; Περιγράψτε τις αποικίες τους στα στερεά θρεπτικά υλικά.
3. Πώς διαχωρίζονται τα Μυκοπλάσματα μεταξύ τους;
4. Σε ποια βιολογικά υλικά αναζητούμε τα Μυκοπλάσματα;
5. Περιγράψτε την παθογόνο δράση του *M. pneumoniae*.

### 16.1. Γενικά - είδη

Το γένος *Chlamydia* περιλαμβάνει τρία είδη, παθογόνα για τον άνθρωπο, το *Chlamydia psittaci*, που προκαλεί την ασθένεια ορνίθωση ή ψιπτάκωση από τα περιττώματα των περιστερών και των παπαγάλων, το *Chlamydia pneumoniae*, που προκαλεί οξείες ασθένειες του αναπνευστικού, και το *Chlamydia trachomatis*. Δεν αναπτύσσονται σε θρεπτικά υλικά. Αναπτύσσονται μόνο σε ζωντανά κύτταρα στον οργανισμό (in vivo) και στο εργαστήριο (in vitro), όπου πολλαπλασιάζονται με διχοτόμηση και παράγουν τα κυτταρικά έγκλειστα. Τα κυτταρικά έγκλειστα είναι πολλά χλαμύδια μαζί που περιβάλλονται από μια ουσία, που μοιάζει με χλαμύδα, από την οποία πήραν το όνομά τους. Έχουν κυτταρικό τοίχωμα και διαφέρουν από τους ιούς, επειδή έχουν στον πυρήνα τους και DNA και RNA.

### 16.2. *Chlamydia trachomatis* (Χλαμύδιο του τραχώματος)

#### I. ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ - ΧΡΩΣΗ

Το *C. trachomatis* είναι βακτήριο Gram αρνητικό, μικρό, σφαιρικό, ακίνητο, το οποίο παράγει κυτταρικά έγκλειστα.

#### II. ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ

Δεν αναπτύσσεται στα θρεπτικά υλικά του εργαστηρίου. Χρησιμοποιούνται για την ανάπτυξή του ειδικά ζωντανά κύτταρα, μέσα στα οποία μετά από 72 ώρες παράγονται τα κυτταρικά έγκλειστα.

#### III. ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ

Διασπά τη γλυκόζη, το πυροσταφυλικό οξύ και το γλουταμινικό οξύ με παραγωγή CO<sub>2</sub>. Για τη βιοσύνθεσή του χρειάζεται το μεταβολικό μηχανισμό του κυτάρου στο οποίο παρασιτεί.

Η αδρανοποίησή του γίνεται με θέρμανση στους 60° C, για 10 min, με αιθέρα και με φαινόλες.

#### IV. ΑΝΤΙΓΟΝΙΚΗ ΣΥΣΤΑΣΗ

Έχει δύο αντιγόνα με βάση τα οποία διαχωρίζεται σε ορότυπους:

- Του τοιχώματος, κοινό για όλα τα στελέχη (μοιάζει με το

αντιγόνο των Εντεροβακτηριακών).

- Της εξωτερικής μεμβράνης.

#### V. ΠΑΘΟΓΟΝΟΣ ΔΡΑΣΗ

Οι χλαμυδιάσεις είναι ασθένειες που εντοπίζονται σε διάφορα όργανα. Είναι οι πιο συνηθισμένες από τις ασθένειες που μεταδίδονται σεξουαλικά και είναι οι εξής:

- **Μη γονοκοκκικές λοιμώξεις του ουρογεννητικού συστήματος:** Στους άνδρες προκαλεί τη μη γονοκοκκική ουρηθρίτιδα, η οποία συχνά συνοδεύεται από γονοκοκκική ουρηθρίτιδα (βλεννόρροια) που οφείλεται στη *Neisseria gonorrhoeae*. Προκαλεί ακόμα και επιδιδυμίτιδα, που μπορεί να επιφέρει στέρωση. Στις γυναίκες προκαλεί τραχηλίτιδα, σαλπινγίτιδα, βαρθολινίτιδα και πρωκτίτιδα. Συνήθως συνυπάρχουν *Μύκητες (Candida)*, *Τριχομονάδες*, *ιός Έρπητα*, *Neisseria gonorrhoeae*. Πρέπει να γίνεται θεραπεία και στους δύο συντρόφους. Αν δεν αντιμετωπισθεί έγκαιρα, υπάρχει πιθανότητα να προκαλέσει στέρωση.
- **Οφθαλμικές παθήσεις:** Επιπεφυκίτιδα μετ' εγκλείστων, επιπεφυκίτιδα κολυμβητικών δεξαμενών, νεογνική επιπεφυκίτιδα σε νεογνά από μητέρες με χλαμυδιακή τραχηλίτιδα.
- **Τράχωμα:** Οφείλεται σε συγκεκριμένους ορότυπους και προκαλεί υπερτροφία του άνω βλεφάρου, εξελκώσεις του επιπεφυκότα, βλεννοπυώδες έκκριμα. Η ασθένεια αυτοθεραπεύεται, αλλά υποτροπιάζει και, αν επιμολυνθεί από κοινά βακτήρια, μπορεί να προκαλέσει τύφλωση εξαιτίας της βλάβης του κερατοειδούς χιτώνα.
- **Νεογνική πνευμονία:** Παρουσιάζεται σε βρέφη κάτω των έξι μηνών, συνήθως σε παιδιά μητέρων που πάσχουν από χλαμυδιάσεις.
- **Αφροδίσιο λεμφοκοκκίωμα:** Οφείλεται σε συγκεκριμένους ορότυπους που έχουν μεγάλη διεισδυτικότητα. Μεταδίδεται με τη σεξουαλική επαφή και αρχίζει με ουρηθρίτιδα ή λεμφαδενίτιδα. Εάν δε θεραπευθεί έγκαιρα, οι λεμφαδένες διαπυούνται και έχουμε καταστροφή των γύρω ιστών και εκροή πύου.

## VI. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ

Το *C. trachomatis* δεν μπορεί να ζήσει ελεύθερα, αλλά παρασιτεί στα επιθηλιακά κύτταρα των βλεννογόνων του ανθρώπου, των πτηνών και των ζώων.

## VII. ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ

Γίνεται με:

- Μικροσκοπική εξέταση επιχρισμάτων ή ξεσμάτων για την ανεύρεση εγκλείστων στα επιθηλιακά κύτταρα της περιοχής που πάσχει (από τον τράχηλο της μήτρας λαμβάνονται με ψηκτροειδή σπειλέο). Η μικροσκοπική εξέταση γίνεται με χρώση Giemsa, άμεσο ανοσοφθορισμό και χρώση ανοσοϊεροξειδάσης.
- Καλλιέργεια σε ειδικά ζωντανά κύτταρα.
- Ορολογικές διαγνωστικές μεθόδους, όπως σύνδεση συμπληρώματος, μικροανοσοφθορισμό.
- Αναζήτηση αντιγόνου στο κλινικό δείγμα με ανοσοενζυμικές μεθόδους (στις ουρογεννητικές λοιμώξεις χρησιμοποιείται ενδοτραχηλικό στις γυναίκες και ουρηθρικό έκκριμα στους άνδρες).
- Σε ορισμένες περιπτώσεις είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθεί η PCR για την αναζήτηση του DNA του βακτηρίου.

## VIII. ΠΡΟΦΥΛΑΞΗ

Το τράχωμα ενδημεί στις χώρες της Αφρικής. Στην Ελλάδα έχει εκλείψει μετά τον αντιτραχωματικό αγώνα που έγινε το 1920 - 1945.

Πρέπει να λαμβάνονται τα κλασικά μέτρα προστασίας από τις μεταδιδόμενες σεξουαλικά ασθένειες και να γίνεται έγκαιρα θεραπεία των ασθενών και των συντρόφων τους.

Στον ορό, στο αίμα και τις εκκρίσεις των βλεννογόνων των ασθενών βρίσκονται αντισώματα στην αρχή της νόσου, τα οποία όμως δεν προστατεύουν από επαναμολύνσεις

## IX. ΘΕΡΑΠΕΙΑ

Η θεραπεία γίνεται με ερυθρομυκίνη ή τετρακυκλίνη.

## Ανακεφαλαίωση

Το γένος *Chlamydia* περιλαμβάνει τρία είδη, παθογόνα για τον άνθρωπο, τα οποία δεν αναπτύσσονται στα θρεπτικά υλικά του εργαστηρίου αλλά σε ζωντανά κύτταρα. Είναι Gram αρνητικά, μικρά, σφαιρικά, ακίνητα βακτήρια και σχηματίζουν κυτταρικά έγκλειστα. Διαφέρουν από τους ιούς, επειδή έχουν στον πυρήνα τους και DNA και RNA.

Οι ασθένειες που προκαλούν μεταδίδονται κυρίως σεξουαλικά και, αν δεν αντιμετωπισθούν έγκαιρα, μπορεί να προκαλέσουν τύφλωση ή στείρωση. Η διάγνωσή τους γίνεται κυρίως με μικροσκοπική εξέταση των επιχρισμάτων, μετά από χρώση Giemsa, για την αναζήτηση των εγκλείστων και με ανοσοενζυμικές μεθόδους (Elisa) στο ενδοτραχηλικό και ουρηθρικό έκκριμα.

## Ερωτήσεις

1. Περιγράψτε τη μορφολογία του *C. trachomatis*.
2. Σε τι διαφέρουν τα βακτήρια του γένους *Chlamydia* από τους ιούς;
3. Ποιες ασθένειες προκαλεί το *C. trachomatis*;
4. Πώς γίνεται η εργαστηριακή διάγνωση των ασθενειών από *C. trachomatis*;
5. Πού καλλιεργείται το *C. trachomatis*;



ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ

2

ΜΕΡΟΣ ΔΕΥΤΕΡΟ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ

### 1.1. Γενικά

Τα δείγματα των διαφόρων φυσιολογικών ή παθολογικών υλικών που λαμβάνονται από το σώμα του αρρώστου, στέλνονται για μικροβιολογική εξέταση και καλλιέργεια στο εργαστήριο με σκοπό να απομονώσουμε το παθογόνο βακτήριο το οποίο προκάλεσε την ασθένεια.

Με την *καλλιέργεια* πετυχαίνουμε δύο βασικούς στόχους: Πρώτα απομονώνουμε το *παθογόνο αίτιο* της ασθένειας και έπειτα ελέγχουμε την *ευαισθησία του βακτηρίου στα διάφορα αντιβιοτικά*, ώστε να βοηθήσουμε στη θεραπεία.

Αν το υλικό προέρχεται από περιοχή του σώματος που φυσιολογικά δεν υπάρχουν βακτήρια, η τεχνική της καλλιέργειας είναι απλή και η αξιολόγηση του αποτελέσματος εύκολη. Αντίθετα, αν το εξεταστέο υλικό προέρχεται από περιοχή του σώματος που φυσιολογικά υπάρχει μικροβιακή χλωρίδα ή επιμολύνεται το δείγμα από διάφορα βακτήρια κατά τη λήψη, η τεχνική της καλλιέργειας είναι διαφορετική και η αξιολόγησή της δύσκολη.

Έτσι οι καλλιέργειες διακρίνονται σε *καλλιέργειες υλικών φυσιολογικά στείρων* (αίμα, ΕΝΥ, υγρά από παρακεντήσεις) και σε *καλλιέργειες υλικών με μικροβιακή χλωρίδα* (φαρυγγικό και ρινικό επίχρισμα, πύελα, κόπρανα, κολπικό και ουρηθρικό έκκριμα, υλικό δερματικών βλαβών, τριχών κ.τ.λ.).

Η διαδικασία της καλλιέργειας είναι η εξής:

- Λήψη δείγματος.
- Μικροσκοπική εξέταση άμεσου παρασκευάσματος, όπου χρειάζεται.
- Σπορά σε θρεπτικά υλικά και επώαση.
- Ανάγνωση των καλλιεργειών, δηλαδή αναζήτηση των αποικιών παθογόνων βακτηρίων (μακροσκοπική και μικροσκοπική εξέταση αποικιών και καλλιεργημάτων).
- Απομόνωση ύποπτων αποικιών με ανακαλλιέργεια.
- Δοκιμές ταυτοποίησης:
  1. Μακροσκοπική εξέταση.
  2. Μικροσκοπική εξέταση.
  3. Βιοχημικές δοκιμασίες κ.τ.λ.

- Δοκιμή ευαισθησίας στα αντιβιοτικά.
- Αξιολόγηση και γραπτή έκθεση του αποτελέσματος.

## 1.2. Μελέτη υγρών και εκκρινμάτων

### Ι. ΛΗΨΗ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ ΓΙΑ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ

Το κατάλληλο δείγμα είναι απαραίτητη προϋπόθεση για την επιτυχία οποιασδήποτε μικροβιολογικής εξέτασης. Αυτό θα εξασφαλιστεί, αν τηρηθούν οι σωστοί τρόποι λήψης, συντήρησης και αποστολής στο εργαστήριο.

Τα τεχνικά μέσα λήψης, ανάλογα με τη φύση του δείγματος, είναι:

- Στειλεοί (βαμβakoφόροι, κρικοφόροι κ.τ.λ.)
- Σύριγγες, λαβίδες, νυστεράκια κ.τ.λ.

Τα μέσα λήψης των δειγμάτων, καθώς και τα δοχεία συλλογής και τοποθέτησής τους, πρέπει να είναι *αποστειρωμένα*.

Η λήψη πρέπει να γίνεται κάτω από άσπτες συνθήκες, ώστε να αποφεύγεται η επιμόλυνση του δείγματος από τα βακτήρια του περιβάλλοντος. Έτσι γίνεται από ένα σημείο της λοίμωξης με τις λιγότερες πιθανότητες επιμόλυνσης από τους γύρω ιστούς, όργανα και εκκρίσεις. Πρέπει επίσης να γίνεται πριν από τη λήψη αντιβιοτικών και η ποσότητα του δείγματος να είναι αρκετή. Σε μερικούς μικροοργανισμούς (π.χ. Βρουκέλλες) η συλλογή του δείγματος πρέπει να γίνεται στη σωστή χρονική στιγμή.

Αν το δείγμα δεν εμβολιαστεί αμέσως μετά τη λήψη στα κατάλληλα θρεπτικά υλικά, πρέπει να μπει σε κατάλληλο υλικό συντήρησης και μεταφοράς στο εργαστήριο. Τα υλικά συντήρησης δεν περιέχουν θρεπτικούς παράγοντες. Σκοπό έχουν να διατηρήσουν τα βακτήρια, αριθμητικά και βιολογικά, αναλλοίωτα. Δεν επιτρέπουν επομένως την ανάπτυξη του βακτηρίου, αλλά ούτε και την ξήρανση και καταστροφή του.

Τα δείγματα που λαμβάνονται με βαμβakoφόρο στείλεό μπαίνουν συνήθως στο υλικό συντήρησης και μεταφοράς Stuart. Υπάρχουν ειδικά υλικά λήψης και συντήρησης αναερόβιων βακτηρίων, καθώς και βακτηρίων σε ατμόσφαιρα CO<sub>2</sub>.

Στα δοχεία συλλογής και τοποθέτησης των δειγμάτων πρέπει να υπάρχει ετικέτα στην οποία να αναγράφεται το όνομα του ασθενούς, το είδος του δείγματος, η ημερομηνία και η ώρα της λήψης, το όνομα του γιατρού που στέλνει το δείγμα, καθώς και οι εξετάσεις που πρέπει να γίνουν. Απαραίτητο είναι να συνοδεύεται το δείγμα με ένα μικρό ιστορικό του ασθενούς.

## II. ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΚΗ ΕΞΕΤΑΣΗ ΑΜΕΣΟΥ ΠΑΡΑΣΚΕΥΑΣΜΑΤΟΣ

Όταν το δείγμα έρχεται στο εργαστήριο, αριθμείται τόσο το αποστειρωμένο σκεύος, όσο και το παραπεμπτικό που το συνοδεύει.

Ανάλογα με τη φύση του δείγματος γίνεται ή όχι μικροσκοπική μελέτη άμεσων παρασκευασμάτων, νωπών ή ξηρών.

Σε δείγματα, όπως τα κόπρανα ή το φαρυγγικό επίχρισμα, δε χρειάζεται μικροσκοπική εξέταση άμεσων παρασκευασμάτων, επειδή υπάρχουν πολλά βακτήρια της φυσιολογικής χλωρίδας.

Σε άλλα δείγματα όμως, όπως το πύο ή τα πτύελα, η μικροσκοπική εξέταση άμεσων παρασκευασμάτων προσφέρει μεγάλη βοήθεια. Στα πτύελα π.χ. μας δίνει πληροφορίες για την καταλληλότητα του δείγματος. Αν παρατηρούνται πάνω από 10 πυοσφαίρια κατά οπτικό πεδίο και λιγότερα από 25 επιθηλιακά κύτταρα, βγάζουμε το συμπέρασμα ότι το δείγμα είναι πράγματι πτύελα και όχι σάλιο.

Η μικροσκοπική εξέταση άμεσων παρασκευασμάτων ορισμένων δειγμάτων μας δίνει πολύτιμες πληροφορίες για το είδος ή τα είδη των βακτηρίων που υπάρχουν και επικρατούν στο δείγμα (μέγεθος, σχήμα, διάταξη κυττάρων και ανταπόκρισή τους στη χρώση Gram). Έτσι μπορούμε να επιλέξουμε τα κατάλληλα θρεπτικά υλικά για τον εμβολιασμό και να επιτύχουμε τη γρήγορη ταυτοποίηση του βακτηρίου, κερδίζοντας πολύτιμο χρόνο για τον ασθενή, αφού θα αρχίσει η θεραπεία γρηγορότερα.

## III. ΕΜΒΟΛΙΑΣΜΟΣ ΣΕ ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΕΠΩΑΣΗ

Γνωρίζοντας τη φυσιολογική μικροβιακή χλωρίδα αλλά και τα παθογόνα βακτήρια που συνήθως προκαλούν λοίμωξη στις διάφορες περιοχές του σώματος και ανάλογα με την περιοχή από την οποία προέρχεται το δείγμα, επιλέγουμε τα κατάλληλα θρεπτικά υλικά για τον εμβολιασμό.

Στο εμπόριο κυκλοφορούν δεκάδες θρεπτικά υλικά, κοινά, εμπλου-



Εικόνα 1.1: Διάφορα υλικά καλλιέργειών

τισμένα, εκλεκτικά, διαχωριστικά και χρωμογόνα. Μπορούμε επίσης να παρασκευάσουμε και να διατηρήσουμε στο εργαστήριο θρεπτικά υλικά σε στερεή, υγρή ή ημίρρευστη μορφή. Συνήθως στην καθημερινή πράξη επιλέγουμε ένα μικρό αριθμό εμπλουτισμένων και εκλεκτικών θρεπτικών υλικών.

Το υλικό που στηρίζει την ανάπτυξη των περισσότερων βακτηρίων είναι το αιματούχο άγαρ. Είναι ένα εμπλουτισμένο θρεπτικό υλικό στο οποίο εμβολιάζεται αρχικά ένα δείγμα, ανεξάρτητα από πού έχει ληφθεί. Άλλα πιο εμπλουτισμένα αιματούχα άγαρ είναι το σοκολατόχρωμο (*Streptococcus pneumoniae*), το Lewinthal (*Neisseria meningitidis*), το Thayer-Martin (*Neisseria gonorrhoeae*) κ.ά.

Τα εκλεκτικά θρεπτικά υλικά, όπως το Charman άγαρ, και τα διαχωριστικά, όπως το Mac Conkey άγαρ, υποβοηθούν την ανάπτυξη ορισμένου ή μερικών ειδών βακτηρίων και αναστέλλουν την ανάπτυξη άλλων. Βοηθούν επίσης πολύ στην απομόνωση και την ταυτοποίηση

των ύποπτων βακτηρίων.

Υπάρχουν ακόμη θρεπτικά υλικά για ειδικές καλλιέργειες απαιτητικών βακτηρίων, όπως π.χ. το Löwenstein-Jensen, που χρησιμοποιείται για την ανάπτυξη του *Mycobacterium tuberculosis*.

Για να είναι εύκολη η μελέτη της μορφολογίας των αποικιών που θα αναπτυχθούν στα στερεά θρεπτικά υλικά, εμβολιάζουμε με τη μέθοδο των αραιώσεων, ώστε να λάβουμε μεμονωμένες αποικίες. Ο τρόπος αυτός εφαρμόζεται κυρίως στα κοινά (π.χ. θρεπτικό άγαρ), στα εμπλουτισμένα (π.χ. αιματούχο άγαρ) και τα διαχωριστικά (π.χ. MacConkey άγαρ) θρεπτικά υλικά. Στα εκλεκτικά θρεπτικά υλικά (π.χ. Charman, Sabouraud άγαρ) αρκεί μια απλή επίστρωση σε μικρή περιοχή του τρυβλίου.

Η επώαση των καλλιεργημάτων γίνεται σε κλίβανο θερμοκρασίας 37°C συνήθως και με συγκεκριμένο βαθμό υγρασίας. Ανάλογα με τη σύσταση της ατμόσφαιρας μέσα στον κλίβανο, έχουμε την αερόβια επώαση (με την παρουσία οξυγόνου), την επώαση (σε ατμόσφαιρα CO<sub>2</sub>) και την αναερόβια επώαση (χωρίς οξυγόνο).

Ανάλογα με τα βακτήρια που υποπευόμαστε ότι ευθύνονται για τη λοίμωξη στη συγκεκριμένη περιοχή του σώματος, επιλέγουμε, εκτός από τα κατάλληλα θρεπτικά υλικά, και τις κατάλληλες συνθήκες επώασης.

#### IV. ΑΝΑΓΝΩΣΗ ΤΩΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ - ΑΝΑΖΗΤΗΣΗ ΥΠΟΠΤΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ

Μετά την επώαση αναζητούμε στην επιφάνεια των στερεών θρεπτικών υλικών, με μεγεθυντικό φακό χεριού, ύποπτες αποικίες βακτηρίων. Η μορφολογία των αποικιών αποτελεί σπουδαίο κριτήριο για το διαχωρισμό των βακτηρίων.

Στη μακροσκοπική εξέταση των αποικιών μελετάμε:

- Το σχήμα (π.χ. κυκλικό, ακτινοειδές)
- Το μέγεθος (μετράμε τη διάμετρο σε mm)
- Το ύψος (π.χ. αποικία επηρμένη, θολωτή, χαμηλή)
- Την όψη της επιφάνειας (π.χ. ομαλή, ρυτιδιασμένη)
- Τα άκρα (π.χ. περιγεγραμμένη, κυματοειδής)
- Το χρώμα (π.χ. άσπρη, κίτρινη)

- Τη διαφάνεια (π.χ.θολερή, διαφανής)
- Τη σύσταση (π.χ.βλεννώδης)

Ελέγχοντας τις μεταβολές που προκαλεί η ανάπτυξη των βακτηρίων στο υπόστρωμα των στερεών θρεπτικών υλικών, αναζητούμε:

1. Το είδος της αιμόλυσης που δημιουργείται γύρω από τις αποικίες οι οποίες αναπτύσσονται στο αιματούχο άγαρ (β-αιμόλυση, δηλαδή διαυγής ζώνη, α-αιμόλυση, δηλαδή πράσινη ζώνη).
2. Την παραγωγή χρωστικής και την αλλαγή του χρώματος του υποστρώματος (π.χ. η πυοκυανίνη από την *Pseudomonas aeruginosa* προκαλεί πρασίνισμα του υλικού).
3. Την παραγωγή μυρωδιάς (π.χ. όμοια με γιασεμί από την *Pseudomonas aeruginosa*).
4. Την αλλαγή του χρώματος του θρεπτικού υλικού λόγω της ζύμωσης σακχάρων (π.χ. η ζύμωση της μαννιτόλης από το *Staphylococcus aureus* προκαλεί στο Charman άγαρ κιτρίνισμα του θρεπτικού υλικού).

Η ανάπτυξη των βακτηρίων στα υγρά θρεπτικά υλικά μπορεί να προκαλέσει θόλωση του υλικού, ομοιόμορφη ή πιο έντονη στον πυθμένα ή την επιφάνεια. Άλλες φορές μπορεί να εμφανιστεί μικρή ή μεγάλη κροκίδωση που αιωρείται ή καθιζάνει στον πυθμένα του σωληναρίου. Μπορεί ακόμα να εμφανιστεί υμένιο στην επιφάνεια του υγρού θρεπτικού υλικού, λεπτό ή παχύ.

Έπειτα από τη μακροσκοπική μελέτη των αποικιών και των καλλιεργημάτων και έχοντας εντοπίσει τις ύποπτες αποικίες, παίρνουμε με κρικοφόρο στείλεό μέρος μιας ύποπτης αποικίας. Παρασκευάζουμε νωπά ή ξηρά παρασκευάσματα, τα χρωματίζουμε και κάνουμε μικροσκοπική εξέταση.

Με τη μικροσκοπική εξέταση μελετάμε το μέγεθος, το σχήμα, τη διάταξη του βακτηρίου στο χώρο, καθώς και το πώς χρωματίζεται με τη χρώση Gram.

Με τη μακροσκοπική και τη μικροσκοπική μελέτη των αποικιών εντοπίζουμε το ύποπτο βακτήριο.

#### V. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΥΠΟΠΤΩΝ ΑΠΟΙΚΙΩΝ ΜΕ ΑΝΑΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ

Απομόνωση ενός βακτηρίου λέγεται ο διαχωρισμός του από τα άλλα βακτήρια της χλωρίδας του δείγματος και η λήψη του για καθαρή καλλιέργεια.

Αφού εκτελέσουμε τη μακροσκοπική και τη μικροσκοπική εξέταση των αποικιών, έχουμε καταλήξει στο ή στα πιθανά παθογόνα βακτήρια. Με κρικοφόρο στείλεό παίρνουμε το υπόλοιπο μέρος της ύποπτης αποικίας που εξετάσαμε και ανακαλλιεργούμε σε νέα θρεπτικά υλικά. Επωάζουμε τα τρυβλία και παίρνουμε το ή τα ύποπτα βακτήρια σε καθαρές καλλιέργειες. Από τις καθαρές καλλιέργειες των βακτηρίων θα γίνουν οι δοκιμασίες ταυτοποίησης.

#### VI. ΔΟΚΙΜΕΣ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ

Ο προσδιορισμός του είδους του βακτηρίου είναι από τις πιο δύσκολες εργασίες στο εργαστήριο. Με τον όρο ταυτοποίηση εννοούμε τον ακριβή προσδιορισμό του είδους του βακτηρίου. Η συνολική διαδικασία, για να καταλήξουμε στην ταυτοποίηση των βακτηρίων, ονομάζεται εργαστηριακή διαφορική διάγνωση και απαιτεί γνώσεις, εμπειρία και ικανότητα.

Οι βασικοί τρόποι εφαρμογής της μικροβιολογικής έρευνας, ώστε να αναγνωριστεί και να χαρακτηριστεί το παθογόνο αίτιο της λοίμωξης, είναι:

- Η μακροσκοπική μελέτη της μορφολογίας των αποικιών του βακτηρίου.
- Η μικροσκοπική μελέτη των κυττάρων του βακτηρίου μετά από χρώση (συνήθως Gram).
- Η εκτέλεση βιοχημικών δοκιμασιών.
- Η ευαισθησία ή η αναστολή ανάπτυξης του βακτηρίου σε ουσίες ή αντιβιοτικά συγκεκριμένης συγκέντρωσης (π.χ. βακτρασίνη).
- Ο έλεγχος των βιολογικών χαρακτήρων του βακτηρίου, όπως η αιμολυτική του ικανότητα, όταν αναπτύσσεται σε αιματούχο άγαρ, ο έλεγχος κινητικότητας κ.ά.
- Οι ορολογικές αντιδράσεις.
- Η ταυτοποίηση του βακτηρίου με ανοσολογικές μεθόδους. Με



τις μεθόδους αυτές ταυτοποιούμε τα βακτήρια χρησιμοποιώντας σεσημασμένα αντιγόνα ή αντισώματα. Χρησιμοποιούμε ακόμη ραδιενεργά βιομόρια. Τέτοιες τεχνικές είναι ο άμεσος και έμμεσος ανοσοφθορισμός, η ανοσοηλεκτροφόρηση, οι ενζυματικές τεχνικές (Elisa) και η χρήση ραδιοϊσότοπων.

- Η αναζήτηση του βακτηρίου με τεχνικές της μοριακής βιολογίας. Με τη μέθοδο αυτή πολλαπλασιάζουμε το DNA ενός βακτηρίου που βρίσκεται σε πολύ μικρή ποσότητα στο δείγμα μας και το μελετάμε με άλλες μεθόδους π.χ. αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).
- Η παθογόνος δράση του βακτηρίου σε πειραματόζωα.

## VII. ΔΟΚΙΜΗ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑΣ ΣΤΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ-ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ-ΓΡΑΠΤΗ ΕΚΘΕΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΟΣ

Κάθε θετική καλλιέργεια τελειώνει με το αντιβιογράμμα, δηλαδή τον έλεγχο της ευαισθησίας του παθογόνου βακτηρίου στα αντιβιοτικά.

Σκοπός του αντιβιογράμματος είναι να βρεθεί το καταλληλότερο αντιβιοτικό για το συγκεκριμένο βακτήριο, γεγονός που θα βοηθήσει στη ριζική θεραπεία του ασθενούς.

Για να γίνει η αξιολόγηση μιας καλλιέργειας, χρειάζεται γνώση της φυσιολογικής μικροβιακής χλωρίδας και των βακτηρίων που μπορούν να προκαλέσουν νόσο στη συγκεκριμένη περιοχή. Πρέπει να έχουμε εμπειρία όσον αφορά τη μακροσκοπική και μικροσκοπική μελέτη των αποικιών. Η επιλογή των κατάλληλων κάθε φορά θρεπτικών υλικών, συνθηκών επώασης και βιοχημικών δοκιμασιών έχουν μεγάλη σημασία για την απομόνωση των παθογόνων βακτηρίων.

Στη γραπτή έκθεση του αποτελέσματος αναγράφεται το βακτήριο που αξιολογήθηκε ως ο παθογόνος παράγοντας για τη λοίμωξη και όχι όλα τα βακτήρια που τυχόν αναπτύχθηκαν.

Στα αποτελέσματα του αντιβιογράμματος το βακτήριο χαρακτηρίζεται:

**Ευαίσθητο:** Όταν η ζώνη αναστολής της ανάπτυξής του είναι ίση ή μεγαλύτερη από τη ζώνη αναστολής που δημιουργείται κατά την ανάπτυξη ενός προτύπου-στελέχους.

**Μέτρια ευαίσθητο:** Όταν η ζώνη αναστολής της ανάπτυξης του βακτηρίου είναι μικρότερη κατά 2mm από τη ζώνη αναστολής που



δημιουργείται κατά την ανάπτυξη ενός προτύπου-στελέχους.

Ανθεκτικό: Όταν δεν υπάρχει ζώνη αναστολής ή αυτή που υπάρχει είναι πολύ μικρότερη (περισσότερο από 2mm) από τη ζώνη αναστολής του προτύπου-στελέχους.

Ο κλινικός γιατρός παίρνει την απάντηση από το μικροβιολογικό εργαστήριο και, έχοντας υπόψη την κλινική εικόνα του ασθενούς, επιλέγει και χορηγεί ένα ή περισσότερα αντιβιοτικά, ώστε η θεραπεία της βακτηριακής νόσου να είναι επιτυχής.

Το μικροβιολογικό εργαστήριο για τα δείγματα που στέλνονται για εξέταση απαντά σε τρία βασικά ερωτήματα (περιπτώσεις):

- Σε περίπτωση ασθενούς που πρέπει να καθοριστεί ο αιτιολογικός παράγοντας μιας λοίμωξης με σκοπό τη διάγνωση, τη θεραπεία, την πρόγνωση και την προφύλαξη.
- Σε περίπτωση ασθενούς που έχει θεραπευτεί, αν έχει εκλείψει το αίτιο της ασθένειας.
- Σε περίπτωση που υπάρχει υποψία υγιών μικροβιοφορέων και κυρίως σε χώρους που συνυπάρχουν πολλά άτομα, για να εντοπισθούν οι πηγές μόλυνσης.

### 2.1. Καλλιέργεια πύου

Πύο χαρακτηρίζεται κάθε κλινικό δείγμα θολό, παχύρρευστο, γκριζοκίτρινο, με πάρα πολλά πυοσφαίρια.

Το πύο που πάρθηκε από κλειστή κοιλότητα, με παρακέντηση ή μετά από χειρουργική διάνοιξη, θα εξεταστεί ως υλικό χωρίς φυσιολογική χλωρίδα, όπως το αίμα και το ΕΝΥ. Σε αντίθετη περίπτωση, αν δηλαδή το πύο ληφθεί από απόστημα ή από χειρουργικό τραύμα ή από έγκαυμα, θα θεωρηθεί υλικό επιμολυσμένο από βακτήρια του δέρματος και του περιβάλλοντος. Πύο που προέρχεται από ειδικές φλεγμονές, όπως μυκοβακτηριδιακή, ακτινομυκητιασική, ή άλλη μυκητιασική διαπίψη, θα εξεταστεί με ειδικές καλλιέργειες.

Τα βακτήρια που αναζητούμε συνήθως στο πύο είναι τα εξής:

- *Staphylococcus aureus*
- *Streptococcus pyogenes*
- *Streptococcus pneumoniae*
- *Pseudomonas aeruginosa*
- *Enterobacteriaceae*, όπως *Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Proteus* κ.ά.
- Αναερόβια βακτήρια, Gram θετικά και Gram αρνητικά, ανάλογα με την προέλευση του δείγματος.

#### I. ΛΗΨΗ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ

Το πύο λαμβάνεται, ανάλογα με τη φλεγμονή, με παρακέντηση ή χειρουργική διάνοιξη της κοιλότητας. Φροντίζουμε να προφυλαχθεί το δείγμα από επιμόλυνση με βακτήρια του δέρματος και του περιβάλλοντος. Αν το πύο είναι άφθονο, το παίρνουμε με σύριγγα και το τοποθετούμε σε δύο αποστειρωμένα σωληνάρια. Αν είναι λίγο ή παχύρρευστο, το παίρνουμε με βαμβακοφόρο σπειρό, τον οποίο τοποθετούμε σε υλικό συντήρησης Stuart. Αν είναι πολύ λίγο και από μικρή κοιλότητα, για τη λήψη του χρησιμοποιούμε πολύ λεπτή βελόνα. Στέλνουμε στο εργαστήριο τη σύριγγα και τη βελόνα σε αποστειρωμένο σωληνάριο.

#### II. ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΚΗ ΕΞΕΤΑΣΗ

Η άμεση μικροσκοπική εξέταση του πύου είναι η πρώτη και αναγκαία μέθοδος εξέτασης, η οποία προηγείται της καλλιέργειας.



Με τη μικροσκόπηση άμεσων παρασκευασμάτων θα παρατηρηθούν τα είδη των βακτηρίων που υπάρχουν στο πύο και θα οδηγηθεί η καλλιέργεια σε σωστή πορεία, κερδίζοντας πολύτιμο χρόνο και υλικά.

Σε τρεις αντικειμενοφόρες πλάκες επιστρώνουμε με κρίκο μικρή ποσότητα πύου. Αν το πύο έχει έρθει στο εργαστήριο σε βαμβακοφόρο στείλεό, τότε παίρνουμε πάλι με τον κρίκο κατευθείαν από το στείλεό, για να μη μολυνθεί το υπόλοιπο δείγμα.

Η μια αντικειμενοφόρος πλάκα θα χρωματισθεί κατά Gram, η άλλη με μια κυτταρολογική χρώση (π.χ. Giemsa) και η τρίτη θα φυλαχθεί για την οξεάντοχη χρώση Ziehl-Neelsen.

Με τη χρώση Gram είναι δυνατόν να βρεθούν βακτήρια, όπως:

- Κόκκοι Gram θετικοί, ενδοκυττάριοι ή εξωκυττάριοι, σε μικρές ομάδες άμορφες, πιθανόν Σταφυλόκοκκοι.
- Διπλόκοκκοι ή κόκκοι σε μικρές αλυσίδες, Gram θετικοί, μακρουλοί ή λογχοειδείς, πιθανόν *Streptococcus pneumoniae* ή *Streptococcus faecalis* ή *Streptococcus viridans*.
- Κόκκοι σε μακριές αλυσίδες, Gram θετικοί, στρογγυλοί, πιεσμένοι κατά τον επιμήκη άξονα της αλυσίδας, πιθανόν αιμολυτικός Στρεπτόκοκκος.
- Βακτηρίδια Gram αρνητικά, πιθανόν Εντεροβακτηριακά.
- Βακτηρίδια Gram θετικά, διογκωμένα, πιθανόν Βάκιλλοι ή Κλωστηρίδια.
- Μάζα Gram θετικών βακτηριδίων, περιτριγυρισμένων από κορύνες, πιθανόν Ακτινομύκητες. Η εικόνα αυτή θα παρατηρηθεί, αν το υλικό ληφθεί από τους κόκκους του πύου.

Αν με τη μικροσκοπική εξέταση βρούμε αρκετό αριθμό βακτηρίων ενός είδους, μπορούμε μαζί με την καλλιέργεια να βάλουμε απευθείας από το πύο δοκιμή ευαισθησίας στα αντιβιοτικά, για να κερδίσουμε χρόνο και ειδοποιούμε τον κλινικό γιατρό για την ανάπτυξη του βακτηρίου.

Αν από την κλινική εικόνα υπάρχει υπόνοια μυκοβακτηριδιακής φλεγμονής, θα χρωματισθεί το ένα παρασκεύασμα με τη χρώση Ziehl-Neelsen, ώστε να αποκαλυφθούν τα οξεάντοχα βακτηρίδια. Ειδοποιείται ο κλινικός γιατρός, ώστε να κατευθύνει τη χημειοθεραπεία προς τα κατάλληλα αντιβιοτικά. Με τον τρόπο αυτό εξοικονομείται πολύτιμος

χρόνος για τον ασθενή ο οποίος πάσχει από σοβαρή ασθένεια.

### III. ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ

Τα θρεπτικά υλικά που χρησιμοποιούμε στην καλλιέργεια πύου είναι:

- Αιματούχο άγαρ (δύο τρυβλία, το ένα να περιέχει εκλεκτικές και εμπλουτιστικές ουσίες για αναερόβια βακτήρια).
- Θειογλυκολικός ζωμός.

Ανάλογα με το αποτέλεσμα της μικροσκοπικής εξέτασης του άμεσου παρασκευάσματος θα χρησιμοποιηθούν και άλλα θρεπτικά υλικά, όπως Charman για Σταφυλόκοκκους, Sabouraud για Μύκητες, Mac Conkey για Εντεροβακτηριακά, σοκολατόχρωμο άγαρ για *Streptococcus pneumoniae*.

**Σπορά:** Ο εμβολιασμός θα γίνει με κρίκο και ενδιάμεσες πυρακτώσεις, ώστε να έχουμε μεμονωμένες αποικίες. Στο Charman και το Sabouraud άγαρ αρκεί η επίστρωση σε μια μικρή επιφάνεια του υλικού, χωρίς αραίωση.

**Επώαση:** Επώαζονται σε θερμοκρασία 37° C, για 24 ώρες. Το ένα αιματούχο άγαρ σε συνθήκες αναερόβιες και το άλλο μαζί με το σοκολατόχρωμο άγαρ σε ατμόσφαιρα CO<sub>2</sub> 10%. Τα υπόλοιπα υλικά θα επωαστούν σε αερόβιες συνθήκες.

### IV. ΑΝΑΓΝΩΣΗ-ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ-ΔΟΚΙΜΗ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑΣ-ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ-ΓΡΑΦΗ ΕΚΘΕΣΗ

Μετά την επώαση αναζητούμε με μεγεθυντικό φακό τις ύποπτες αποικίες των βακτηρίων. Αν σε κανένα από τα τρυβλία δεν υπάρχει ανάπτυξη βακτηρίων, θα συνεχιστεί η επώαση. Θα κάνουμε επίσης ανακαλλιέργεια από το ζωμό σε δύο αιματούχα άγαρ και θα ακολουθήσει επώαση 24 ωρών (όπως έγινε στα πρωτοκαλλιεργήματα). Αν στα τρυβλία εμφανιστούν αποικίες βακτηρίων, θα προχωρήσουμε στην ταυτοποίησή τους, μελετώντας μακροσκοπικά και μικροσκοπικά τις αποικίες. Εκτελούμε επίσης τις κατάλληλες ταυτοποιητικές δοκιμασίες. Συχνά οι καλλιέργειες πύου είναι μεικτές και πολυμικροβιακές.

Θεωρώντας ότι ο *Staphylococcus aureus* είναι το πιο συνηθισμένο βακτήριο που εμφανίζεται στο πύο, θα περιγράψουμε σαν παράδειγμα την ταυτοποίησή του:

- Στο αιματούχο άγαρ παρατηρούμε πολλές, μεγάλες, πλατιές, χρυσωπές και με μεγάλη ζώνη αιμόλυσης αποικίες. Το πρώτο συμπέρασμα είναι ότι πιθανόν πρόκειται για Σταφυλόκοκκο.
- Παρασκευάζουμε επιχρίσματα από τις ύποπτες αποικίες και χρωματίζουμε κατά Gram. Παρατηρούμε στο μικροσκόπιο Gram θετικούς κόκκους, οι οποίοι διατάσσονται σε μικρές ή μεγάλες ομάδες. Ενισχύεται το συμπέρασμα ότι το βακτήριο είναι Σταφυλόκοκκος.
- Για να γίνει η τελική ταυτοποίηση πρέπει να εκτελεστεί η δοκιμή παραγωγής κοαγκουλάσης ή πηκτάσης. Η κοαγκουλάση είναι ένζυμο που παράγεται από το *Staphylococcus aureus* σε ποσοστό 93%.
- Εκτελείται το αντιβιογράμμα και συντάσσεται η γραπτή έκθεση του αποτελέσματος.

## 2.2. Καλλιέργεια ρινοφαρυγγικού εκκρίματος

Η καλλιέργεια του φαρυγγικού εκκρίματος γίνεται σε περιπτώσεις:

- Οξείας φλεγμονής του ανώτερου αναπνευστικού συστήματος, όπως φαρυγγίτιδας, αμυγδαλίτιδας κ.ά.
- Εξάρσεων των χρόνιων φλεγμονών του ανώτερου αναπνευστικού συστήματος, όπως χρονίζουσας αμυγδαλίτιδας.
- Ρευματικού πυρετού και άλλων στρεπτοκοκκικών ασθενειών.

Φυσιολογική χλωρίδα της περιοχής: *Streptococcus viridans*, *Staphylococcus epidermidis*, Ναϊσσέριες, Διφθεροειδή, Gram αρνητικά βακτηρίδια, αναερόβια βακτήρια.

### Ι. ΛΗΨΗ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ

Ζητάμε από τον ασθενή να ανοίξει το στόμα του, να βγάλει τη γλώσσα έξω από το στόμα, να σπκώσει το κεφάλι προς τα επάνω και να προφέρει το γράμμα Α. Πιέζουμε τη γλώσσα με γλωσσοπίεστρο και βυθίζουμε το βαμβακοφόρο σπειλέο στο θόλο της φαρυγγικής κοιλότητας (πίσω από τη σταφυλή) στριφογυρίζοντάς τον στα δάκτυλά μας, ώστε να πάρουμε αρκετή ποσότητα υλικού, προσέχοντας όμως να μην ακουμπήσουμε στα τοιχώματα της στοματικής κοιλότητας.

Αν η λήψη γίνει στο εργαστήριο, ο εμβολιασμός γίνεται κατευθείαν

στα θρεπτικά υλικά. Αν όμως γίνει εκτός εργαστηρίου, ο βαμβakoφόρος στείλεός τοποθετείται σε υλικό συντήρησης Stuart, για να μη στεγνώσει το υλικό. Η λήψη γίνεται επίσης με λεπτό εύκαμπτο στείλεό, ο οποίος εισάγεται βαθιά στη μύτη. Στείλεοί υπάρχουν έτοιμοι στο εμπόριο.

### II. ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ

#### Θρεπτικά υλικά:

- Αιματούχο άγαρ (δύο τρυβλία)
- Σοκολατόχρωμο άγαρ
- Charman άγαρ (για *Staphylococcus aureus*)
- Saboucaud άγαρ (για Μύκτες)

**Σπορά:** Στα τρυβλία με το αιματούχο και το σοκολατόχρωμο άγαρ εμβολιάζουμε με το στείλεό το δείγμα σε μικρή περιοχή. Στη συνέχεια χρησιμοποιούμε αποστειρωμένο κρίκο και επιστρώνουμε το υλικό σε μεγαλύτερη επιφάνεια πυρακτώνοντας ενδιάμεσα τον κρίκο, ώστε να αναπτυχθούν μεμονωμένες αποικίες βακτηρίων.

Στο Charman και στο Saboucaud άγαρ εμβολιάζεται το 1/4 του τρυβλίου με το βαμβakoφόρο στείλεό χωρίς να γίνει μεγαλύτερη επίστρωση.

**Επώαση:** Η επώαση γίνεται σε θερμοκρασία 37° C, για 24 ώρες. Το ένα αιματούχο άγαρ επωάζεται σε αναερόβιες συνθήκες και το σοκολατόχρωμο σε ατμόσφαιρα CO<sub>2</sub>. Τα υπόλοιπα υλικά σε αερόβιες συνθήκες.

### III. ΑΝΑΓΝΩΣΗ ΚΑΙ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ

Την επόμενη ημέρα, με τη βοήθεια μεγεθυντικού φακού μελετάμε τη μακροσκοπική εικόνα των αποικιών, αναζητούμε αποικίες με αιμόλυση στο αιματούχο άγαρ και ελέγχουμε όλες τις αποικίες. Ετοιμάζουμε επιχρίσματα για μικροσκοπική εξέταση με χρώση Gram. Κάνουμε προσεκτική ανακαλλιέργεια των ύποπτων αποικιών στα κατάλληλα θρεπτικά υλικά, για να επιβεβαιώσουμε τη μακροσκοπική και μικροσκοπική εξέταση.

Το πιο σημαντικό βακτήριο που αναζητούμε στην καλλιέργεια του φαρυγγικού εκκρίματος είναι ο *Streptococcus pyogenes*, ο οποίος ευθύνεται για τις περισσότερες στρεπτοκοκκικές λοιμώξεις του ανώτερου αναπνευστικού συστήματος. Γι' αυτόν το λόγο ανακαλλιεργούμε σε



αιματούχο άγαρ τις αποικίες με αιμόλυση και ελέγχουμε την ευαισθησία τους στη βακιτρασίνη (ο β-αιμολυτικός Στρεπτόκοκκος της ομάδας A είναι ευαίσθητος στη βακιτρασίνη). Αν την επόμενη ημέρα έχουμε θετική τη δοκιμασία της βακιτρασίνης, κάνουμε ορολογική τυποποίηση του Στρεπτόκοκκου κατά Lancefield με ειδικούς αντιορούς ή χρησιμοποιούμε το σύστημα ταυτοποίησης API Strept. Μπορούμε να αναζητήσουμε αντιγόνα του *Streptococcus pyogenes* με τεστ latex στο άμεσο φαρυγγικό επίχρισμα. Οι εξετάσεις όμως αυτές, ενώ είναι ειδικές, δε βγαίνουν πάντοτε θετικές σε λοίμωξη με Στρεπτόκοκκο (όχι υψηλού βαθμού ευαισθησία), γι' αυτό η καλλιέργεια είναι απαραίτητη.

#### IV. ΕΚΘΕΣΗ ΤΟΥ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΟΣ

Θα σημειωθεί η ανάπτυξη του βακτηρίου και ο βαθμός ανάπτυξης της φυσιολογικής χλωρίδας π.χ. ικανοποιητική ή φτωχή ανάπτυξη φυσιολογικής χλωρίδας. Ακολουθεί αντιβιογράμμα για τα παθογόνα που αναπτύχθηκαν. Βακτήρια που αξιολογούνται ως παθογόνα είναι: *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, άλλοι β-αιμολυτικοί Στρεπτόκοκκοι, *Staphylococcus aureus* (αν υπάρχει τοπική φλεγμονή και είναι το επικρατέστερο βακτήριο), *Klebsiella pneumoniae*, *Candida albicans* κ.ά. Σε ειδικές καλλιέργειες αναζητούνται επιπλέον το *Corynebacterium diphtheriae*, η *Bordetella pertussis* κ.ά.

### 2.3. Καλλιέργεια πτυέλων

Όλα τα όργανα του αναπνευστικού συστήματος εκκρίνουν φυσιολογικά διάφορες ουσίες. Οι κυψελίδες και οι βρόγχοι, όργανα του κατώτερου αναπνευστικού συστήματος, κάτω από φυσιολογικές συνθήκες δεν περιέχουν μικροβιακή χλωρίδα στις λίγες εκκρίσεις τους.

Όταν υπάρχει οξεία πνευμονική ή βρογχική νόσος, οι λίγες εκκρίσεις από την περιοχή του κατώτερου αναπνευστικού συστήματος αυξάνονται σε μεγάλο βαθμό και ταυτόχρονα εμπλουτίζονται από παθολογικά υγρά. Τα υγρά αυτά είναι δυνατόν να είναι φλεγμονώδη, πυώδη, βλεννώδη, αιματηρά κ.τ.λ., ονομάζονται πτύελα και αποβάλλονται ενεργητικά από τον οργανισμό με τη βοήθεια του βήχα (απόχρεμψη).



Τα πύελα, καθώς περνούν από το ανώτερο αναπνευστικό σύστημα, επιμολύνονται από τα βακτήρια της φυσιολογικής χλωρίδας της περιοχής. Επομένως χρειάζεται κάποιο κριτήριο που θα οδηγήσει στο συμπέρασμα ότι το παθογόνο βακτήριο προέρχεται από το κατώτερο αναπνευστικό σύστημα και όχι λόγω επιμόλυνσης από το φάρυγγα. Τέτοιο κριτήριο μπορεί να θεωρηθεί ο αριθμός, δηλαδή η αφθονία του βακτηρίου στο δείγμα.

Η καλλιέργεια των πτυέλων μπορεί να είναι γενική αλλά και ειδική (όταν ζητάμε ένα συγκεκριμένο βακτήριο π.χ. στη φυματίωση).

### **Βακτήρια που παρατηρούνται κυρίως στα πύελα με γενική καλλιέργεια:**

- *Streptococcus pneumoniae*
- *Haemophilus influenzae*
- *Staphylococcus aureus*
- *Streptococcus pyogenes*
- *Klebsiella pneumoniae*

### **Βακτήρια που παρατηρούνται στα πύελα με ειδικές καλλιέργειες:**

- *Mycobacterium tuberculosis*
- *Mycoplasma pneumoniae*
- *Chlamydia*

### **I. ΛΗΨΗ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ**

Συλλέγονται πύελα πρωινά σε αποστειρωμένο τρυβλίο ή ευρύστομο φιαλίδιο. Πριν από τη λήψη ο ασθενής ξεπλένει το στόμα του με νερό ή αποστειρωμένο φυσιολογικό ορό. Η συνηθισμένη λήψη γίνεται με βήχα και βαθιά απόχρεμψη από τους πνεύμονες. Στα παιδιά, που δε φτύνουν, αλλά καταπίνουν τα πύελα, γίνεται καθετηριασμός του στομάχου και πλύση ή μπορεί να γίνει λήψη με ειδικό σπειρό από το λάρυγγα ή, εάν είναι δύσκολο και αυτό, με βαμβακοφόρο σπειρό από το βάθος της φαρυγγικής κοιλότητας. Το δείγμα πρέπει να μεταφερθεί γρήγορα στο εργαστήριο για καλλιέργεια, γιατί ορισμένα βακτήρια, όπως ο *Streptococcus pneumoniae*, καταστρέφονται σε μικρό χρονικό διάστημα.

Εάν τα πύελα είναι πολύ συμπαγή, προσθέτουμε αποστειρωμένο φυσιολογικό ορό, ανακατεύουμε με τον κρίκο και παίρνουμε το πιο

πυώδες μέρος για τη μικροσκοπική εξέταση και την καλλιέργεια. Με την προσθήκη του φυσιολογικού ορού πετυχαίνουμε την αραίωση των πτυέλων και συγχρόνως ένα είδος καθαρισμού από τα βακτήρια της φαρυγγικής κοιλότητας.

## II. ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΚΗ ΕΞΕΤΑΣΗ

Επιστρώνουμε δύο ή τρεις αντικειμενοφόρες πλάκες με πύελα. Η επίστρωση γίνεται ομαλότερη, αν συμπιέσουμε το δείγμα ανάμεσα σε δύο αντικειμενοφόρες πλάκες.

Η μικροσκοπική εξέταση άμεσων παρασκευασμάτων, χρωματισμένων κατά Gram, μπορεί να μας προσφέρει δύο πληροφορίες. Η πρώτη αφορά το βαθμό ανάμειξης των πτυέλων με σάλιο και κατά συνέπεια την καταλληλότητα του δείγματος. Τα δείγματα κρίνονται κατάλληλα για καλλιέργεια, όταν τα πυοσφαίρια που παρατηρούνται κατά οπτικό πεδίο είναι περισσότερα από 10 και τα επιθηλιακά κύτταρα λιγότερα από 25. Η δεύτερη αφορά την προκαταρκτική διάγνωση του πιθανού βακτηρίου που είναι υπεύθυνο για τη λοίμωξη στο κατώτερο αναπνευστικό σύστημα, εφόσον βρεθεί μεγάλος αριθμός ύποπτων μικροοργανισμών με τυπική μορφολογία των κυττάρων τους π.χ. Gram θετικοί διπλόκοκκοι, αρνητικά βακτηρίδια κ.τ.λ.

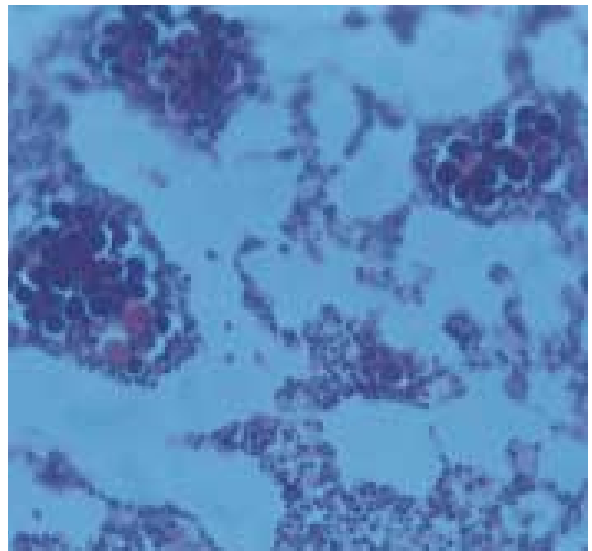
## III. ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ

### Θρεπτικά υλικά:

- Αιματούχο άγαρ (δύο τρυβλία)
- Σοκολατόχρωμο άγαρ
- Mac Conkey άγαρ
- Sabouraud άγαρ

**Σπορά:** Γίνεται με κρίκο και ενδιάμεσες πυρακτώσεις, ώστε να έχουμε μεμονωμένες αποικίες.

**Επώαση:** Γίνεται σε θερμοκρασία 37°C, για 24 ώρες. Στο πυκνό μέρος του καλλιεργήματος του ενός αιματούχου άγαρ προστίθεται δισκίο βακιτρασίνης 10 μονάδων



Εικόνα 2.1: Καλλιέργεια πτυέλων με βακτήρια και Μύκητες

και επωάζεται σε αναερόβιες συνθήκες. Το σοκολατόχρωμο άγαρ επωάζεται σε ατμόσφαιρα CO<sub>2</sub> 10%. Τα υπόλοιπα τρυβλία επωάζονται σε αερόβιες συνθήκες.

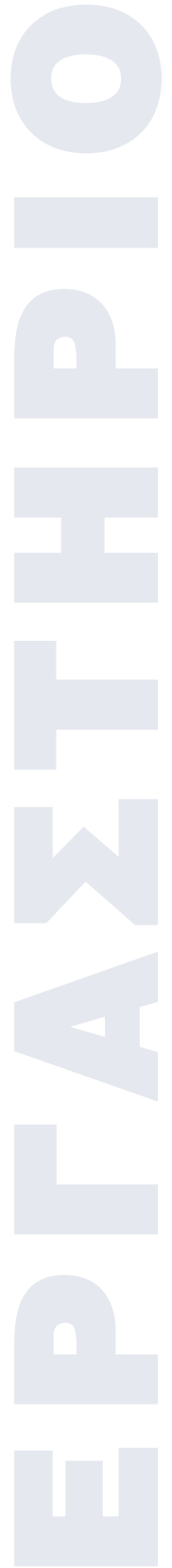
### IV. ΑΝΑΓΝΩΣΗ - ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ - ΔΟΚΙΜΗ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑΣ - ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ-ΓΡΑΦΤΗ ΕΚΘΕΣΗ

Μετά από 24ωρη επώαση αναζητούμε με μεγεθυντικό φακό τις ύποπτες αποικίες των βακτηρίων:

- Στο σοκολατόχρωμο άγαρ αναζητούμε ύποπτες αποικίες *Streptococcus pneumoniae* (σαν πιατάκια με πράσινη ζώνη αιμόλυσης). Εφόσον από τη μακροσκοπική και τη μικροσκοπική εξέταση έχουμε ενδείξεις ότι πρόκειται για *Streptococcus pneumoniae* (Gram θετικοί, λογχοειδείς διπλόκοκκοι), προχωρούμε στην ταυτοποίησή του, ώστε να διαχωριστεί από το *Streptococcus viridans*. Εκτελούμε τη δοκιμασία της οπτοχίνης και της διαλυτότητας στη χολή.
- Εάν στο τρυβλίο με το αιματούχο άγαρ, γύρω από το δισκίο της βακιτρασίνης των 10 μονάδων, έχουν αναπτυχθεί αποικίες, έχουμε ενδείξεις ανάπτυξης *Haemophilus influenzae*. Η βακιτρασίνη των 10 μονάδων αναστέλλει την ανάπτυξη των βακτηρίων της φυσιολογικής χλωρίδας και αφήνει να αναπτυχθεί ο *Haemophilus influenzae*.
- Στο Mac Conkey άγαρ ελέγχουμε για την ανάπτυξη Εντεροβακτηριακών και στο Sabouraud άγαρ για την ανάπτυξη Μυκήτων.

Εάν απομονώσουμε ένα από τα παθογόνα βακτήρια σε μεγάλο αριθμό αποικιών, π.χ. *Streptococcus pneumoniae*, και στη μικροσκοπική εξέταση του άμεσου παρασκευάσματος ήταν το επικρατέστερο βακτήριο, εκτελούμε ταυτοποιητικές δοκιμασίες και αντιβιογράμμα.

Στη γραπτή έκθεση του αποτελέσματος γράφουμε ότι αναπτύχθηκε *Streptococcus pneumoniae* ως το επικρατέστερο βακτήριο. Αναφέρουμε και τη χλωρίδα του στοματοφάρυγγα π.χ. ικανοποιητική ανάπτυξη φυσιολογικής χλωρίδας στοματοφάρυγγα ή απουσία φυσιολογικής χλωρίδας στοματοφάρυγγα.



### 3.1. Καλλιέργεια κολπικού εκκρίματος

Καλλιέργεια του κολπικού εκκρίματος κάνουμε, όταν υπάρχει κολπίτιδα ή τραχηλίτιδα, δηλαδή φλεγμονή του βλεννογόνου του κόλπου ή του τραχήλου της μήτρας. Τα συμπτώματα στην κολπίτιδα είναι έκκριμα, πολλές φορές δύσσομο, κνησμός, πόνος, τσούξιμο στην ούρηση κ.ά. Στην τραχηλίτιδα μπορεί να μην υπάρχουν συμπτώματα, αν δε συμμετέχει στη φλεγμονή και ο κόλπος.

Η φυσιολογική χλωρίδα του κόλπου στις γυναίκες της αναπαραγωγικής ηλικίας αποτελείται κυρίως από Γαλακτοβάκιλλους. Υπάρχουν επίσης, σε μικρότερο ποσοστό, Σταφυλόκοκκοι, Στρεπτόκοκκοι, Εντερόκοκκοι, Εντεροβακτηριακά, αναερόβια βακτηρίδια κ.ά.

#### I. ΛΗΨΗ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ

Η λήψη του κολπικού εκκρίματος γίνεται με στείλεό ή πιπέτα από το βάθος του κόλπου με τη βοήθεια του μπροσκοπίου, το οποίο εισάγεται στον κόλπο μετά από καθαρισμό της ουρογεννητικής περιοχής με ζεστό νερό και σαπούνι.

Από τον τράχηλο της μήτρας, ανάλογα με το βακτήριο που αναζητούμε, μπορούμε να πάρουμε έκκριμα με ειδικό στείλεό (*Neisseriae gonorrhoeae*, Μυκοπλάσματα) ή με ειδικό βουρτσάκι (Χλαμύδια). Το δείγμα τοποθετείται αμέσως σε υλικό μεταφοράς Stuart ή ειδικά υλικά, όταν αναζητούμε *Neisseriae gonorrhoeae* ή Μυκοπλάσματα.

#### II ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΚΗ ΕΞΕΤΑΣΗ

Η πρώτη εξέταση που κάνουμε στο κολπικό έκκριμα είναι ένα νωπό παρασκεύασμα με φυσιολογικό ορό (NaCl 0.8%). Σκεπάζουμε τη σταγόνα με καλυπρίδα και μικροσκοπούμε με ξηρό φακό με μεγέθυνση 1:400 (προσοφθάλμιο φακό X10, αντικειμενικό X40).

Στο νωπό παρασκεύασμα θα δούμε αν υπάρχουν στοιχεία φλεγμονής (πυοσφαίρια) και θα αναζητήσουμε Τριχομονάδες, Μύκητες και clue cells. Τα clue cells είναι επιθήλια πλακώδη που προέρχονται από το βλεννογόνο του κόλπου και είναι επικαλυμμένα με Gram αρνητικά κοκκοβακτηρίδια. Τα συναντάμε στη μη ειδική κολπίτιδα (Bacterial vaginosis), η οποία συνήθως οφείλεται στη *Gardnerella vaginalis*.

Ετοιμάζουμε και ξηρά παρασκευάσματα, τα οποία χρωματίζουμε

κατά Gram και στα οποία θα δούμε αν υπάρχουν Γαλακτοβάκิลλοι (μεγάλα Gram θετικά βακτηρίδια), βλαστοσπόρια Μυκήτων, ψευδομυκητύλλια και clue cells.

Αν βρούμε στο νωπό και στο χρωματισμένο παρασκεύασμα clue cells, θα κάνουμε τη δοκιμασία με ΚΟΗ 10%. Κατά τη δοκιμασία αυτή προσθέτουμε σε νωπό παρασκεύασμα του δείγματος με φυσιολογικό ορό μια σταγόνα ΚΟΗ 10%. Αν υπάρχει φλεγμονή από *Gardnerella vaginalis*, θα έχουμε μρωδιά ψαριού.

### III. ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ

#### Θρεπτικά υλικά:

- Αιματούχο άγαρ (δύο τρυβλία)
- Mac Conkey άγαρ No 2
- Saboureaud άγαρ

**Σπορά:** Θερμαίνουμε τα τρυβλία στον κλίβανο και επιστρώνουμε μια μικρή περιοχή του τρυβλίου με το στείλεό. Απλώνουμε μετά το υλικό σε όλη την επιφάνεια με ενδιάμεσες πυρακτώσεις του κρίκου, για να πάρουμε μεμονωμένες αποικίες. Στο Saboureaud άγαρ απλώνουμε απλά το υλικό με το στείλεό.

**Επώαση:** Επωάζουμε σε θερμοκρασία 37° C για 24 ώρες. Το ένα αιματούχο σε ατμόσφαιρα CO<sub>2</sub> 5-10%, το άλλο αιματούχο σε αναερόβιες συνθήκες και τα υπόλοιπα σε αερόβιες.

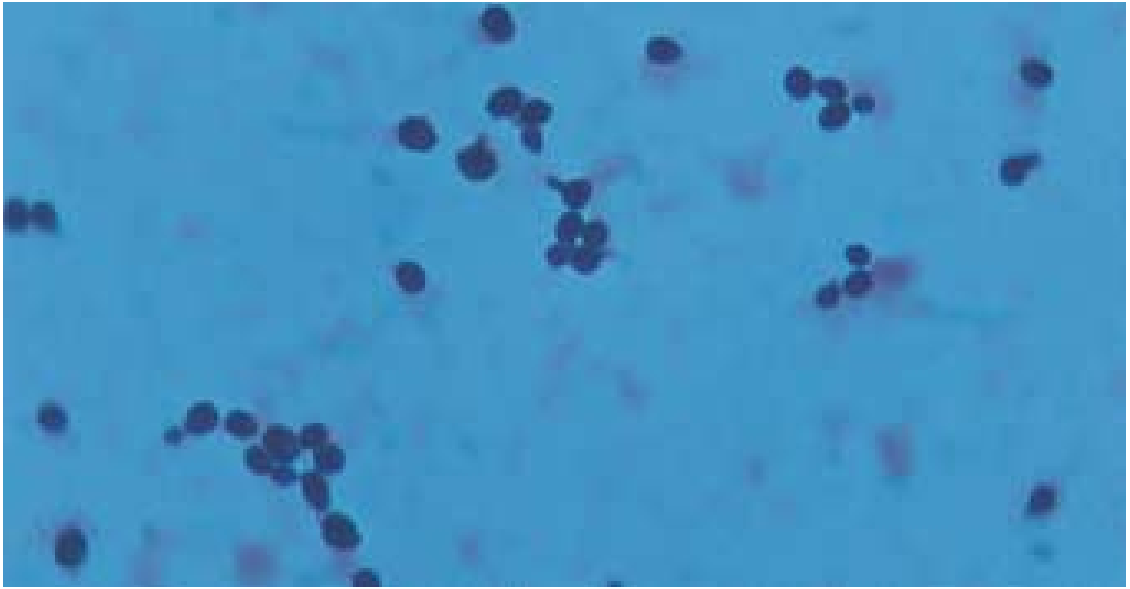


Εικόνα 3.1: Καλλιέργεια κολπικού εκκρίματος

### IV. ΑΝΑΓΝΩΣΗ

Την επόμενη ημέρα ελέγχουμε την ανάπτυξη και τη μορφολογία των αποικιών και χρωματίζουμε κατά Gram παρασκευάσματα από τις ύποπτες αποικίες της *Gardnerella Vaginalis*.

Το Saboureaud άγαρ, μετά την επώαση του πρώτου 24ωρου, το αφήνουμε σε θερμοκρασία δωματίου για 2-3 ημέρες. Αν αναπτυχθεί



Εικόνα 3.2: *Candida albicans* με χρώση Gram

*Candida*, θα κάνουμε δοκιμή παραγωγής χλαμυδοσπορίων ή δοκιμή βλαστήσεως, για να δούμε αν είναι *Candida albicans*.

#### V. ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ

Από την εξέταση του κολπικού εκκρίματος εκείνα που αξιολογούνται πάντοτε ως αίτια κολπίτιδας είναι οι Τριχομονάδες, η *Candida albicans* και η *Gardnerella Vaginalis*. Όλα τα άλλα βακτήρια θεωρούνται ευκαιριακά παθογόνα και τα αξιολογούμε, όταν έχει αναπτυχθεί μόνο ένα από αυτά και μάλιστα σε μεγάλο αριθμό αποικιών και σε ειδικές περιπτώσεις (π.χ. μετά από ειδικές επεμβάσεις).

#### VI. ANTIBIOGRAMMA

Στο βακτήριο που θα αξιολογήσουμε θα κάνουμε δοκιμή ευαισθησίας σε αντιβιοτικά στα οποία είναι ευαίσθητο, με την προϋπόθεση να δρουν στο γεννητικό σύστημα.

#### VII. ΕΚΘΕΣΗ

**Άμεσο νωπό παρασκεύασμα:** Γράφουμε, αν βρήκαμε Τριχομονάδες ή βλαστοσπόρια και αν υπάρχουν στοιχεία φλεγμονής.

**Άμεσο παρασκεύασμα με χρώση Gram:** Γράφουμε, αν υπάρχουν ψευδομυκητύλλια της *Candida albicans*.

**Καλλιέργεια:** Γράφουμε, αν απομονώθηκε *Gardnerella Vaginalis* και

αναφέρουμε την ύπαρξη χλωρίδας.

### VIII. ΕΞΕΤΑΣΗ ΕΝΔΟΤΡΑΧΗΛΙΚΟΥ ΕΠΙΧΡΙΣΜΑΤΟΣ

Η εξέταση αυτή γίνεται, όταν υποπτευόμαστε φλεγμονή από τη *Neisseria gonorrhoeae*, το *Chlamydia trachomatis*, το *Mycoplasma hominis* και το *Ureaplasma urealyticum*.

Για τη *Neisseria gonorrhoeae* η λήψη γίνεται από τον ενδοτράχηλο με στειλεό. Μπορούμε να την αναζητήσουμε και στο έκκριμα της ουρήθρας, αλλά όχι στο κολπικό έκκριμα. Χρωματίζουμε παρασκευάσματα κατά Gram και, αν βρούμε καφεοειδείς, Gram αρνητικούς, διπλόκοκκους και μάλιστα μέσα σε πυοσφαίρια, είμαστε σίγουροι για τη διάγνωση. Μπορούμε να κάνουμε καλλιέργεια για επιβεβαίωση σε σοκολατόχρωμο άγαρ με αντιβιοτικά και, εφόσον αναπτυχθεί η *Neisseria gonorrhoeae*, κάνουμε δοκιμή οξειδάσης.

Για το *Chlamydia trachomatis* η λήψη γίνεται με ειδικό βουρτσάκι. Σε άμεσο παρασκεύασμα, με τη μέθοδο του ανοσοφθορισμού (IFA), θα αναζητήσουμε κυτταρικά έγκλειστα στα επιθηλιακά κύτταρα, καθώς και σε χρωματισμένο παρασκεύασμα με χρώση Giemsa.

Για το *Mycoplasma hominis* και το *Ureaplasma urealyticum*, χρησιμοποιούμε ειδικό βουρτσάκι, ειδικό υλικό μεταφοράς και καλλιεργούμε σε ειδικά θρεπτικά υλικά.

### 3.2. Καλλιέργεια ουρηθρικού εκκρίματος

Η ανδρική ουρήθρα δεν έχει φυσιολογική χλωρίδα παρά μόνο κοντά στο εξωτερικό της στόμιο, όπου υπάρχει η χλωρίδα του δέρματος και του εντέρου. Αποικίζεται επίσης από βακτήρια του κόλπου της γυναίκας.

Απαιτείται καλλιέργεια, όταν υπάρχει φλεγμονή της ουρήθρας ή του προστάτη αδένου. Τα πιο συνηθισμένα βακτήρια που προκαλούν ουρηθρίτιδα είναι η *Neisseria gonorrhoeae*, το *Chlamydia trachomatis*, το *Mycoplasma hominis* και το *Ureaplasma urealyticum*. Τα συμπτώματα είναι πόνος, δυσουρία, έκκριμα και κνησμός. Στις γυναίκες τα συμπτώματα είναι λιγότερο έντονα.



### I. ΛΗΨΗ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ

Η λήψη γίνεται πριν ή τουλάχιστον 2 ώρες μετά την ούρηση. Εφόσον υπάρχει πολύ έκκριμα και ο ασθενής προσέρχεται στο εργαστήριο, η λήψη γίνεται με κρίκο. Κάνουμε επιχρίσματα τα οποία χρωματίζουμε κατά Gram και στρώνουμε απευθείας τις καλλιέργειες. Αν δεν υπάρχει έκκριμα, η λήψη γίνεται με ειδικό στείλεό, ο οποίος τοποθετείται μέσα στην ουρήθρα και παραμένει 1-2 sec. Στη συνέχεια τοποθετείται σε ειδικό υλικό μεταφοράς, επειδή η *Neisseria gonorrhoeae* είναι πολύ ευαίσθητη στην ξηρασία.

Επιστρώνουμε τα επιχρίσματα από το στείλεό κυλώντας τον πάνω στην αντικειμενοφόρο πλάκα προς τη μια πλευρά, για να μην καταστρέψουμε τα πολυμορφοπύρνα μέσα στα οποία θα δούμε τους Gram αρνητικούς, καφεοειδείς διπλόκοκκους. Μπορούμε να χρωματίσουμε τα παρασκευάσματά μας με αραιό κυανό του μεθυλενίου, οπότε μόνο οι διπλόκοκκοι χρωματίζονται μπλε, ενώ τα υπόλοιπα στοιχεία δε χρωματίζονται.

Αν υποψιαζόμαστε ότι υπάρχουν Τριχομονάδες ή Μύκητες, θα κάνουμε και νωπό παρασκεύασμα, για να τα αναζητήσουμε.

### II. ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ

#### Θρεπτικά υλικά:

- Αιματούχο άγαρ (δύο τρυβλία)
- Άγαρ Charman
- Σοκολατόχρωμο άγαρ (με αντιβιοτικά για τη *Neisseria gonorrhoeae*)
- Mac Conkey άγαρ No 2
- Sabouaud άγαρ (για Μύκητες)

**Σπορά:** Στο σοκολατόχρωμο και το Sabouaud άγαρ εμβολιάζουμε το δείγμα σε όλη την επιφάνεια του τρυβλίου. Στα υπόλοιπα υλικά το διασπείρουμε με ενδιάμεσες πυρακτώσεις του κρίκου, για να πάρουμε μεμονωμένες αποικίες.

**Επώαση:** Γίνεται σε θερμοκρασία 35-37° C. Το σοκολατόχρωμο άγαρ επωάζεται σε ατμόσφαιρα CO<sub>2</sub> 3-5% και με παρουσία υδρατμών, για τρεις ημέρες. Το ένα αιματούχο σε αναερόβιες συνθήκες και τα υπόλοιπα τρυβλία αερόβια, για 24 ώρες. Το Sabouaud άγαρ



το αφήνουμε μετά την επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 2-3 ημέρες.

### III. ΑΝΑΓΝΩΣΗ

Την επόμενη ημέρα αναζητούμε:

- Στο σοκολατόχρωμο άγαρ τις αποικίες της *Neisseria gonorrhoeae*. Χρωματίζουμε επιχρίσματα κατά Gram και κάνουμε δοκιμή οξειδάσης.
- Στο ειδικό υλικό για Μυκοπλάσματα με το μικροσκόπιο τις αποικίες τους.
- Στο Sabouraud άγαρ αποικίες *Candida albicans* και κάνουμε δοκιμή παραγωγής χλαμυδοσπορίων ή δοκιμή βλαστήσεως.

### IV. ANTIBIOGRAMMA

Η *Neisseria gonorrhoeae* είναι ευαίσθητη στην πενικιλίνη, αν και τα τελευταία χρόνια έχουν βρεθεί στελέχη ανθεκτικά σε αυτή. Σήμερα το φάρμακο εκλογής είναι η σπεκτινομυκίνη και η σιπροφλοξασίνη. Δοκιμή ευαισθησίας στα αντιβιοτικά γίνεται σε σπάνιες περιπτώσεις (όταν έχουμε ανθεκτικά στελέχη). Τα Μυκοπλάσματα είναι ευαίσθητα στην τετρακυκλίνη και την ερυθρομυκίνη και τα Χλαμύδια στην τετρακυκλίνη.

### V. ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ

Οι Τριχομονάδες και η *Neisseria gonorrhoeae* αξιολογούνται πάντα. Οι Σταφυλόκοκκοι και τα Gram αρνητικά βακτηρίδια αξιολογούνται μόνο, όταν αναπτυχθούν σε μεγάλο βαθμό και ως αποκλειστικά ή επικρατέστερα βακτήρια.

### VI. ΕΚΘΕΣΗ

Αναφέρουμε το ή τα βακτήρια που αναπτύχθηκαν. Αν δεν αναπτυχθεί κανένα παθογόνο, γράφουμε: «ουδέν παθογόνο».

### 4.1. Καλλιέργεια ωτικού εκκρίματος

Η οξεία μέση ωτίτιδα είναι μια παθολογική κατάσταση που συναντάμε συνήθως σε παιδιά ή βρέφη 6 μηνών έως 6 ετών. Χαρακτηρίζεται από απότομο και έντονο πόνο των αυτιών (ωταλγία), βουβτό (εμβοή) και υψηλό πυρετό. Είναι δυνατόν να γίνει ρήξη του τυμπάνου με επακόλουθο την εκροή αίματος και πυώδους υγρού.

Η νόσος συνήθως είναι δευτερογενής (μετά από φλεγμονή του ανώτερου αναπνευστικού συστήματος). Τα βακτήρια που προκαλούν τη λοίμωξη προέρχονται από το ρινοφάρυγγα και φθάνουν στο μέσο αυτί μέσα από την ευσταχιακή σάλπιγγα. Συνήθως είναι ο *Streptococcus pneumoniae*, ο *Haemophilus influenzae*, ο *Streptococcus pyogenes*, ο *Staphylococcus aureus* και διάφορα Εντεροβακτηριακά.

Η εξωτερική ωτίτιδα συναντάται συνήθως σε άτομα που κολυμπούν σε πισίνες και κολυμβητήρια. Η εξωτερική ωτίτιδα οφείλεται συνήθως στην *Pseudomonas aeruginosa*, στο *Staphylococcus aureus* και στους Μύκητες (Ασπέργιλλοι).

#### I. ΛΗΨΗ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ

Εάν έχει γίνει ρήξη τυμπάνου, το πυώδες έκκριμα συλλέγεται με λεπτό βαμβακοφόρο σπειρό, τοποθετείται σε υλικό συντήρησης και μεταφέρεται στο εργαστήριο. Το δείγμα αυτό δεν είναι κατάλληλο για αναερόβια καλλιέργεια. Κατάλληλο για απομόνωση αναερόβιων βακτηρίων είναι μόνο το υλικό που λαμβάνεται με παρακέντηση του τυμπανικού υμένα. Εάν όμως δεν έχει γίνει ρήξη του τυμπάνου, δε συνιστάται η παρακέντησή του μόνο για διαγνωστικούς σκοπούς.

#### II. ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ

##### Θρεπτικά υλικά:

- Αιματούχο άγαρ
- Σοκολατόχρωμο άγαρ
- Mac Conkey άγαρ
- Sabouraud άγαρ

**Σπορά:** Το δείγμα εμβολιάζεται στα θρεπτικά υλικά.

**Επώαση:** Τα τρυβλία επωάζονται σε θερμοκρασία 35-37° C, για 24-48 ώρες. Το αιματούχο και το σοκολατόχρωμο άγαρ επωάζονται σε ατμόσφαιρα CO<sub>2</sub> (5-10%) και τα υπόλοιπα αερόβια.

### III. ΑΝΑΓΝΩΣΗ-ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ-ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ

Εκτελείται μακροσκοπική εξέταση των αποικιών και γίνονται παρασκευάσματα που χρωματίζονται κατά Gram. Ανάλογα με τα αποτελέσματα ακολουθεί ταυτοποίηση και αντιβιογράμμα.

## 4.2. Καλλιέργεια οφθαλμικού εκκρίματος

Ο επιπεφυκότας, σε αντίθεση με άλλα όργανα του ματιού, δεν είναι στείρος βακτηρίων, γιατί μολύνεται συνεχώς με βακτήρια και ιούς. Οι μικροοργανισμοί αυτοί μεταφέρονται είτε με τα χέρια του ίδιου του ατόμου από περιοχές του σώματος, όπου αποτελούν φυσιολογική χλωρίδα, είτε με άμεση επαφή με μολυσμένα αντικείμενα, υγρά ή με τον αέρα. Δεν παραμένουν όμως για πολύ στο υγιές μάτι, δηλαδή δεν αποικίζουν τον επιπεφυκότα. Απομακρύνονται με τις κινήσεις των βλεφάρων και με τα δάκρυα και δεν προσβάλλουν άμεσα τα κύτταρα του επιπεφυκότα λόγω της φυσικής τους αντίστασης.

Τα περισσότερα βακτήρια της φυσιολογικής χλωρίδας του ματιού είναι είδη Σταφυλόκοκκων κοαγκουλάση αρνητικών, Διφθεροειδή, ο *Staphylococcus aureus*, ο *Streptococcus pneumoniae*, ο *Haemophilus influenzae* κ.ά.

### I. ΛΗΨΗ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ

Το δείγμα λαμβάνεται με στείλο αλγινικού ασβεστίου. Το βύσμα δεν είναι βαμβάκι αλλά ίνες αλγινικού ασβεστίου και έχει το πλεονέκτημα ότι αξιοποιείται όλο το ποσό του δείγματος που παίρνουμε. Τέτοιους στείλους χρησιμοποιούμε, όταν το δείγμα είναι σε πολύ μικρή ποσότητα.

Προηγείται καθαρισμός των βλεφάρων με φυσιολογικό ορό και αναστροφή του άνω ή του κάτω βλέφαρου, ανάλογα με τη θέση που γίνεται η δειγματοληψία. Παίρνουμε το οφθαλμικό έκκριμα με δύο στείλους, περιστρέφοντάς τους απαλά από την κροταφική μέχρι τη ρινική οφθαλμική σχισμή.

### II. ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΚΗ ΕΞΕΤΑΣΗ ΑΜΕΣΩΝ ΠΑΡΑΣΚΕΥΑΣΜΑΤΩΝ

Από τον ένα στείλο παρασκευάζουμε επιχρίσματα και τα χρωματίζουμε κατά Gram και Giemsa. Με τη χρώση Gram θα πάρουμε μια

εικόνα για τον αριθμό και τα είδη των βακτηρίων που υπάρχουν στο δείγμα, θα αναγνωρίσουμε αρκετά από τα παθογόνα είδη, αν υπάρχουν, όπως τη *Neisseria gonorrhoeae*, το *Streptococcus pneumoniae*, τους Σταφυλόκοκκους, άλλους Gram θετικούς κόκκους και Gram αρνητικά βακτηρίδια, όπως τον *Haemophilus influenzae*. Με τη χρώση Giemsa θα πάρουμε μια εικόνα των κυττάρων (λευκά αιμοσφαίρια, επιθηλιακά κύτταρα κ.ά.) και το σημαντικότερο, θα αναγνωρίσουμε τα κυτταρικά έγκλειστα (που βρίσκονται στη χλαμυδιακή λοίμωξη).

### III. ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ

Ο δεύτερος στείλεός με το οφθαλμικό επίχρισμα τοποθετείται σε θρεπτικό ζωμό και επωάζεται για 24 ώρες, σε θερμοκρασία 37° C, αερόβια. Είναι προτιμότερο το δείγμα να μην μπαίνει σε υλικό συντήρησης και μεταφοράς, αλλά να εμβολιάζεται αμέσως στα θρεπτικά υλικά. Αν ο ζωμός μετά από 24ωρη επώαση δεν είναι θολός, επωάζεται για 24 ώρες ακόμα.

Στη συνέχεια γίνεται καλλιέργεια του θολού θρεπτικού ζωμού στα εξής θρεπτικά υλικά:

- Αιματούχο άγαρ (2 τρυβλία)
- Σοκολατόχρωμο άγαρ
- Mac Conkey άγαρ
- Sabouraud άγαρ

Επωάζονται σε θερμοκρασία 37° C, για 24 ώρες. Το ένα αιματούχο άγαρ σε αναερόβιες συνθήκες, το σοκολατόχρωμο σε ατμόσφαιρα CO<sub>2</sub> και τα υπόλοιπα θρεπτικά υλικά αερόβια.

### IV. ΑΝΑΓΝΩΣΗ-ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ-ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ

- Την επόμενη ημέρα αναζητούμε στα θρεπτικά υλικά αποικίες ύποπτων βακτηρίων.
  1. Στο αιματούχο άγαρ: α-αιμολυτικούς Στρεπτοκόκκους  
β-αιμολυτικούς Στρεπτοκόκκους
  2. Στο σοκολατόχρωμο άγαρ: *Streptococcus pneumoniae*  
*Neisseria gonorrhoeae*
  3. Στο Mac Conkey άγαρ: Gram αρνητικά βακτηρίδια
  4. Στο Sabouraud άγαρ: Μύκητες

- Ετοιμάζουμε παρασκευάσματα από τις ύποπτες αποικίες και χρωματίζουμε κατά Gram ή με άλλη χρώση.
- Ανάλογα με τα αποτελέσματα της μακροσκοπικής και μικροσκοπικής εξέτασης επιλέγουμε τα κατάλληλα θρεπτικά υλικά και ανακαλλιεργούμε το υπόλοιπο μέρος της ύποπτης αποικίας. Τα θρεπτικά υλικά μπορεί να είναι εμπλουτιστικά, εκλεκτικά ή ειδικά, όπως π.χ. το Thayer- Martin με αντιβιοτικά για την ανάπτυξη της *Neisseria gonorrhoeae* ή το Löwenstein-Jensen για τα Μυκοβακτηρίδια.
- Ανάλογα με το βακτήριο που απομονώθηκε, συνεχίζουμε με ταυτοποιητικές δοκιμασίες και αντιβιογράμμα.

Στη νεογνική επιπεφυκίτιδα το συχνότερο αίτιο είναι το *Chlamydia trachomatis*, αλλά και άλλοι παθογόνοι μικροοργανισμοί που μολύνουν το νεογνό κατά τη διέλευσή του από τον κόλπο της μητέρας στον τοκετό, όπως η *Neisseria gonorrhoeae*, οι Στρεπτόκοκκοι κ.ά.

Στις λοιμώξεις και κυρίως στις κερατοεπιπεφυκίτιδες επικρατούν τα Gram θετικά βακτήρια, με συχνότερο είδος τους Σταφυλοκόκκους, ενώ από τα Gram αρνητικά βακτήρια συχνότερο είδος είναι η *Pseudomonas aeruginosa* (ειδικά σε άτομα που χρησιμοποιούν φακούς επαφής) και ο *Haemophilus influenzae*. Γι' αυτό θα πρέπει, όταν φοράμε φακούς επαφής, να πλένουμε καλά τα χέρια μας, όταν τους πιάνουμε, και να ακολουθούμε αυστηρά τις οδηγίες για την απολύμανσή τους.

### 5.1. Γενικά

Τα ούρα παράγονται στους νεφρούς και αποβάλλονται με την ούρηση. Φυσιολογικά δεν περιέχουν βακτήρια, εκτός από ένα μικρό αριθμό που προέρχονται από το εξωτερικό στόμιο της ουρήθρας, τον κόλπο των γυναικών και την περινεϊκή χώρα. Τα βακτήρια αυτά αναπτύσσονται στα ούρα με γρήγορους ρυθμούς, γι' αυτό θα πρέπει να γίνεται η καλλιέργεια των ούρων σε μικρή χρονική διάρκεια από τη συλλογή τους ή να φυλάγονται σε ψυγείο.

Φλεγμονή μπορεί να έχουμε σε όλο το μήκος του ουροποιητικού συστήματος (νεφρούς, ουρητήρες, ουροδόχο κύστη, ουρήθρα).

Με την καλλιέργεια των ούρων βρίσκουμε το αίτιο της φλεγμονής και με την απομόνωση, την ταυτοποίηση και τη δοκιμή ευαισθησίας στα αντιβιοτικά βοηθάμε στη διάγνωση και τη θεραπεία της ασθένειας.

Οι συχνότερες ασθένειες στις οποίες είναι απαραίτητη η καλλιέργεια ούρων είναι: ουρολοιμώξεις (πυελονεφρίτιδες, λοιμώξεις των ουροφόρων οδών, μετεγχειρητικές λοιμώξεις), συγγενείς ανωμαλίες του ουροποιητικού συστήματος, εγκυμοσύνη, σακχαρώδης διαβήτης, ειδικές φλεγμονές, (π.χ. φυματίωση του ουροποιητικού συστήματος). Οι ασθενείς που χειρουργούνται και φέρουν μόνιμο καθετήρα, οι εγκυμονούσες γυναίκες και οι διαβητικοί (λόγω αύξησης του σακχάρου στα ούρα) παθαίνουν συχνά ουρολοιμώξεις.

Στις φλεγμονές του ουροποιητικού συστήματος αποβάλλεται μεγάλος αριθμός βακτηρίων (συνήθως βακτήρια της εντερικής χλωρίδας).

### 5.2. Καλλιέργεια ούρων

#### Ι. ΛΗΨΗ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ

Βασική προϋπόθεση της σωστής συλλογής των ούρων είναι το καλό πλύσιμο της ουρήθρας και της ουρογεννητικής περιοχής με σαπούνι και ζεστό νερό. Στις γυναίκες καλό είναι μετά το πλύσιμο να κλείνουμε την είσοδο του κόλπου με λίγο βαμβάκι ή με tampon. Στη συνέχεια αφήνουμε να φύγουν λίγα ούρα και συλλέγουμε 50-100ml ούρων, στο μέσον της ούρησης, σε αποστειρωμένο ουροδοχείο. Κλείνουμε το ουροδοχείο και το μεταφέρουμε στο εργαστήριο. Μεγάλη προσοχή

πρέπει να δοθεί στην αποφυγή επιμόλυνσης του δείγματος. Η καλλιέργεια πρέπει να γίνει σε 1 ώρα, διαφορετικά, τα ούρα πρέπει να μπουν στο ψυγείο. Στα ούρα που έχουν παραμείνει πολλές ώρες στο ψυγείο αξιολογείται μόνο η στείρα καλλιέργεια.

Για τα νεογνά και τα βρέφη υπάρχουν ειδικά πλαστικά σακουλάκια, τα οποία κολλάμε στην ουρογεννητική περιοχή και συλλέγουμε τα ούρα. Πρέπει να προσέχουμε, ώστε η συλλογή να γίνει μέσα σε μια ώρα.

Τα ούρα των ασθενών που φέρουν μόνιμο καθετήρα είναι ακατάλληλα για καλλιέργεια. Σε περιπτώσεις όμως που ο ασθενής έχει συμπτώματα ουρολοίμωξης μπορούμε, με επιφύλαξη στην αξιολόγηση του αποτελέσματος, να πάρουμε το δείγμα από τον καθετήρα. Αφού κλείσουμε με λαβίδα τον καθετήρα για λίγη ώρα και αφού πρώτα τον απολυμάνουμε τοπικά, παίρνουμε με σύριγγα την ποσότητα των ούρων που χρειαζόμαστε.

Απαραίτητη προϋπόθεση για κάθε ουροκαλλιέργεια είναι να μην παίρνει ο ασθενής τις δύο προηγούμενες ημέρες αντιβιοτικά.

## II. ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ

### Θρεπτικά υλικά:

- Mac Conkey άγαρ Ν<sup>ο</sup> 2 (ευνοεί την ανάπτυξη Εντερόκοκκων).
- Αιματούχο άγαρ.

Καλό είναι πριν από την καλλιέργεια να ελέγχουμε την καταλληλότητα του δείγματος. Για το σκοπό αυτό φυγοκεντρούμε 10ml ούρων σε κωνικό σωληνάριο και μικροσκοπούμε με άμεσο παρασκεύασμα ή μετά από χρώση Gram μια σταγόνα από το ίζημα. Αν δούμε πολλά πλακώδη, το δείγμα είναι ακατάλληλο.

Πριν χρησιμοποιήσουμε τα τρυβλία με τα θρεπτικά υλικά, τα τοποθετούμε ανοιχτά στον κλίβανο, για να στεγνώσουν από τους υδρατμούς. Για οικονομία υλικών



Εικόνα 5.1: Τρόπος στεγνώματος τρυβλίων πριν τη χρήση



και χώρου χρησιμοποιούμε μισό τρυβλίο για κάθε καλλιέργημα, κόβοντας μια λωρίδα από το κέντρο του τρυβλίου, για να εμποδίσουμε την επέκταση της μιας καλλιέργειας στην άλλη, ιδίως των Πρωτέων οι οποίοι ερπύζουν. Υπάρχουν και διχοτομημένα τρυβλία στα οποία μπορούμε να γεμίσουμε το μισό με Mac Conkey άγαρ N° 2 και το άλλο μισό με αιματούχο άγαρ. Έτσι θα έχουμε ένα τρυβλίο για κάθε δείγμα, αποφεύγοντας την πιθανότητα επιμόλυνσης ή λάθους κατά τη σπορά.

**Σπορά:** Γνωρίζουμε ότι μόνο στις ουρολοιμώξεις ο αριθμός των βακτηρίων είναι πάνω από 100.000 σε κάθε ml ούρων. Επίσης γνωρίζουμε ότι κάθε μικροοργανισμός, όταν καλλιεργείται σε στερεό θρεπτικό υλικό, παράγει μια αποικία. Αν λοιπόν καλλιεργήσουμε γνωστή ποσότητα ούρων, μπορούμε να υπολογίσουμε τον αριθμό των βακτηρίων σε 1 ml ούρων και να διαγνώσουμε αν υπάρχει ουρολοίμωξη.

Για να επιτύχουμε αυτό, χρησιμοποιούμε δύο τρόπους:

- Αραίωση ούρων: Σε αποστειρωμένο σωληνάριο τοποθετούμε 4 ml φυσιολογικού ορού και προσθέτουμε 1ml ούρων (αραίωση 1:5). Ανακινούμε το σωληνάριο και με μια πιπέτα αποστειρωμένη ή με μια αυτόματη πιπέτα του 0,01ml ή με κρίκο γνωστής διαμέτρου μεταφέρουμε μια σταγόνα στην επιφάνεια του θρεπτικού υλικού. Με τον κρίκο ή με μια γυάλινη πιπέτα Pasteur, την οποία πυρακτώνουμε στη λυχνία Bunsen, ώσπου να λυγίσει, απλώνουμε τη σταγόνα ομοιόμορφα στο μισό τρυβλίο προσέχοντας να μην ξύσουμε το υλικό.
- Ημιποσοτική καλλιέργεια: Με κρίκο γνωστής διαμέτρου, 0,01 ή 0,001, μεταφέρουμε μια σταγόνα από τα ούρα στο θρεπτικό υλικό, βουτώντας τον κρίκο κάθετα και προσέχοντας να μην τον ακουμπήσουμε στα τοιχώματα του δοχείου. Απλώνουμε τη σταγόνα με τον ίδιο τρόπο. Τέτοιοι κρίκοι υπάρχουν από πλατίνα ή χρώ-



Εικόνα 5.2: Καλλιέργεια ούρων



μιο αλλά και πλαστικοί, αποστειρωμένοι, μιας χρήσεως.

**Επώαση:** Γίνεται σε κλίβανο θερμοκρασίας 37° C, για 24 ώρες, αερόβια.

### III. ΑΝΑΓΝΩΣΗ

Την επόμενη ημέρα ελέγχουμε τον αριθμό και τη μακροσκοπική εικόνα των αποικιών, καθώς και αν υπάρχουν μεταβολές στα θρεπτικά υλικά. Ελέγχουμε επίσης τη μικροσκοπική εικόνα των βακτηρίων, με νωπά και χρωματισμένα κατά Gram παρασκευάσματα.

Η καλλιέργεια των ούρων διαφέρει από τις άλλες καλλιέργειες στο ότι μας ενδιαφέρει εκτός από το είδος του βακτηρίου και ο αριθμός των βακτηρίων που περιέχονται σε 1ml ούρων. Για να υπολογίσουμε τον αριθμό των βακτηρίων που υπάρχουν σε 1ml ούρων, μετράμε με μεγεθυντικό φακό τον αριθμό των αποικιών, τον πολλαπλασιάζουμε επί 1 ml και τον διαιρούμε με τον όγκο των ούρων που έχουμε καλλιεργήσει.

Στη μέθοδο της αραιώσεως ο όγκος είναι 0,002. Μπορούμε να διαιρέσουμε τον αριθμό των αποικιών με το 0,002 ή να τον πολλαπλασιάσουμε επί 500, που είναι το αποτέλεσμα της διαίρεσης του 1ml με το 0,002. Π.χ εάν έχουμε 200 αποικίες:  $200:0,002=100.000$  ή  $200 \times 500=100.000$  βακτήρια ανά ml ούρων.

Στην ημιποσοτική μέθοδο διαιρούμε τον αριθμό των αποικιών με το 0,01 ή το 0,001, ανάλογα με τον όγκο των ούρων που καλλιεργήσαμε, ή τον πολλαπλασιάζουμε επί 100 στην πρώτη περίπτωση και επί 1000 στη δεύτερη, που είναι το αποτέλεσμα της διαίρεσης του 1ml με το 0,01 και το 0,001 αντίστοιχα. Π.χ. αν χρησιμοποιήσαμε πιπέττα του 0,01 και έχουμε 200 αποικίες:  $200:0,01=20.000$  ή  $200 \times 100=20.000$ . Αν έχουμε χρησιμοποιήσει πιπέττα του 0,001 και μετρήσουμε 100 αποικίες:  $100:0,001=100.000$  ή  $100 \times 1000=100.000$  βακτήρια ανά ml ούρων.

### IV. ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ (ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ)

Τα πιο συνηθισμένα βακτήρια που προκαλούν ουρολοιμώξεις είναι αυτά της χλωρίδας του εντέρου. Η αναγνώρισή τους θα γίνει κυρίως από τη μορφολογία των αποικιών και τις μεταβολές στο Mac Conkey άγαρ N° 2, καθώς και με τις βιοχημικές δοκιμασίες:

- *Escherichia coli*: Αποικίες κόκκινες, ινδόλη, MR (++)
- *Klebsiella*: Αποικίες κόκκινες, βλενώδεις, ινδόλη, MR (-),

ουρία (+).

- *Proteus*: Αποικίες άχρωμες με ερπυσμό στο αιματούχο άγαρ, διάσπαση ουρίας (+), PPA (+).
- *Pseudomonas aeruginosa*: Παραγωγή χαρακτηριστικής χρωστικής και οσμή όμοια με το γιασεμί, οξειδάση (+).
- *Enterococcus*: Αποικίες κόκκινες, πολύ μικρές, Esculin (+), καταλάση (-).
- *Staphylococcus*: Δεν αναπτύσσονται στο Mac Conkey άγαρ Νο 2. Στο αιματούχο άγαρ λευκωπές, κυκλικές αποικίες, καταλάση (+). Γίνεται διαχωρισμός του *Staphylococcus aureus* με τη δοκιμή κοαγκουλάσης (+). Επίσης αξιολογείται η ανάπτυξη Σταφυλόκοκκων, ανθεκτικών στη Νονονιόσιν (*Staphylococcus Saprophyticus*).

Ακόμα μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε το API 20E για την ταυτοποίηση των Εντεροβακτηριακών και το API Staph για την ταυτοποίηση των Σταφυλόκοκκων.

#### V. ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ

Αν αναπτυχθούν πάνω από 100.000 βακτήρια ανά ml ούρων, η ουροκαλλιέργεια θεωρείται θετική, δηλαδή ο ασθενής έχει ουρολοίμωξη. Αν ο αριθμός των βακτηρίων είναι κάτω από 1.000, θεωρείται αρνητική. Μεταξύ 1.000 και 10.000 θεωρούμε ότι υπάρχει επιμόλυνση και ζητάμε επανάληψη με πιο προσεκτική συλλογή του δείγματος των ούρων. Μεταξύ 10.000 και 100.000 για τους ενήλικες θεωρείται ύποπτη, ενώ για τα παιδιά θετική. Για τους Εντερόκοκκους αξιολογούνται ως θετικές και καλλιέργειες με μικρότερο αριθμό βακτηρίων.

Εάν αναπτυχθούν δύο παθογόνα βακτήρια, τα αξιολογούμε, ενώ εάν αναπτυχθούν τρία, τα ούρα θεωρούνται ακατάλληλα και ζητάμε επανάληψη.

#### VI. ANTIBIOGRAMMA

Στο ή στα βακτήρια που αξιολογήσαμε ως θετικά θα γίνει δοκιμή ευαισθησίας στα αντιβιοτικά, έχοντας ως πρώτη μας επιλογή τα αντιβιοτικά που αποβάλλονται από τους νεφρούς, όπως νιτροφουραντοϊνη, κινολόνες κ.ά.

**VII. ΕΚΘΕΣΗ**

Στην έκθεσή μας, εκτός από το είδος, σημειώνουμε και τον αριθμό των βακτηρίων που αναπύχθηκαν π.χ. αναπύχθηκε *Escherichia coli* >100.000 αποικίες / ml ούρων.

Χρησιμοποιείται επίσης ο όρος cfu (colony forming units), δηλαδή μονάδες παραγωγής αποικιών, επειδή πιστεύεται ότι μια αποικία μπορεί να παραχθεί από ένα βακτήριο, αλλά επίσης και από μια ομάδα βακτηρίων.

## 6.1. Καλλιέργεια αίματος

Η καλλιέργεια αίματος είναι μια πολύ χρήσιμη εξέταση. Μια θετική αιμοκαλλιέργεια θέτει με βεβαιότητα τη διάγνωση της ασθένειας, που συνήθως είναι πολύ σοβαρή, και μας βοηθάει, με τις πληροφορίες που παίρνουμε από το αντιβιογράμμα, να δώσουμε τη σωστή θεραπεία και να σώσουμε τη ζωή του ασθενούς.

Θετικές αιμοκαλλιέργειες είναι δυνατόν να έχουμε, εκτός από τις σηψαιμίες, και στις μικροβιαμίες από άλλες παθήσεις, όπως μηνιγγίτιδα, οστεομυελίτιδα, πνευμονία, ενδοκαρδίτιδα, τυφοειδή πυρετό, μελιταίο πυρετό. Η ανάπτυξη του υπεύθυνου μικροοργανισμού μας βοηθάει πολύ στην έγκαιρη διάγνωση των ασθενειών αυτών.

Όταν δεν ξέρουμε το αίτιο της ασθένειας, κάνουμε γενική καλλιέργεια. Αν όμως υποψιαζόμαστε από την κλινική εικόνα του ασθενούς ποιο είναι το αίτιο, μπορούμε να κάνουμε ειδική καλλιέργεια αναζητώντας το συγκεκριμένο βακτήριο π.χ. τις Βρουκέλλες στο μελιταίο πυρετό.

Το αίμα είναι υλικό στείρο βακτηρίων. Επομένως, αν αποκλείσουμε την πιθανότητα επιμόλυνσης κατά τη διάρκεια της λήψεως του δείγματος, το βακτήριο που θα αναπτυχθεί θα είναι το αίτιο της ασθένειας.

### I. ΛΗΨΗ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ

Η αιμοληψία γίνεται, όπως συνήθως, από φλέβα κάτω από αυστηρά άσπτες συνθήκες (απολύμανση του δέρματος του ασθενούς με αντισηπτικό και μετά με οινόπνευμα). Το αίμα τοποθετείται σε ειδικά φιαλίδια αιμοκαλλιέργειας με ζωμό. Η ποσότητα του αίματος πρέπει να είναι σε αναλογία 1:10 με την ποσότητα του ζωμού που περιέχει το φιαλίδιο. Αν περιέχει δηλαδή το φιαλίδιο 50ml ζωμό, το αίμα που θα εμβολιάσουμε θα είναι 5ml. Υπάρχουν ειδικά παιδιατρικά φιαλίδια με μικρότερη ποσότητα ζωμού, επειδή απαγορεύεται να παίρνουμε από τα βρέφη πάνω από 2 ml και από τα νεογνά πάνω από 1 ml αίμα. Ανακινούμε το φιαλίδιο μετά τον εμβολιασμό, για να μην πήξει το αίμα.

### II. ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ

**Θρεπτικά υλικά:** Το θρεπτικό υλικό που χρησιμοποιούμε για τις αιμοκαλλιέργειες είναι ζωμός από κρέας και σπλάχνα ζώων.

Υπάρχουν διαφόρων ειδών ζωμοί, οι οποίοι κυκλοφορούν σε

αφυδατωμένη σκόνη και τους παρασκευάζουμε στο εργαστήριο ακολουθώντας τις οδηγίες που είναι γραμμένες στη συσκευασία, όπως:

- Ο θειογλυκολικός ζωμός (Thioglycolate Broth).
- Ζωμός με τρυπτικάση και σόγια (Trypticase Soy Broth).
- Ζωμός με εκχύλισμα καρδιάς και εγκεφάλου βοδιού (Brain Heart Infusion Broth).

Υπάρχουν επίσης οι ενισχυμένοι ζωμοί, οι οποίοι περιέχουν ειδικές ουσίες που βοηθάνε στην καλύτερη ανάπτυξη των βακτηρίων. Τέτοιες ουσίες είναι σάκχαρα, ρητίνες (δεσμεύουν τα αντιβιοτικά), ουσίες που εμποδίζουν την πήξη του αίματος, βιταμίνες κ.ά.

Κυκλοφορούν ακόμα στο εμπόριο ειδικά φιαλίδια με υγρό και στερεό υλικό για αερόβιες και αναερόβιες καλλιέργειες. Τα φιαλίδια για τις αναερόβιες καλλιέργειες περιέχουν μείγμα αερίων με μικρή ποσότητα οξυγόνου. Τα πιο ειδικά από αυτά είναι με διφασικό υλικό τύπου Castaneda. Τα φιαλίδια αυτά περιέχουν 25ml ζωμό τρυπτικάσης - σόγιας και CO<sub>2</sub> και επιπλέον στη μια κάθετη πλευρά τους πηγμένο άγαρ με τρυπτικάση - σόγια. Τις αιμοκαλλιέργειες από τα φιαλίδια αυτά δε χρειάζεται να τις ανακαλλιεργούμε. Βρέχουμε καθημερινά την επιφάνεια του άγαρ με το ζωμό γέρνοντας το φιαλίδιο και ανακαλλιεργούμε, αν αναπτυχθούν αποικίες ή αν θολώσει ο ζωμός.

Στα μεγάλα εργαστήρια σήμερα χρησιμοποιούνται αυτόματα συστήματα τα οποία στηρίζονται σε διάφορες μεθόδους



Εικόνα 6.1: Αυτόματο σύστημα αιμοκαλλιέργειας

για την ταχύτερη ανίχνευση της ανάπτυξης βακτηρίων στους ζωμούς των αιμοκαλλιεργειών. Τα πιο πολλά από αυτά στηρίζονται στη μέτρηση της παραγωγής CO<sub>2</sub> με διάφορους τρόπους.

**Σπορά:** Βάζουμε τα φιαλίδια στον κλίβανο, πριν τα χρησιμοποιήσουμε. Η σπορά στα φιαλίδια γίνεται κατευθείαν από τη σύριγγα, χωρίς να ανοίξουμε το πάμα τους.

**Επώαση:** Τα φιαλίδια επωάζονται σε θερμοκρασία 37° C, αερόβια, για πέντε τουλάχιστον ημέρες και από αυτά κάνουμε ανακαλλιέργειες.

### III. ΑΝΑΓΝΩΣΗ

Την επόμενη ημέρα (δεύτερη), χωρίς να ανακινήσουμε τα φιαλίδια, ελέγχουμε αν υπάρχει θολερότητα, υμένιο στην επιφάνεια του ζωμού ή

αν ο ζωμός έχει πήξει. Η θολερότητα σημαίνει ότι άρχισε ανάπτυξη κάποιου βακτηρίου, το υμένιο στην επιφάνεια του ζωμού σημαίνει ότι η καλλιέργεια επιμολύνθηκε από κάποιο βακτήριο του περιβάλλοντος, ενώ η πήξη του ζωμού σημαίνει ανάπτυξη βακτηρίου που παράγει κοαγκουλάση (*Staphylococcus aureus*).

Ανακαλλιεργούμε σε στερεά θρεπτικά υλικά (συνήθως σε αιματούχο άγαρ) μια σταγόνα που παίρνουμε λίγο πιο πάνω από τη στιβάδα του αίματος. Εξετάζουμε άλλη μια σταγόνα στο μικροσκόπιο, για να δούμε αν αναπτύχθηκαν βακτήρια και τη χρωματίζουμε κατά Gram.

Την επόμενη ημέρα (τρίτη) ελέγχουμε πάλι τους ζωμούς για θολερότητα και διαβάζουμε τις ανακαλλιέργειες. Αν δεν αναπτυχθεί βακτήριο επαναλαμβάνουμε τη διαδικασία αυτή για 5 ημέρες. Αν μέχρι και την πέμπτη ημέρα δεν αναπτυχθεί τίποτα, θεωρείται στείρα.

Αν αναπτυχθεί βακτήριο, ενημερώνουμε το γιατρό του ασθενούς, κάνουμε ταυτοποίηση του βακτηρίου και δοκιμή ευαισθησίας στα αντιβιοτικά.

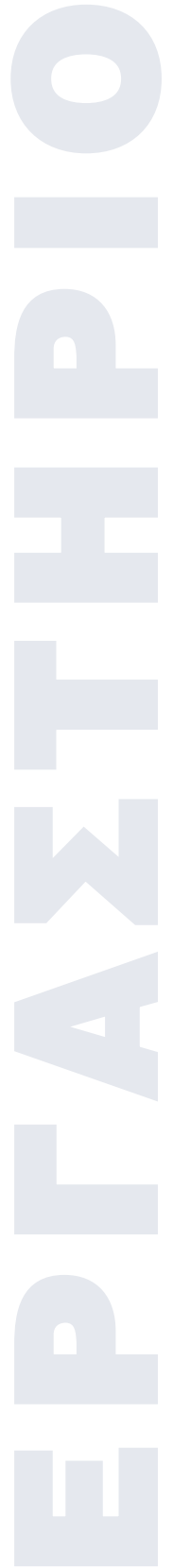
**Ταυτοποίηση:** Η μορφολογία των αποικιών, οι αλλοιώσεις που μπορεί να έχει το θρεπτικό υλικό και η μικροσκοπική εικόνα μετά από χρώση κατά Gram θα μας βοηθήσουν να επιλέξουμε τις βιοχημικές δοκιμασίες που απαιτούνται για την ταυτοποίηση του κάθε βακτηρίου.



Εικόνα 6.2: Καλλιέργεια αίματος

Επομένως αν αναπτυχθεί:

- *Staphylococcus aureus*: Gram θετικοί κόκκοι σε σταφυλοειδείς σχηματισμούς. Αποικίες κιτρινωπές με αιμόλυση στο αιματούχο άγαρ. Ειδική εξέταση: κοαγκουλάση (+).
- *Streptococcus pyogenes*: Gram θετικοί κόκκοι σε μακριές αλυσίδες. Αποικίες μικρές με τέλεια αιμόλυση, μεγάλη διάμετρο και σαφή όρια στο αιματούχο άγαρ. Ειδική εξέταση: καταλάση (-), δοκιμασία βακιτρασίνης. Η ανάπτυξή του στο ΕΝΥ αξιολογείται πάντοτε.
- *Streptococcus viridans*: Gram θετικοί κόκκοι σε μικρές αλυσίδες με α-αιμόλυση. Σε σοκολατόχρωμο άγαρ παρουσιάζουν έντονο πρασίνισμα. Καταλάση (-).
- *Streptococcus pneumoniae*: Gram θετικοί κόκκοι, με σχήμα λογχοειδές, κατά ζεύγη, με έλυτρο που καλύπτει δύο κόκκους μαζί. Αποικίες μικρές με κεντρικό βαθούλωμα σαν πιατάκια. Καταλάση (-), διαλυτότητα στη χολή (+).
- *Neisseria meningitidis*: Gram αρνητικοί κόκκοι, κατά ζεύγη, με τις κοίλες πλευρές τους αντικριστές. Αποικίες γκριζωπές χωρίς αλλαγή του θρεπτικού υλικού. Οξειδάση (+). Η ανάπτυξή της μας βοηθάει να διαγνώσουμε περιπτώσεις μηνιγγίτιδας από Ναιϊσσέριες, στις οποίες το συγκεκριμένο βακτήριο να μην έχει αναπτυχθεί στην καλλιέργεια του ΕΝΥ.
- *Haemophilus influenzae*: Βακτηρίδια Gram αρνητικά με πολυμορφισμό (σε διαφορετικά μεγέθη). Αποικίες μικρές χωρίς μεταβολή του θρεπτικού υλικού. Δοκιμασία δορυφορισμού (+), με μεγαλύτερη ανάπτυξη γύρω από αποικίες Σταφυλόκοκκων.
- *Salmonella typhi*: Gram αρνητικά βακτηρίδια με έντονη κίνηση. Μεγάλες αποικίες γκριζωπές. Αναπτύσσεται πιο εύκολα την πρώτη εβδομάδα της νόσου.
- *Brucella melitensis*, *Brucella abortus*: Κοκκοβακτηρίδια Gram αρνητικά, με διπολική χρώση, τα οποία είναι δυνατόν να φαίνονται σαν διπλόκοκκοι. Αποικίες μικρές που αναπτύσσονται αργά, γι' αυτό η επώαση πρέπει να διαρκεί τουλάχιστον τρεις εβδομάδες. Είναι προτιμότερο να χρησιμοποιούμε διφασικό υλικό, για να μη μολύνεται από τις πολλές ανακαλλιέργειες. Το ποσό του αίματος πρέπει να είναι τουλάχιστον 10ml και να παίρ-





νονται πολλές αιμοκαλλιέργειες. Βιοχημικές δοκιμασίες: σάκχα-  
ρα (-), ινδόλη (-), M.R (-), νιτρικά (+).

- *Pseudomonas aeruginosa*: Βακτηρίδια Gram αρνητικά, μεγά-  
λα, πολύ ευκίνητα. Αποικίες μεγάλες που συρρέουν, με μεταλλι-  
κή λάμψη. Το θρεπτικό υλικό χρωματίζεται κυανοπράσινο και ανα-  
δίνει μυρωδιά σαν του γιασεμιού. Οξειδάση (+).
- *Staphylococcus epidermidis*: Κόκκοι Gram θετικοί, σε στα-  
φυλοειδείς σχηματισμούς. Αποικίες μεγάλες και άσπρες, χωρίς  
αιμόλυση. Κοαγκουλάση (-). Επειδή είναι βακτήριο του δέρματος,  
δεν αξιολογείται, αν αναπτυχθεί σε ένα μόνο φιαλίδιο αιμοκαλ-  
λιέργειας, εκτός εάν ο ασθενής έχει μόνιμο καθετήρα ή ξένη  
βαλβίδα στην καρδιά.
- *Εντεροβακτηριακά*: Gram αρνητικά βακτηρίδια. Δοκιμασία  
IMViC.
- *Αναερόβια βακτήρια*: Πρέπει να γίνεται η λήψη κάτω από  
απόλυτα αναερόβιες συνθήκες, σε φιαλίδια με κενό οξυγόνου.  
Είναι δυνατόν να αναπτυχθούν Βακτηριοειδή μετά από εγχειρή-  
σεις στην κοιλιακή χώρα ή γυναικολογικές και *Clostridium*  
*perfringens* μετά από βαρύ τραυματισμό στην περιοχή κοντά στο  
πρίνεο.
- *Μύκητες*: Αναπτύσσονται σε ανοσοκατασταλμένους ασθενείς  
και κυρίως η *Candida albicans*.

#### IV. ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ

Αν αναπτυχθεί παθογόνο βακτήριο, θα αξιολογηθεί. Αν όμως είναι  
ευκαιριακά παθογόνο, θα ελέγξουμε τον τρόπο που έγινε η λήψη, αν  
ο ασθενής παίρνει υγρά με ενδοφλέβια έγχυση και θα πάρουμε  
υπόψη τις πληροφορίες από τον κλινικό γιατρό για την κατάσταση του  
ασθενούς, δηλαδή την πιθανή διάγνωση και τα κυριότερα συμπτώμα-  
τα, καθώς και αν έχει υποβληθεί σε κάποια επέμβαση χειρουργική. Για  
να ελέγξουμε την πιθανότητα να έγινε επιμόλυνση, θα κάνουμε επα-  
λήθευση επιμόλυνσης, διαδικασία η οποία γίνεται, όταν αμφι-  
βάλλουμε για το αποτέλεσμα μιας αιμοκαλλιέργειας και θέλουμε να  
ελέγξουμε αν έχει επιμολυνθεί κατά την αιμοληψία από βακτήρια του  
δέρματος.

Κατά την επαλήθευση επιμόλυνσης κάνουμε:



- Καινούργια λήψη και, εκτός από τον εμβολιασμό στο ζωμό, προσθέτουμε και 1ml αίμα σε τρυβλίο με 15ml λυωμένου άγαρ θερμοκρασίας 45-50°C.
- Επωάζουμε το τρυβλίο σε θερμοκρασία 37°C, αερόβια, για 24 ώρες. Αν αναπτυχθούν πάνω από πέντε αποικίες, η λήψη είναι σωστή και αξιολογούμε την αιμοκαλλιέργεια. Αν αναπτυχθούν λιγότερες από πέντε αποικίες, έχει γίνει επιμόλυνση.

#### V. ANTIBIOGRAMMA

Θα γίνει δοκιμή ευαισθησίας σε αντιβιοτικά, ανάλογα με το βακτήριο που αναπτύχθηκε.

## 6.2. Καλλιέργεια εγκεφαλονωτιαίου υγρού (ΕΝΥ)

Το εγκεφαλονωτιαίο υγρό παράγεται στις κοιλίες του εγκεφάλου από το χοριοειδές πλέγμα το οποίο σχηματίζουν τα τριχοειδή αγγεία του αίματος. Ο όγκος του σε φυσιολογικές συνθήκες είναι σταθερός, περίπου 150 ml. Είναι άχρωμο, διαυγές και στείρο βακτηρίων. Περιέχει όλα τα στοιχεία του αίματος, σε διαφορετικές όμως συγκεντρώσεις, και προστατεύει με διάφορες λειτουργίες το Κεντρικό Νευρικό Σύστημα (ΚΝΣ). Σε ασθένειες (λοιμώξεις) του ΚΝΣ και κυρίως των μηνίγγων μπορούμε να καλλιεργήσουμε το ΕΝΥ, για να βρούμε το βακτήριο που τις προκάλεσε.

Μεγάλη προσοχή πρέπει να δοθεί κατά τη χρησιμοποίηση του ΕΝΥ, για να αποφύγουμε τη μόλυνση του δείγματος. Επίσης πρέπει να λαμβάνονται μέτρα προστασίας, για να μη μολυνθούν οι εργαζόμενοι και το περιβάλλον του εργαστηρίου.

#### I. ΛΗΨΗ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ

Γίνεται από τον κλινικό γιατρό με οσφυονωτιαία παρακέντηση. Η διαδικασία είναι δύσκολη και για το γιατρό και για τον ασθενή και γι' αυτό θα πρέπει να χρησιμοποιούμε το ΕΝΥ με πολύ μεγάλη προσοχή. Παραλαμβάνουμε συνήθως 2 ή 3 σωληνάκια για διάφορες εξετάσεις. Αν είναι ένα σωληνάριο, μεταφέρουμε 2 ml σε αποστειρωμένο σωληνάριο για καλλιέργεια. Αν χρειασθεί να καθυστερήσουμε τον

εμβολιασμό της καλλιέργειας, πρέπει να τοποθετήσουμε το δείγμα σε κλίβανο θερμοκρασίας 37° C και όχι στο ψυγείο.

## II. ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΚΗ ΕΞΕΤΑΣΗ

Αφού φυγοκεντρήσουμε το δείγμα για 15min στις 1500 στροφές, μεταφέρουμε μια σταγόνα από το ίζημα σε αντικειμενοφόρο πλάκα, τη στεγνώνουμε και χρωματίζουμε κατά Gram ή Ziehl-Neelsen (αν υπάρχει ένδειξη). Ελέγχουμε την ύπαρξη βακτηρίων εξωκυτάρια και ενδοκυτάρια. Τα βακτήρια που είναι δυνατόν να υπάρχουν είναι:

- Διπλόκοκκοι Gram αρνητικοί, δηλαδή *Neisseria meningitidis*.
- Διπλόκοκκοι λογχοειδείς ή κόκκοι σε κοντές αλυσίδες, δηλαδή *Streptococcus pneumoniae*.
- Gram αρνητικά βακτηρίδια, λεπτά, με έντονο πολυμορφισμό, δηλαδή *Haemophilus influenzae*.
- Μύκητες (σε ανοσοκατασταλμένα άτομα).

## III. ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ

### Θρεπτικά υλικά:

- Αιματούχο άγαρ
- Σοκολατόχρωμο άγαρ
- Υλικό Lewinthal
- Ζωμός θειογλυκολικός

Θερμαίνουμε οπωσδήποτε τα υλικά σε θερμοκρασία 37°C, για να μην ανασταλεί η ανάπτυξη των βακτηρίων.

**Σπορά:** Αφού φυγοκεντρήσουμε το ΕΝΥ, μεταφέρουμε από το ίζημα σταγόνες στα θρεπτικά υλικά και τις απλώνουμε με κρίκο.

**Επώαση:** Όλα τα υλικά επωάζονται σε θερμοκρασία 37° C, για 24 ώρες, σε ατμόσφαιρα CO<sub>2</sub> 10% σε κοινό κλίβανο. Το αιματούχο τοποθετείται σε φιάλη αναερόβιας καλλιέργειας.

## IV. ΑΝΑΓΝΩΣΗ

Την επόμενη ημέρα θα μελετήσουμε τη μακροσκοπική εικόνα των αποικιών, θα χρωματίσουμε τα παρασκευάσματα κατά Gram και θα γίνει η ταυτοποίηση των βακτηρίων. Αν δεν υπάρχει ανάπτυξη, συνεχίζουμε με ανακαλλιέργεια από το ζωμό.

Βακτήρια που συνήθως αναπτύσσονται είναι:

- *Neisseria meningitidis*: Διπλόκοκκος Gram θετικός. Αποικίες γκριζωπές χωρίς μεταβολή του θρεπτικού υλικού. Οξειδάση (+). Γίνεται ορολογική τυποποίηση με αντιορούς, δοκιμή εξοιδίσεως του ελύτρου και βιοχημική ταυτοποίηση.
- *Streptococcus pneumoniae*: Διπλόκοκκοι λογχοειδείς, Gram θετικοί. Αποικίες μικρές με κεντρικό βαθούλωμα σαν πιτάκια. Πράσινη αιμόλυση στο αιματούχο άγαρ και ζάσπρισμα στο σοκολατόχρωμο άγαρ.
- *Haemophilus influenzae*: Gram αρνητικά βακτηρίδια με πολυμορφισμό, αποικίες μικρές χωρίς μεταβολή του θρεπτικού υλικού. Δοκιμή δορυφορισμού (+).

Η δοκιμή δορυφορισμού γίνεται, επειδή ο *Haemophilus influenzae* χρειάζεται για την ανάπτυξή του τον παράγοντα V, τον οποίο παράγουν οι Σταφυλόκοκκοι. Έτσι αν ανακαλλιεργήσουμε τον *Haemophilus influenzae* δίπλα σε ένα πυκνό καλλιέργημα Σταφυλόκοκκου, οι αποικίες που είναι πιο κοντά σε αυτόν θα είναι μεγαλύτερες. Προσθέτουμε λοιπόν στο τρυβλίο με το βακτήριο που υποψιαζόμαστε ότι είναι *Haemophilus influenzae* αποικίες Σταφυλόκοκκου. Την επόμενη ημέρα, μετά από αερόβια επώαση σε θερμοκρασία 37° C, ελέγχουμε αν οι αποικίες που είναι γύρω από το Σταφυλόκοκκο είναι μεγαλύτερες.

**Ειδικές** καλλιέργειες ΕΝΥ γίνονται σε περιπτώσεις κατά τις οποίες υπάρχει υποψία φυματιώδους, κρυπτοκοκκικής μυκητιασικής μηνιγγίτιδας κ.ά.

#### V. ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ

Αξιολογούμε κάθε παθογόνο βακτήριο που θα αναπτυχθεί.

#### VI. ANTIBIOGRAMMA

Θα γίνει η δοκιμή ευαισθησίας σε αντιβιοτικά στα οποία είναι ευαίσθητο το βακτήριο που αναπτύχθηκε, επιλέγοντας από αυτά τα αντιβιοτικά τα οποία έχουν διεισδυτικότητα στο ΕΝΥ.

## 7.1. Καλλιέργεια περιτοναϊκού υγρού

Φυσιολογικά στην περιτοναϊκή κοιλότητα υπάρχει αρκετό υγρό. Παράγεται συνεχώς σαν υπερδιήθημα του πλάσματος και συνεχώς απάγεται από τα λεμφαγγεία. Είναι υγρό διαυγές και κιτρινόχρωμο. Περιέχει όλες τις μικρομοριακές ουσίες του πλάσματος, στην ίδια συγκέντρωση με αυτό. Το κύριο λεύκωμά του είναι η αλβουμίνη. Δεν έχει ινωδογόνο και γι' αυτό δεν πήζει.

Το περιτοναϊκό ή ασκитικό υγρό φυσιολογικά δεν περιέχει βακτήρια. Η καλλιέργεια του υγρού γίνεται στις περιτονίτιδες τις πρωτοπαθείς ή μετά από ρήξη της σκωληκοειδούς απόφυσης, στην οξεία παγκρεατίτιδα, στη χολοκυστίτιδα και τη ρήξη της χοληδόχου κύστεως, στη ρήξη ή περίσφιξη του εντέρου και στον καρκίνο.

### I. ΛΗΨΗ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ

Η λήψη του περιτοναϊκού υγρού γίνεται από τον κλινικό γιατρό, με παρακέντηση της κοιλιάς σε περίπτωση ασκίτη, ή στο χειρουργείο κατά τη διάνοιξη της κοιλιάς σε οξεία πάθηση. Το υγρό λαμβάνεται με μεγάλη σύριγγα και μοιράζεται σε 2-3 αποστειρωμένα σωληνάρια. Στο πρώτο σωληνάριο βάζουμε αυτούσιο το υγρό, ενώ στα υπόλοιπα προσθέτουμε αντιπηκτικό (EDTA ή ηπαρίνη).

### II. ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΚΗ ΕΞΕΤΑΣΗ

Ποσότητα υγρού φυγοκεντρείται στις 3000 στροφές για 10 min. Από το ίζημα γίνονται τρία ξηρά παρασκευάσματα, από τα οποία τα δύο μονιμοποιούνται και χρωματίζονται κατά Gram και Ziehl-Neelsen και το τρίτο με Giemsa, για να βρούμε τον κυτταρικό τύπο που επικρατεί. Στη χρώση κατά Gram αναζητούμε βακτήρια και εφόσον βρεθούν, ενημερώνεται ο γιατρός και αρχίζει έγκαιρα η θεραπεία, χωρίς να περιμένουμε το αποτέλεσμα της καλλιέργειας.

### III. ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ

Αυτούσιο ασκитικό υγρό ή ίζημα εμβολιάζεται σε:

- Αιματούχο άγαρ (δύο τρυβλία, το ένα για αναερόβια επώαση)
- Mac Conkey άγαρ
- Charman άγαρ
- Sabouraud άγαρ

Επωάζονται σε θερμοκρασία 37° C, για 24 ώρες, αερόβια.

#### IV. ΑΝΑΓΝΩΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΟΣ

Μετά από επώαση 24 ωρών αναζητούμε τις αποικίες των διαφόρων βακτηρίων που αναπτύχθηκαν στα στερεά θρεπτικά υλικά. Γίνεται η απομόνωση των αποικιών με ανακαλλιέργεια και στη συνέχεια ταυτοποίηση και δοκιμή ευαισθησίας στα αντιβιοτικά. Με την τεχνική αυτή θα αναπτυχθούν σχεδόν όλα τα αερόβια βακτήρια που ευθύνονται για τις περιτονίτιδες. Τα βακτήρια που αναζητούνται στο ασκитικό υγρό είναι συνήθως τα παρακάτω αερόβια και αναερόβια του εντερικού σωλήνα:

##### **Αερόβια**

*Escherichia coli*

*Enterococcus spp.*

*Klebsiella spp.*

*Aerobacter spp.*

*Proteus spp.*

*Yersinia enterocolitica*

##### **Αναερόβια**

*Bacteroides spp.*

*Peptococcus spp.*

*Peptostreptococcus spp.*

*Clostridia spp.*

##### **Καλλιέργεια για αναερόβια βακτήρια**

Επειδή τα αναερόβια βακτήρια, μόνα τους ή σε συνδυασμό με τα αερόβια, είναι τα συχνότερα αίτια των περιτονιτιδων, γι αυτό πρέπει να γίνεται αναερόβια καλλιέργεια σε κάθε δείγμα ασκитικού υγρού με στοιχεία φλεγμονής. Η λήψη του δείγματος γίνεται με αναερόβιες συνθήκες. Η σπορά γίνεται γρήγορα σε αιματούχο άγαρ ή *Columbia* άγαρ, με ή χωρίς νεομυκίνη, και σε ζυμό. Όλα τα τρυβλία μπαίνουν στη φιάλη αναερόβιας καλλιέργειας και επωάζονται σε θερμοκρασία 37° C, για 48 ώρες το λιγότερο. Αν στο αιματούχο άγαρ αναπτυχθούν αποικίες, γίνεται χρώση κατά Gram. Με τη χρώση είναι δυνατόν να βρεθούν:

- Gram θετικοί κόκκοι (αναερόβιοι Στρεπτόκοκκοι και Σταφυλόκοκοι)
- Gram θετικά βακτηρίδια (Κλωστηρίδια)
- Gram αρνητικά βακτηρίδια (Βακτηριοειδή)

Μετά τη χρώση γίνεται ταυτοποίηση με βιοχημικές δοκιμασίες και αεριοχρωματογραφία.

## 7.2. Καλλιέργεια πλευριτικού υγρού

Το πλευριτικό υγρό υπάρχει ανάμεσα στα πέταλα του υπεζωκότα, καλύπτει την πλευρική κοιλότητα και σε φυσιολογικές συνθήκες είναι ελάχιστο. Είναι διαυγές και κίτρινο υπερδιήθημα του πλάσματος. Περιέχει λεύκωμα, γλυκόζη και ηλεκτρολύτες σε ίδια αναλογία με το αίμα, δεν περιέχει όμως ινωδογόνο και γι' αυτό δεν πήζει. Περιέχει λίγα λεμφοκύτταρα και αρκετά μεσοθηλιακά κύτταρα.

Το πλευριτικό υγρό φυσιολογικά δεν περιέχει βακτήρια. Καλλιέργεια του υγρού γίνεται σε όλες τις φλεγμονώδεις σηπτικές ή άσηπτες και νεοπλασματικές ασθένειες, όπως φυματίωση πνευμόνων, μικροβιακή ή ιογενή πνευμονία, πνευμονικό έμφρακτο, μεταστατικό καρκίνο και τραύμα θώρακα.

### I. ΛΗΨΗ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ

Η λήψη του πλευριτικού υγρού γίνεται από τον κλινικό γιατρό. Όταν γίνεται εκκενωτική παρακέντηση για θεραπεία ή ανακούφιση του ασθενούς, το υγρό είναι άφθονο. Απορρίπτονται τα πρώτα 5-10 ml, που υπάρχει πιθανότητα να περιέχουν αίμα από τραυματισμό κατά την παρακέντηση. Συλλέγεται υγρό σε 2-3 αποστειρωμένα σωληνάρια, το ένα από τα οποία πρέπει να έχει αντιπηκτικό (κιτρικούχο, EDTA ή ηπαρίνη) για τη σωστή μέτρηση των κυττάρων και το οποίο ανακινούμε αμέσως μετά τη λήψη, για να αποφευχθεί η πήξη του υγρού.

### II. ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΚΗ ΕΞΕΤΑΣΗ

Μεγάλη ποσότητα πλευριτικού υγρού φυγοκεντρείται σε αποστειρωμένα σωληνάρια. Από το ίζημα γίνεται η μικροσκοπική εξέταση και η καλλιέργεια. Αν το υγρό είναι πυώδες, χρησιμοποιείται αυτούσιο. Από το ίζημα ή το αυτούσιο υγρό γίνονται τρία ξηρά παρασκευάσματα. Από αυτά τα δύο μονιμοποιούνται και χρωματίζονται κατά Gram και Ziehl-Neelsen, αν υπάρχει υπόνοια φυματίωσης, και το τρίτο με Giemsa, για να βρούμε τον κυτταρικό τύπο που επικρατεί. Στη χρώση κατά Gram αναζητούμε βακτήρια και εφόσον βρεθούν, ενημερώνεται ο γιατρός και αρχίζει έγκαιρα η θεραπεία, χωρίς να περιμένουμε το αποτέλε-

σμα της καλλιέργειας.

### III. ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ

Γίνεται σε κάθε δείγμα, ανεξάρτητα αν βρεθεί ή όχι βακτήριο στη μικροσκοπική εξέταση. Γίνεται γενική καλλιέργεια ή ειδική, όταν υπάρχουν κλινικά στοιχεία για ειδική μικροβιακή νόσο.

**Γενική καλλιέργεια:** Από το ίζημα ή το αυτούσιο πλευριτικό υγρό, αν αυτό είναι πυώδες, εμβολιάζονται τα παρακάτω **θρεπτικά υλικά:**

- Αιματούχο άγαρ (δύο τρυβλία, το ένα για αναερόβια επώαση)
- Mac Conkey άγαρ
- Σοκολατόχρωμο άγαρ
- Charman και Sabouraud άγαρ
- Θειογλυκολικός ζωμός ή ζωμός τρυπτικάσης-σόγιας, για να αναπτυχθούν βακτήρια που είναι λίγα και για να χρησιμοποιηθεί για ανακαλλιέργεια.

**Σπορά:** Με τη βοήθεια του κρίκου μεταφέρουμε μικρή ποσότητα από το ίζημα του πλευριτικού υγρού και την απλώνουμε σε όλη την επιφάνεια του θρεπτικού υλικού με ενδιάμεσες πυρακτώσεις του κρίκου, για να έχουμε μεμονωμένες αποικίες. Στο Charman και Sabouraud άγαρ το ίζημα εμβολιάζεται χωρίς αραίωση.

**Επώαση:** Τα τρυβλία επωάζονται σε θερμοκρασία 37° C, για 24 ώρες. Το σοκολατόχρωμο άγαρ σε ατμόσφαιρα CO<sub>2</sub> 10%, το ένα αιματούχο σε φιάλη αναερόβιας καλλιέργειας και τα υπόλοιπα σε αερόβιες συνθήκες.

### IV. ΑΝΑΓΝΩΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΟΣ

Την επόμενη ημέρα γίνεται ανάγνωση των καλλιεργειών. Αν δεν αναπτυχθούν αποικίες στα στερεά θρεπτικά υλικά, θα γίνει ανακαλλιέργεια από το ζωμό σε νέα στερεά θρεπτικά υλικά. Όλα τα τρυβλία θα επωαστούν για ακόμα 24 ώρες. Η ανάγνωση των καλλιεργειών, η απομόνωση, η ταυτοποίηση και το αντιβιογράμμα θα γίνουν με το γνωστό τρόπο, ανάλογα με τα βακτήρια που θα αναπτυχθούν.

Τα βακτήρια που συνήθως βρίσκουμε στις λοιμώξεις της θωρακικής κοιλότητας κατά σειρά συχνότητας είναι:

- *Staphylococcus aureus*
- *Streptococcus pneumoniae*
- *Haemophilus influenzae*



- *Mycoplasma pneumoniae*
- *Mycobacterium tuberculosis*
- *Bacteroides fragilis*

#### V. ΕΙΔΙΚΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ

Γίνονται, όταν θέλουμε να απομονώσουμε συγκεκριμένο απαιτητικό βακτήριο που δεν αναπτύσσεται στα θρεπτικά υλικά της γενικής καλλιέργειας. Οι πιο συχνές είναι:

- 1. Καλλιέργεια για *Mycobacterium tuberculosis*:** Φυγοκεντρείται μεγάλη ποσότητα πλευριτικού υγρού στις 6.000 στροφές για 60 min. Από το ίζημα γίνεται άμεσο παρασκεύασμα για χρώση Ziehl-Neelsen και αμέσως γίνεται εμβολιασμός σε δύο σωληνάρια Löwenstein-Jensen, τα οποία επωάζονται για σαράντα ημέρες, το ένα σε θερμοκρασία δωματίου, σε σκοτεινό ντουλάπι και το άλλο σε θερμοκρασία 37° C. Κάθε εβδομάδα ελέγχουμε τις καλλιέργειες. Εάν αναπτυχθούν οι χαρακτηριστικές ανώμαλες, ξηρές, κίτρινες αποικίες, θα γίνει οξεάντοχη χρώση και θα δοθεί το θετικό αποτέλεσμα.
- 2. Καλλιέργεια για αναερόβια:** Αν το υγρό μυρίζει άσχημα ή υποπτευόμαστε αναερόβια λοίμωξη, γίνεται η σπορά του πλευριτικού υγρού αμέσως μετά την παρακέντηση. Το υγρό μεταφέρεται μέσα σε σύριγγα στο εργαστήριο και εμβολιάζεται σε αιματούχο άγαρ ή σε ειδικό άγαρ αναερόβιας καλλιέργειας και σε ζωμό με κρέας ή κιμά. Η επώαση γίνεται σε αναερόβια φιάλη για 2-5 ημέρες. Η ανάγνωση των καλλιεργειών, η απομόνωση και η ταυτοποίηση των αναερόβιων βακτηρίων θα γίνει κατά το γνωστό τρόπο.
- 3. Καλλιέργεια για *Mycoplasma pneumoniae*:** Το πλευριτικό υγρό διατηρείται μέχρι τη σπορά σε ειδικό συντηρητικό υγρό. Η σπορά γίνεται σε ειδικά θρεπτικά υλικά και η ανάγνωση και η ταυτοποίηση του Μυκοπλάσματος θα γίνει με τις γνωστές ειδικές μεθόδους.

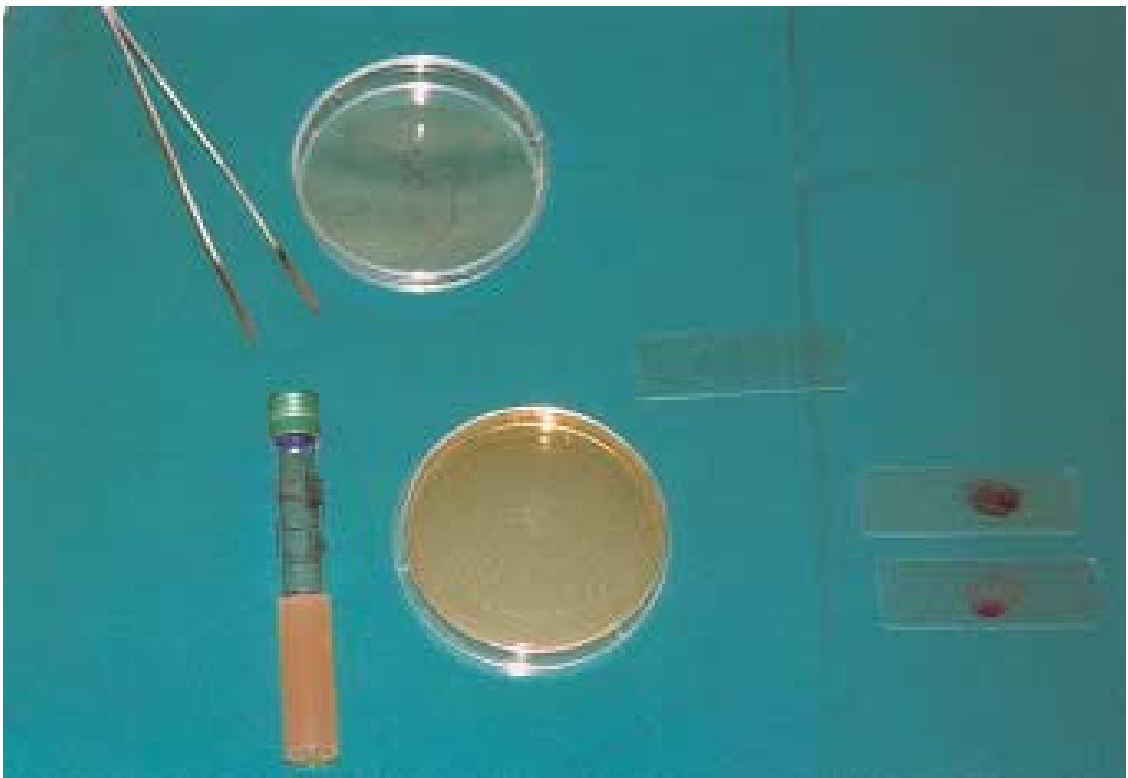
### 8.1. Γενικά για την καλλιέργεια υλικού δερματικών βλαβών

Το δέρμα, οι τρίχες και τα νύχια νοσούν από βακτήρια, Μύκητες, ιούς και ζωικά παράσιτα, όταν μειωθεί η φυσική τους αντίσταση. Η διάγνωση των παθήσεων του δέρματος γίνεται από τις κλινικές εκδηλώσεις, αλλά μερικές φορές χρειάζονται ειδικές εξετάσεις για τη διάγνωση του αιτίου και τη σωστή θεραπεία.

Ανάλογα με το είδος του αιτίου που αναζητούμε, ο τρόπος λήψης του δείγματος, οι μικροσκοπικές εξετάσεις και οι μέθοδοι καλλιέργειας είναι διαφορετικές και διακρίνονται σε μυκητολογικές, βακτηριολογικές, και παρασιτολογικές εξετάσεις. Θα αναφερθούμε ιδιαίτερα μόνο στη μυκητολογική εξέταση.

### 8.2. Μυκητολογική εξέταση δερματικών βλαβών (τριχών, ξησμάτων από λέπια και νύχια)

Η μυκητολογική εξέταση γίνεται, για να διαγνώσουμε το είδος του



Εικόνα 8.1: Μυκητολογική εξέταση και καλλιέργεια τριχών

Μύκητα που προκαλεί τη βλάβη, ώστε να δοθεί η σωστή θεραπεία. Οι μυκητιάσεις του δέρματος και των εξαρτημάτων του είναι:

- Ονυχομυκητίαση
- Άκωρας
- Μυκητίαση του γενείου
- Τριχοφυτίαση κεφαλής, κορμού και ποδιών
- Ποικιλόχρους πυτιρίαση

### Ι. ΛΗΨΗ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ

Η λήψη του δείγματος γίνεται στο εργαστήριο με ειδικό τρόπο. Ο ασθενής σταματά, λίγες ημέρες πριν, να βάζει αντιμυκητιασικά ή άλλα τοπικά φάρμακα. Εξετάζονται όλες οι βλάβες από τους Μύκητες και επιλέγεται η πιο χαρακτηριστική περιοχή από την οποία θα πάρουμε το δείγμα.

#### A. ΔΕΡΜΑ

Η λήψη γίνεται με απόξεση από την περιοχή της βλάβης που συνορεύει με το υγιές δέρμα, αφού καθαρίσουμε την περιοχή αυτή με βαμβακοφόρο στείλεο. Αν η βλάβη είναι ξηρή, την καθαρίζουμε με αιθέρα, για να διευκολύνουμε την απολέπιση. Με μια αποστειρωμένη αντικειμενοφόρο πλάκα ξύνουμε την περιοχή της βλάβης που συνορεύει με το υγιές δέρμα. Χρησιμοποιούμε μια λαβίδα, για να αποσπάσουμε τα λέπια, αν αυτό είναι δυνατόν και τα μαζεύουμε μέσα σε τρυβλίο. Αν η βλάβη είναι υγρή, την καθαρίζουμε με φυσιολογικό ορό και παίρνουμε το υλικό με βαμβακοφόρο στείλεο.



Εικόνα 8.2: Καλλιέργεια *Candida albicans* σε κοινό και χρωμογόνο Sabouraud άγαρ

#### B. ΝΥΧΙΑ

Ξύνουμε με αποστειρωμένη αντικειμενοφόρο πλάκα την περιοχή της βλάβης που συνορεύει με το υγιές τμήμα του περιονυχίου και της ελεύθερης επιφάνειας του νυχιού. Αν είναι δυνατόν, προσπα-

θούμε να πάρουμε τμήμα και από το νύχι.

### Γ. ΤΡΙΧΕΣ

Μαζεύουμε τρίχες λεπτές, σπασμένες και αποχρωματισμένες. Οι τρίχες αυτές ξερριζώνονται με μια λαβίδα μαζί με κομμάτι επιδερμίδας. Στα τριχωτά μέρη που η βλάβη δεν είναι εμφανής μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε τη μέθοδο της μοκέτας. Παίρνουμε δηλαδή ένα κομμάτι μοκέτας, αποστειρωμένο, με το οποίο τρίβουμε όλη την επιφάνεια της βλάβης. Τοποθετούμε το κομμάτι αυτό απευθείας στο τρυβλίο με το θρεπτικό υλικό για καλλιέργεια. Υπάρχει μια ειδική λάμπα (Wood) με την οποία οι πάσχουσες τρίχες δίνουν χαρακτηριστικό φθορισμό και εντοπίζονται πιο εύκολα.

### II. ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΚΗ ΕΞΕΤΑΣΗ

Η μικροσκοπική εξέταση γίνεται σε άμεσο νωπό και χρωματισμένο παρασκεύασμα.

**Νωπό παρασκεύασμα:** Σε αντικειμενοφόρο πλάκα βάζουμε τρίχες ή λέπια και προσθέτουμε σταγόνες διαλύματος NaOH 10% ή KOH 20%. Για τα νύχια χρησιμοποιούμε NaOH 30%. Θερμαίνουμε την πλάκα πάνω από τη φλόγα, μέχρι να αρχίσουν να βγαίνουν φυσαλίδες, για να επιτύχουμε διαύγαση της κεράτινης στιβάδας. Τοποθετούμε μεγάλη καλυπτρίδα και μικροσκοπούμε. Αναζητούμε βλαστοσπόρια ή σε περίπτωση δερματομυκητίασης αρθροσπόρια.

**Χρωματισμένο παρασκεύασμα:** Χρωματίζουμε τα λέπια με κυανό του μεθυλενίου ή κυανό της λακτοφαινόλης.

Για το Μύκητα *Malassezia furfur*, που προκαλεί την ποικιλόχρωμη πιτυρίαση στο δέρμα, παίρνουμε ξέσματα της επιδερμίδας σε αντικειμενοφόρο πλάκα και τα διαβρέχουμε με οξικό οξύ. Θερμαίνουμε την πλάκα πάνω σε φλόγα, μέχρι να εξατμισθεί το οξύ. Χρωματίζουμε με κυανό του μεθυλενίου.

### III. ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ

**Θρεπτικό υλικό:** Για την καλλιέργεια των Μυκήτων είναι το Sabouraud άγαρ με γλυκόζη. Το Sabouraud άγαρ πρέπει να περιέχει αντιβιοτικά τα οποία αναστέλλουν την ανάπτυξη των βακτηρίων του δείγματος. Επιπλέον μέσα στο θρεπτικό υλικό πρέπει να υπάρχει ακτιδιόνη, η οποία εμποδίζει την ανάπτυξη των σαπροφυτικών, μη παθο-

γόνων, Μυκήτων αλλά και των Ασπέργιλλων και μερικών ειδών *Candida*. Για την πρωτοκαλλιέργεια υπάρχει χρωμογόνο άγαρ, με το οποίο, μετά από επώαση 48 ωρών, διαχωρίζεται η *Candida albicans*. Η καλλιέργεια της *Malassezia furfur* γίνεται σε Sabouraud άγαρ την επιφάνεια του οποίου επιστρώνουμε με λάδι.

**Σπορά:** Με κρίκο ή με λεπτή λαβίδα παίρνουμε δείγμα και το εμβολιάζουμε στο υλικό βυθίζοντάς το μέσα σε σωληνάριο με βιδωτό πώμα ή σε τρυβλίο. Κλείνουμε καλά το σωληνάριο με το πώμα και σφραγίζουμε το τρυβλίο με leucoplast.

**Επώαση:** Η επώαση γίνεται πάντα αερόβια και σε θερμοκρασία δωματίου. Τα δερματόφυτα επωάζονται σε θερμοκρασία δωματίου για τρεις εβδομάδες. Λίγοι μύκητες (όπως π.χ. οι βλαστομύκητες *Candida*) μπορούν και αναπτύσσονται σε θερμοκρασία 37<sup>o</sup> C και η επώασή τους διαρκεί 2-3 ημέρες.

#### IV. ΑΝΑΓΝΩΣΗ - ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ

Η ανάγνωση των καλλιεργειών περιλαμβάνει τη μικροσκοπική εξέταση της μορφολογίας του Μύκητα που αναπτύχθηκε και τον έλεγχο της μακροσκοπική εικόνας των αποικιών. Αυτά βοηθούν και στην ταυτοποίηση του Μύκητα.

Για την *Candida albicans* γίνονται διάφορες δοκιμασίες ταυτοποίησης, όπως:

- Ζύμωσης και αφομοίωσης σακχάρων (ζυμόγραμμα, αυξανόγραμμα).
- Παραγωγής χλαμυδοσπορίων.
- Παραγωγής βλαστικού σωλήνα (germ tube test).

Κατά τη δοκιμασία παραγωγής βλαστικού σωλήνα εμβολιάζουμε 1-3 αποικίες από το καλλιέργημα σε 0.5ml ορού αίματος. Στη συνέχεια επωάζουμε για 2 ώρες, σε θερμοκρασία 37<sup>o</sup> C, αερόβια, και ελέγχουμε με το μικροσκόπιο αν από τα βλαστοκύτταρα έχουν βλαστήσει εκβλαστώματα με τη μορφή βλαστικού σωλήνα.

## 9.1. Καλλιέργεια κοπράνων

Η καλλιέργεια των κοπράνων γίνεται, για να διαγνώσουμε το αίτιο διαρροϊκών εντερικών ασθενειών. Γίνεται γενική αλλά και ειδική καλλιέργεια για διαγνωστικούς και επιδημιολογικούς λόγους, όπως στην τροφική δηλητηρίαση, στις επιδημίες διάρροιας, στη χολέρα κ.ά. Τα κόπρανα έχουν άφθονη φυσιολογική μικροβιακή χλωρίδα (Εντεροβακτηριακά, Μύκητες, Εντερόκοκκους, Σταφυλόκοκκους, Κλωστηρίδια κ.ά.). Βακτήρια στα κόπρανα πάντα παθογόνα είναι τα: Σαλμονέλλες, Σιγκέλλες, εντεροπαθογόνοι ορότυποι της *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae* κ.ά. Ευκαιριακά παθογόνα είναι τα: *Staphylococcus aureus*, Κλεμψιέλλες, Πρωτεΐς, Ψευδομονάδες, Κλωστηρίδια κ.ά.

### I. ΛΗΨΗ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ

Το καλύτερο δείγμα είναι μια πρόσφατη διαρροϊκή κένωση. Τα κόπρανα τοποθετούνται σε αποστειρωμένο βιδωτό φιαλίδιο, το οποίο στέλνεται γρήγορα στο εργαστήριο. Αν η εξέταση καθυστερήσει πάνω από 2 ώρες, το δείγμα τοποθετείται σε υλικό συντήρησης Stuart. Από τα στερεά ή ημιστερεά κόπρανα το δείγμα λαμβάνεται με βαμβακοφόρο σπειλέο, όπως και από το ορθό των νεογνών και βρεφών. Κατάλληλο ορθικό δείγμα είναι αυτό που έχει χρωματίσει το βαμβάκι.

### II. ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΚΗ ΕΞΕΤΑΣΗ

Η μικροσκοπική εξέταση κοπράνων γίνεται, για να διαπιστώσουμε την παρουσία ή απουσία πυσσφαιρίων, γιατί έτσι μπορούμε να διακρίνουμε τη μικροβιακή από την ιογενή λοίμωξη.

### III. ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ

Για την πρωτοκαλλιέργεια θα χρησιμοποιηθούν περισσότερα από ένα στερεά **θρεπτικά υλικά** και ένας εμπλουτιστικός ζωμός. Τα υλικά αυτά είναι:

- Mac Conkey άγαρ (για βακτήρια που ζυμώνουν τη λακτόζη)
- Αιματούχο άγαρ
- SS ή DCA άγαρ (για βακτήρια που δε ζυμώνουν τη λακτόζη, δηλαδή Σαλμονέλλες και Σιγκέλλες)
- Ζωμός με σεληνίτη (για Σαλμονέλλες) ή τετραθειονικός ζωμός

με προσθήκη πυκνού Iugol

- Charman άγαρ (για Σταφυλόκοκκους)
- Sabouraud άγαρ (για Μύκητες)

**Σπορά:** Το δείγμα εμβολιάζεται σε ένα σημείο του τρυβλίου και μετά απλώνεται σε όλη την επιφάνειά του με ενδιάμεσες πυρακτώσεις του κρίκου, για να έχουμε μεμονωμένες αποικίες. Στο Charman και Sabouraud άγαρ ο εμβολιασμός γίνεται χωρίς αραίωση. Τελευταίος εμβολιάζεται ο ζωμός του σελνίτη. Τα τρυβλία επωάζονται σε θερμοκρασία 37<sup>0</sup> C, για 24 ώρες, αερόβια. Ο ζωμός του σελνίτη επωάζεται το πολύ 4 - 6 ώρες και στη συνέχεια γίνεται ανακαλλιέργεια από το ζωμό στο SS ή DCA άγαρ με την τεχνική της αραίωσης.

#### IV. ΑΝΑΓΝΩΣΗ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ

Την επόμενη ημέρα αρχίζει η ανάγνωση κάθε τρυβλίου χωριστά:

- *Mac Conkey άγαρ:* Υπάρχει συνήθως άφθονη ανάπτυξη αποικιών των βακτηρίων που διασπούν τη λακτόζη, όπως είναι η *Escherichia coli* και Κλεμψιέλλα. Αν προέρχονται από βρέφος με διάρροια, οι αποικίες της *Escherichia coli* ελέγχονται με τους ειδικούς αντιορούς. Αν υπάρχει καθαρή συγκόλληση με μονοδύναμους και πολυδύναμους αντιορούς, χαρακτηρίζεται ως παθογόνο στέλεχος της *Escherichia coli* συγκεκριμένου ορότυπου και γίνεται αμέσως δοκιμή ευαισθησίας στα αντιβιοτικά.
- *Τρυβλίο με SS ή DCA άγαρ:* Συνήθως δεν υπάρχει άφθονη ανάπτυξη αποικιών. Η *Escherichia coli* δίνει κόκκινες αποικίες που αγνοούνται. Αναζητούμε τις άχρωμες αποικίες Σαλμονελλών και Σιγκελλών. Από τις άχρωμες αποικίες γίνεται προκαταρκτική ορολογική δοκιμή με πολυδύναμους ορούς Σαλμονελλών και Σιγκελλών. Αν υπάρξει συγκόλληση, γίνεται δοκιμή ευαισθησίας στα αντιβιοτικά. Ανεξάρτητα αν γίνει ή όχι συγκόλληση με τους αντιορούς, γίνεται ανακαλλιέργεια για την απομόνωση του βακτηρίου. Τις ίδιες εξετάσεις κάνουμε και στα τρυβλία SS ή DCA άγαρ που καλλιεργήθηκαν με το ζωμό του σελνίτη.
- *Τρυβλίο με Charman άγαρ:* Αναγνωρίζουμε τις χρυσοκίτρινες αποικίες του *Staphylococcus aureus*. Γίνεται δοκιμή παραγωγής κοαγκουλάσης και σημειώνεται περίπου ο αριθμός των αποικιών.
- *Τρυβλίο με Sabouraud άγαρ:* Αφού παραμείνει μετά την



επάση για άλλες 24 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου, αναγνωρίζουμε εύκολα τις αποικίες των *Candida*. Για την *Candida albicans* γίνεται δοκιμή παραγωγής χλαμυδοσπορίων ή βλαστικού σωλήνα.

#### V. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ - ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ

Από τις άχρωμες αποικίες του SS ή του Mac Conkey άγαρ γίνεται ανακαλλιέργεια σε νέο Mac Conkey άγαρ. Επωάζονται σε θερμοκρασία 37° C, αερόβια, και την επόμενη ημέρα έχουμε άφθονη ανάπτυξη και πιο καθαρές αποικίες για τις βιοχημικές δοκιμές.

Από τις καθαρές αποικίες του Mac Conkey άγαρ κάνουμε ταυτοποίηση με το API 20 E ή άλλο αυτοματοποιημένο σύστημα. Οι Σαλμονέλλες, οι Σιγκέλλες και τα εντεροπαθογόνα στελέχη της *Escherichia coli* τυποποιούνται συμπληρωματικά με ορολογικές αντιδράσεις.

#### VI. ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ

Σε κάθε απομόνωση Σαλμονέλλας, Σιγκέλλας ή άλλων εντεροπαθογόνων η καλλιέργεια θεωρείται θετική και γίνεται δοκιμή ευαισθησίας στα αντιβιοτικά. Λίγες αποικίες *Staphylococcus aureus* δεν αξιολογούνται, εφόσον έχει αναπτυχθεί κανονικά η φυσιολογική χλωρίδα. Ο *Staphylococcus aureus* αξιολογείται, όταν έχουμε μεγάλη ανάπτυξη (100 περίπου αποικίες) και φτωχή φυσιολογική χλωρίδα. Λίγες αποικίες Κλεμπσιελλών και Πρωτέων βρίσκονται και στα κόπρανα υγιών και κυρίως στους νοσοκομειακούς ασθενείς 8-10 ημέρες μετά την εισαγωγή τους. Αυτές δεν αξιολογούνται ούτε αναφέρονται στο αποτέλεσμα της καλλιέργειας.

#### VII. ΕΚΘΕΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΟΣ

Η έκθεση του αποτελέσματος πρέπει να συντάσσεται με σαφήνεια. Έτσι σε περίπτωση θετικής καλλιέργειας η απάντηση που θα δοθεί θα πρέπει να είναι: «Αναπτύχθηκε *Salmonella paratyphi B* ή *Shigella*», ενώ σε περίπτωση αρνητικής καλλιέργειας θα πρέπει να αναφέρονται αναλυτικά όλα τα εντεροπαθογόνα βακτήρια για τα οποία έγινε μικροβιολογικός έλεγχος π.χ. «Δεν αναπτύχθηκαν τα εντεροπαθογόνα *Salmonella*, *Shigella* και *Escherichia coli*».



## 9.2. Παρασιτολογική εξέταση κοπράνων

Η παρασιτολογική εξέταση κοπράνων περιλαμβάνει τη μακροσκοπική και μικροσκοπική εξέταση, τον εμπλουτισμό των κοπράνων για ωάρια και κύστεις παράσιτων και καλλιέργειες.

### Ι. ΛΗΨΗ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ

Οι τρόποι λήψης των κοπράνων για παρασιτολογική εξέταση διαφέρουν ανάλογα με το παράσιτο που αναζητούμε. Οι πιο συνηθισμένοι τρόποι λήψης είναι:

- *Δείγμα φυσικής κένωσης:* Αυτό το δείγμα προτιμάται, όταν εξετάζουμε τα κόπρανα για σκουλήκια, για ωάρια σκουληκιών και για κύστεις πρωτόζωων, όπως των Αμοιβάδων. Οι παρασιτολογικές εξετάσεις πρέπει να γίνονται το πολύ σε 1-2 ώρες από την ώρα λήψης του δείγματος, διαφορετικά τα κόπρανα πρέπει να συντηρούνται με ειδικούς τρόπους. Τα κόπρανα μεταφέρονται στο εργαστήριο σε καθαρό και στεγνό δοχείο που έχει μέσα στείλεό ή σε φιαλίδια με μεγάλο στόμιο και βιδωτό πώμα. Το δείγμα είναι προτιμότερο να λαμβάνεται από την πρωινή κένωση.
- *Δείγμα μετά από καθαρτικό:* Κόπρανα μετά από καθαρτικό προτιμούνται μόνο, όταν ζητάμε Αμοιβάδες. Ο ασθενής το πρωί, νηστικός, πίνει μια καθαρτική λεμονάδα ή αλατούχο καθαρτικό. Χρησιμοποιούμε για την εξέταση την τρίτη, τέταρτη και πέμπτη κένωση. Αν ο ασθενής έχει διάρροια, δε δίνεται καθαρτικό. Στα παιδιά η δόση του καθαρτικού κανονίζεται ανάλογα με την ηλικία. Δε δίνεται καθαρτικό σε παιδιά κάτω των 5 ετών. Συνήθως δίνουμε το προηγούμενο βράδυ μισή καθαρτική σοκολάτα ή τσίχλα.
- *Πρωκτικό επίχρισμα για Οξύουρους:* Επειδή οι Οξύουροι γεννούν μέσα στις πρωκτικές πτυχές, παίρνουμε δείγμα κυρίως από αυτές και όχι από τα κόπρανα.
- *Δείγμα από ορθοσκόπηση:* Το δείγμα αυτό λαμβάνεται ως επίχρισμα του εντερικού βλεννογόνου σε περίπτωση που υπάρχουν υπόνοιες για αμοιβάδωση ή εντερική ελμινθίαση.

## II. ΜΑΚΡΟΣΚΟΠΙΚΗ ΕΞΕΤΑΣΗ ΚΟΠΡΑΝΩΝ

Είναι βασική εξέταση με την οποία μπορούμε να δούμε τους Οξυούρους, τις Ασκαρίδες και τις προγλωττίδες των εντερικών ταινιών.

## III. ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΚΗ ΕΞΕΤΑΣΗ

Η μικροσκοπική αναζήτηση των παράσιτων γίνεται κυρίως με άμεσο νωπό, αλλά και με ξηρό, χρωματισμένο παρασκεύασμα.

*Άμεσο νωπό παρασκεύασμα:* Σε αντικειμενοφόρο πλάκα βάζουμε μια σταγόνα φυσιολογικού ορού και με κρίκο μεταφέρουμε μια ποσότητα κοπράνων. Τα ανακατεύουμε, σκεπάζουμε με καλυπτρίδα και μικροσκοπούμε. Το εναιώρημα των κοπράνων πρέπει να είναι αραιό, για να αναγνωρίζονται πιο εύκολα τα στοιχεία που αναζητούμε. Αν τα κόπρανα είναι διαρροϊκά, δε γίνεται αραιώση με φυσιολογικό ορό, αλλά χρησιμοποιούνται αυτούσια. Η επιτυχία της εξέτασης εξαρτάται πολύ από το μέρος των κοπράνων που θα διαλέξουμε για το άμεσο παρασκεύασμα. Αν τα κόπρανα είναι σχηματισμένα και σκληρά, παίρνουμε από την επιφάνεια. Αν είναι ημιδιαρροϊκά ή μισοσχηματισμένα, θα τα ανακατέψουμε με ξύλινο σπειρό, μήπως βρούμε ζωντανά σκουλήκια ή βλέννες. Αν είναι διαρροϊκά, ανακατεύουμε με κρίκο και πιάνουμε θολερές κροκίδες από βλέννα και πύο.

*Άμεσο παρασκεύασμα με Iugol ή με MIF (μεθειολική ιωδιούχο φορμαλδεΐδη):* Σε αντικειμενοφόρο πλάκα ανακατεύουμε μια ποσότητα κοπράνων, που παίρνουμε με τον κρίκο, με μια σταγόνα ιωδιούχου διαλύματος (Iugol) και μικροσκοπούμε. Με το Iugol χρωματίζεται το κυτταρόπλασμα των κύστεων καστανό προς κίτρινο. Αν μέσα στην κύστη υπάρχει γλυκογόνο, χρωματίζεται έντονα καστανό. Ο πυρήνας με το καρυόσωμα και τα κοκκία χρωματίνης παίρνουν πιο σκούρο καστανό χρώμα. Με το MIF μονιμοποιούνται οι τροφοζωΐτες και χρωματίζονται μαζί με τις κύστες, όπως με το Iugol. Αν στο παρασκεύασμα αυτό προσθέσουμε μια σταγόνα πωσίνης, το κυτταρόπλασμα των τροφοζωΐτων και των κύστεων χρωματίζεται κοκκινωπό, ενώ οι πυρήνες διατηρούν το καστανό χρώμα.

*Άμεσο παρασκεύασμα με πωσίνη:* Το εναιώρημα των κοπράνων γίνεται με διάλυμα 0,1 % πωσίνης σε φυσιολογικό ορό. Με

την πωσίνη δε χρωματίζονται τα ζωντανά ζωικά κύτταρα, δηλαδή οι τροφοζώιτες και οι κύστει των πρωτόζωων, τα ωάρια των Ελμίνθων, οι βλαστομύκητες, τα λευκά αιμοσφαίρια και τα μακροφάγα. Έτσι διακρίνονται σαν λευκά μαργαριτάρια μέσα στο κόκκινο φόντο της πωσίνης. Όταν τα πρωτόζωα και τα κύτταρα πεθάνουν, τότε χρωματίζονται.

*Άμεσο παρασκεύασμα με κυανό του μεθυλενίου:* Το κυανό του μεθυλενίου σε όξινο ρυθμιστικό διάλυμα χρωματίζει τις Αμοιβάδες. Έτσι διακρίνονται σαν μπλε σωματίδια μέσα στο οπτικό πεδίο.

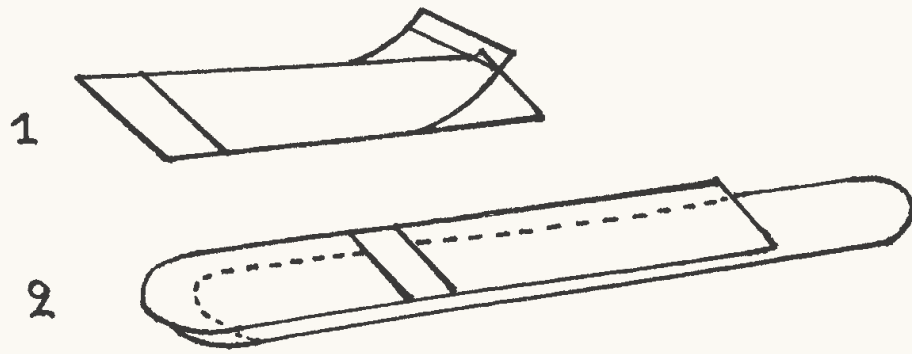
*Ειδικές χρώσεις Αμοιβάδων και άλλων πρωτόζωων:* Οι Αμοιβάδες των κοπράνων δε χρωματίζονται με τις χρώσεις που χρησιμοποιούνται συνήθως στο αίμα για το χρωματισμό των Πλασμιδίων και των Λεϊσμανιών (π.χ. Giemsa). Χρειάζονται ειδικές χρώσεις, όπως η χρώση σιδηρούχου αιματοξυλίνης, η τρίχρωμη χρώση (ειδική για την Τριχομονάδα) και η φθορίζουσα χρώση.

#### IV. ΜΕΘΟΔΟΙ ΕΜΠΛΟΥΤΙΣΜΟΥ ΤΩΝ ΚΟΠΡΑΝΩΝ ΓΙΑ ΩΑΡΙΑ ΚΑΙ ΚΥΣΤΕΙΣ ΠΑΡΑΣΙΤΩΝ

Επειδή ο αριθμός των ωαρίων των σκουληκιών και των κύστεων είναι μικρός, κάνουμε εμπλουτισμό των κοπράνων με τη μέθοδο της επίπλευσης των ωαρίων και των κύστεων ή με τη μέθοδο της καθίζησης.

##### A. ΜΕΘΟΔΟΣ ΤΗΣ ΕΠΙΠΛΕΥΣΗΣ ΜΕ ΘΕΙΙΚΟ ΨΕΥΔΑΡΓΥΡΟ

- Μέσα σε ένα σωληνάριο παρασκευάζουμε εναιώρημα κοπράνων με νερό βρύσης. Διηθούμε το εναιώρημα μέσα από διπλό στρώμα βρεγμένης γάζας.
- Φυγοκεντρούμε για 1-2min στις 1500 στροφές και αφαιρούμε το υπερκείμενο θολό υγρό. Επαναλαμβάνουμε το πλύσιμο των κοπράνων μέχρι το υπερκείμενο υγρό να γίνει διαυγές.
- Προσθέτουμε στο ίζημα λίγα ml διαλύματος θειικού ψευδαργύρου, ανακατεύουμε, συμπληρώνουμε μέχρι το στόμιο του σωληναρίου και φυγοκεντρούμε ξανά για 1-2min στις 1500 στροφές. Επειδή οι κύστει είναι ελαφρότερες, ανεβαίνουν στην επιφάνεια



Σχήμα 9.1: Μέθοδος της κολλητικής ταινίας

του υγρού. Κάνουμε νωπό παρασκεύασμα με φυσιολογικό ορό και με lugol και μικροσκοπούμε.

Η μέθοδος αυτή είναι η καλύτερη για τον εμπλουτισμό κύστεων πρωτόζωων και των ελαφρότερων ωαρίων σκουληκιών, όπως των Οξύουρων, γιατί έχουν μικρό βάρος και επιπλέουν.

#### Β. ΜΕΘΟΔΟΣ ΚΑΘΙΣΗΣ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΚΑΙ ΜΟΝΙΜΟΠΟΙΗΣΗ

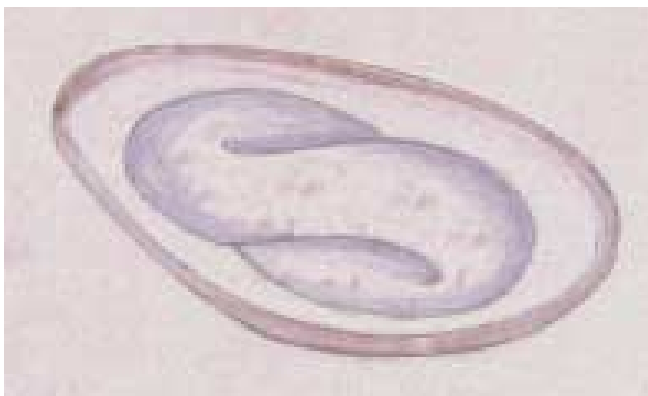
- Παρασκευάζουμε εναιώρημα κοπράνων με νερό βρύσης και διπθούμε το εναιώρημα μέσα από βρεγμένη γάζα.
- Φυγοκεντρούμε σε κωνικό σωληνάριο μια ποσότητα του διπθήματος για 1-2min στις 1500 στροφές.
- Αφαιρούμε το υπερκείμενο υγρό και επαναλαμβάνουμε το πλύσιμο των κοπράνων 2-3 φορές, μέχρι το υπερκείμενο υγρό να γίνει διαυγές.
- Στο ίζημα προσθέτουμε λίγα ml φορμαλίνης 5%, ανακινούμε καλά, συμπληρώνουμε με φορμαλίνη μέχρι τα 3/4 του σωληναρίου, ανακατεύουμε και αφήνουμε για 5min να γίνει η μονιμοποίηση των παρασίτων.
- Ανακατεύουμε και επιστιβάζουμε 3ml αιθέρα. Σκεπάζουμε το σωληνάριο και ανακινούμε ζωηρά.
- Φυγοκεντρούμε για 1-2min στις 1500 στροφές και αφαιρούμε το υπερκείμενο υγρό. Κάνουμε από το ίζημα νωπό παρασκεύασμα με φυσιολογικό ορό και lugol και μικροσκοπούμε.

Η μέθοδος αυτή είναι η καλύτερη για τη συγκέντρωση των ωαρίων

όλων των Ελμίνθων, γιατί έχουν μεγάλο βάρος και καθιζάνουν στο ίζημα.

#### Ν. ΕΞΕΤΑΣΗ ΓΙΑ ΟΞΥΟΥΡΟΥΣ

Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για τη διάγνωση των Οξύουρων με πρωκτικό επίχρισμα είναι:



Σχήμα 9.2: Ωάριο Οξύουρου

#### Α. ΜΕΘΟΔΟΣ ΤΗΣ ΚΟΛΛΗΤΙΚΗΣ ΤΑΙΝΙΑΣ

- Κόβουμε ένα κομμάτι κολλητικής ταινίας και το κολλάμε πάνω σε αντικειμενοφόρο πλάκα.
- Τοποθετούμε την πλάκα στη μέση μιας ξύλινης σπάτουλας.
- Ανασπώνουμε το ένα άκρο της ταινίας και το αναδιπλώνουμε γύρω από το ένα άκρο της σπάτουλας με την κολλητική επιφάνεια να είναι στραμμένη προς τα έξω.
- Βάζουμε το παιδί να καθίσει ακουμπώντας στα γόνατα και στους αγκώνες και πιέζουμε την κολλητική ταινία ανάμεσα στις πρωκτικές πτυχές. Στην ταινία θα κολλήσουν πολλά επιθηλιακά κύτταρα, υπολείμματα κοπράνων και ωάρια Οξύουρων.
- Κολλάμε πάλι την ταινία πάνω στην πλάκα.
- Μικροσκοπούμε με ξηρό φακό με μικρή και στη συνέχεια με μεγάλη μεγέθυνση. Τα ωάρια των Οξύουρων αναγνωρίζονται πολύ εύκολα και διακρίνεται μέσα τους το ζωντανό έμβρυο. Η εξέταση πρέπει να γίνεται το πρωί, πριν πλυθεί το παιδί. Αν είναι αρνητική, επαναλαμβάνεται πολλές φορές. Η λήψη του δείγματος είναι δυνατόν να γίνει και από τη μητέρα του παιδιού, αφού της δοθούν σχετικές οδηγίες.

#### Β. ΜΕΘΟΔΟΣ ΣΤΕΙΛΕΟΥ ΜΕ ΠΑΡΑΦΙΝΗ

- Επαλείφουμε ένα βαμβakoφόρο στείλεό με βαζελίνη και τον βυθίζουμε σε ζεστή λιωμένη παραφίνη. Στη συνέχεια περιμένουμε λίγο να στεγνώσει.
- Με το στείλεό αυτό παίρνουμε το πρωκτικό επίχρισμα ανάμεσα

από τις πρωκτικές πτυχές και ταυτόχρονα λίγο ορθικό επίχρισμα βάζοντας το σπειλέο μέσα στο ορθό, περίπου 1 cm. Στην παραφί-νη κολλούν τα ωάρια, τα επιθήλια και υπολείμματα κοπράνων.

- Βυθίζουμε το σπειλέο σε ξυλόλη για 3-5min, οπότε απελευθερώνονται τα στοιχεία αυτά από πάνω του.
- Φυγοκεντρούμε, για να απομακρύνουμε τη ξυλόλη, και αφαιρούμε το υπερκείμενο υγρό.
- Μικροσκοπούμε το ίζημα, στο οποίο στη συνέχεια αναζητάμε τα ωάρια των Οξύουρων.

Η μέθοδος αυτή είναι προτιμότερη, γιατί μας δίνει πιο καθαρή εικόνα των ωαρίων των Οξύουρων.

### 10.1. Γενικά

Τα μικροβιολογικά ιατρικά εργαστήρια είναι χώροι στους οποίους



Εικόνα 10.1: Καμπίνα βιολογικής ασφάλειας

θεωρούμε ότι όλοι όσοι εργάζονται μέσα ή κοντά σε αυτά, κινδυνεύουν να μολυνθούν με μολυσματικές ασθένειες από τα παθολογικά δείγματα και από τα βακτήρια που καλλιεργούνται. Εκτίθενται επίσης σε μια σειρά από άλλους κινδύνους. Αυτό σημαίνει ότι πρέπει να λαμβάνονται ειδικά μέτρα για την προστασία των εργαζομένων, αλλά και για την προστασία του πληθυσμού και του περιβάλλοντος από πιθανή διασπορά βακτηρίων.

Στη χώρα μας μέχρι το 1985 δεν υπήρχε νόμος για την προστασία των εργαζομένων από ατυχήματα στο χώρο της εργασίας. Το 1985 θεσπίστηκε ειδικός νόμος, ο οποίος αναφέρεται στην υγιεινή και την ασφάλεια των εργαζομένων.

Ειδικά για εργαζόμενους στο χώρο της υγείας ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (**World Health Organization**) και το διεθνές Κέντρο για τον Έλεγχο των Λοιμώξεων (**Centers for Disease Control**) ενημερώνουν τακτικά τους εργαζόμενους για τα μέτρα που πρέπει να λαμβάνονται σε κάθε περίπτωση.

Τα μέτρα αυτά έχουν σχέση με:



- Τον τρόπο που σχεδιάζουμε τις εγκαταστάσεις και τα όργανα του εργαστηρίου.
- Τον τρόπο που εργαζόμαστε.
- Τα υλικά που χρησιμοποιούμε, για να προστατευθούμε.
- Τη διαχείριση των μολυσματικών απορριμμάτων.

Επειδή κάθε εργαστήριο έχει τις δικές του ιδιαιτερότητες, θα πρέπει να προσαρμόζει τα μέτρα αυτά σε ένα δικό του πρόγραμμα ασφαλείας, έναν οδηγό δηλαδή, που θα προτείνει τα μέτρα που πρέπει να λαμβάνονται σε κάθε περίπτωση. Τον οδηγό αυτό θα πρέπει να τον φτιάξει κάποιος επιστήμονας που γνωρίζει τις τεχνικές που χρησιμοποιούνται, τις διαδικασίες ασφαλείας και τους τρόπους που πρέπει να διαχειριζόμαστε τα μολυσματικά απορρίμματα. Ο επιστήμονας αυτός θα είναι υπεύθυνος και θα ελέγχει την τήρηση των κανόνων αυτών.

Όσον αφορά τους χώρους, θα πρέπει να είναι ευρύχωροι, ώστε να επιτρέπουν την άνετη κυκλοφορία των εργαζομένων στο εργαστήριο και να υπάρχει έξοδος κινδύνου στην οποία να φθάνουμε γρήγορα και χωρίς εμπόδια. Να υπάρχει καμπίνα βιολογικής ασφάλειας ή θάλαμος συνεχούς ροής αέρα, για να γίνεται η επεξεργασία των παθολογικών δειγμάτων. Να υπάρχουν χώροι με ντουλάπια, για να φυλάμε τα ρούχα και τα προσωπικά μας αντικείμενα, καθώς και χώρος ειδικός για φαγητό.

Για την περίπτωση φωτιάς θα πρέπει να ξέρουν όλοι πού βρίσκεται η πυροσβεστική φωλιά και πώς λειτουργούν οι πυροσβεστήρες. Αν αυτό που καίγεται είναι χαρτί, ξύλο ή ύφασμα, μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε και νερό. Αν πιάσουν φωτιά τα ρούχα μας, πρέπει να τυλιχτούμε σε μια κουβέρτα, για να λιγοστέψει το οξυγόνο και να κυλιστούμε στο πάτωμα μακριά από τη φωτιά. Στα καινούργια νοσοκομεία υπάρχουν αυτόματα συστήματα ελέγχου της φωτιάς (ηλεκτρονικοί αισθητήρες φωτιάς).

Όταν προσλαμβάνεται ένας εργαζόμενος, πρέπει να ενημερώνεται



Εικόνα 10.2: Συχνό πλύσιμο χεριών



αναλυτικά για τους κινδύνους και για τον τρόπο προστασίας από αυτούς. Πρέπει επίσης να ελέγχεται η κατάσταση της υγείας του, να εμβολιάζεται για Ηπατίτιδα Β και να επανελέγχεται σε τακτά διαστήματα.

Σε σχέση με τα όργανα, μερικοί τρόποι, για να προστατευτούμε, είναι:

- Όταν αλλάζουμε τη φιάλη προπανίου στη λυχνία Bunsen, να ελέγχουμε την πιθανότητα διαφυγής αερίου με σαπουνάδα και όχι με σπίρτα. Οι φιάλες πρέπει να βρίσκονται σε δροσερό και ευάερο μέρος.
- Πρέπει να προσέχουμε, όταν χειριζόμαστε ηλεκτρικές συσκευές και να τις βγάζουμε από την πρίζα, όταν υπάρχει βλάβη.

#### Ειδικά για τη φυγόκεντρο θα πρέπει:

1. Να φοράμε γάντια, ιδίως όταν φυγοκεντρούμε μολυσμένα υλικά.
2. Τα σωληνάρια να τοποθετούνται το ένα απέναντι από το άλλο και να έχουν το ίδιο βάρος με το εκ διαμέτρου απέναντί τους.
3. Τα σωληνάρια να έχουν πάμα, για να προστατευόμαστε από τα σταγονίδια (aerosol) που δημιουργούνται από τη φυγοκέντρηση.
4. Να καθαρίζουμε τα σωληνάρια εξωτερικά, για να μη μολύνουμε τη φυγόκεντρο.
5. Αν σπάσει σωληνάριο, να αδειάζουμε τον υποδοχέα με μια λαβίδα και να τον πλένουμε με αντισηπτικό ή να τον στέλνουμε για αποστείρωση στο αυτόκαυστο.

Όσον αφορά τους εργαζόμενους σε μικροβιολογικά εργαστήρια, οι βασικοί κανόνες προστασίας είναι:

- Να πλένουμε τα χέρια μας με αντισηπτικό διάλυμα, πριν φορέ-



Εικόνα 10.3: Συλλογή μολυσματικών απορριμάτων σε ειδικά κιβώτια



Εικόνα 10.4: Ψυγείο απορριμάτων

σουμε τα γάντια, και όταν τα βγάζουμε, γιατί μέσα σε αυτά πολλαπλασιάζονται τα βακτήρια της φυσιολογικής χλωρίδας του δέρματος. Στο τέλος της εργασίας να πλένουμε τα χέρια μας για 3min.

- Να φοράμε γάντια και να ελέγχουμε αν έχουν τρύπες.
- Να χρησιμοποιούμε όσο είναι δυνατόν υλικά μιας χρήσεως.
- Να φοράμε εργαστηριακή μπλούζα κουμπωμένη, για να προστατεύουμε τα ρούχα μας, αλλά να μην κυκλοφορούμε μ' αυτή στους άλλους χώρους και κυρίως στην τραπεζαρία. Απαγορεύεται να παίρνουμε την μπλούζα στο σπίτι μας για πλύσιμο.
- Να μην τρώμε και να μην καπνίζουμε στο εργαστήριο, αλλά μόνο σε ειδικούς χώρους.
- Να καθαρίζουμε και να απολυμαίνουμε τους πάγκους εργασίας καθημερινά και ενδιάμεσα, αν λερωθούν με μολυσματικά υλικά.
- Να φοράμε μάσκα, όταν είμαστε κρυωμένοι ή όταν ασχολούμαστε με Μύκητες.

#### **Διαχείριση μολυσματικών απορριμμάτων**

Ο όρος διαχείριση περιλαμβάνει όλες τις ενέργειες που κάνουμε με σκοπό να αποφύγουμε τον κίνδυνο διασποράς των βακτηρίων ή τον τραυματισμό των εργαζομένων και να προστατεύσουμε την υγεία του πληθυσμού γενικά και το περιβάλλον. Οι ενέργειες αυτές είναι:

- Η συλλογή: Ξεχωρίζουμε τα μολυσματικά από τα υπόλοιπα απορρίμματα βάζοντάς τα μέσα σε κίτρινες πλαστικές σακούλες που μπαίνουν στη συνέχεια σε χαρτονένια ή πλαστικά κιβώτια και μεταφέρονται στο χώρο αποθήκευσης.
- Η προσωρινή αποθήκευση: Γίνεται σε ειδικό ψυγείο.
- Η μεταφορά: Μέσα στο νοσοκομείο γίνεται με καρότσια, για να αποφύγουμε τον κίνδυνο τραυματισμού ή μολύνσεων των μεταφορέων και έξω από το νοσοκομείο με ειδικά οχήματα.
- Η διάθεση: Γίνεται με διάφορους τρόπους, όπως είναι η υγειονομική ταφή, η καύση σε αποτεφρωτικούς ή πυρολυτικούς κλιβάνους και η αποστείρωση. Η αποστείρωση γίνεται με θέρμανση στους 121<sup>0</sup> C, για 35-40min, οπότε καταστρέφονται όλοι οι μικροοργανισμοί, παθογόνοι και μη, και οι σπόροι τους. Μετά την αποστείρωση μπορούμε να τα πετάξουμε μαζί με τα κοινά

(οικιακού τύπου) απορρίμματα. Τα τελευταία χρόνια ο Ενιαίος σύνδεσμος Δήμων και Κοινοτήτων της Αττικής (Ε.Σ.Κ.Δ.Ν.Α.) έχει αναλάβει τη διάθεση των μολυσματικών απορριμμάτων των νοσοκομείων της Αττικής.

## 10.2. Ομάδες επικινδυνότητας

Τα βιολογικά υλικά (αίμα, ούρα, πύελα κ.ά.), ανάλογα με το πόσο επικίνδυνα είναι για την υγεία των εργαζομένων, χωρίζονται σε 4 ομάδες η καθεμιά από τις οποίες περιλαμβάνει:

- Ομάδα 1:** Όλα τα δείγματα που δε γνωρίζουμε αν εγκυμονούν κάποιο κίνδυνο και το μόνο μέσο προφύλαξης που επιβάλλεται είναι το πλύσιμο των χεριών.
- Ομάδα 2:** Δείγματα που περιέχουν σποραδικά μικροοργανισμούς που είναι δυνατόν να μεταδοθούν από το μη υγιές δέρμα και τους βλεννογόνους μετά από ατυχήματα (π.χ. τρύπημα με βελόνα, κατάποση) ή δείγματα που προέρχονται από ομάδες υψηλού κινδύνου για Ηπατίτιδα Β, AIDS, Σαλμονέλλες κ.ά., όπως είναι ασθενείς που υποβάλλονται σε αιμοκάθαρση, χρήστες τοξικών ουσιών, πολυμεταγγιζόμενοι κ.ά.
- Ομάδα 3:** Δείγματα με βακτήρια που μεταδίδονται με σταγονίδια π.χ. *Mycobacterium tuberculosis* ή δείγματα που περιέχουν ιούς ηπατίτιδας, AIDS, Ρικέτσιες κ.ά.
- Ομάδα 4:** Δείγματα από ασθένειες επικίνδυνες για τη ζωή των εργαζομένων ή ασθένειες για τις οποίες δεν υπάρχει εμβόλιο ή θεραπεία, όπως η λύσσα, η ευλογιά, η χολέρα, ο αιμορραγικός πυρετός κ.ά.

## 10.3. Τύποι μικροβιολογικών εργαστηρίων

Τα μικροβιολογικά εργαστήρια διακρίνονται, ανάλογα με την ομάδα επικινδυνότητας των βιολογικών υλικών που επεξεργάζονται, σε:



# 3

## ΜΕΡΟΣ ΤΡΙΤΟ

ΜΕΘΟΔΟΙ  
ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ

## 1.1. Δοκιμασία καταλάσης

### I. Γενικά

Η καταλάση είναι ένζυμο το οποίο διασπά το υπεροξειδίο του υδρογόνου σε νερό και οξυγόνο ( $2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$ ). Η δοκιμασία παραγωγής καταλάσης χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό των Σταφυλόκοκκων (θετικοί) από τους Στρεπτόκοκκους (αρνητικοί).

### II. Μέθοδος

Το αντιδραστήριο είναι το οξυζενέ, δηλαδή διάλυμα υπεροξειδίου του υδρογόνου 3%, πρόσφατα παρασκευασμένο. Η δοκιμασία γίνεται πάνω σε αντικειμενοφόρο πλάκα.

- Αφού βάλουμε μια σταγόνα οξυζενέ στην αντικειμενοφόρο πλάκα, μεταφέρουμε με τον κρίκο μια αποικία από το στέλεχος που εξετάζουμε και αναμειγνύουμε. Σε θετικό αποτέλεσμα προκαλείται άμεση έκλυση φυσαλίδων αερίου οξυγόνου.
- Μπορούμε επίσης να προσθέσουμε κατευθείαν στο καλλιέργημα του βακτηρίου, σε υγρό ή στερεό θρεπτικό υλικό, 1ml περίπου οξυζενέ. Σε θετικό αποτέλεσμα θα έχουμε παραγωγή φυσαλίδων αερίου οξυγόνου.
- Εάν το θρεπτικό υλικό που αναπτύχθηκε το βακτήριο είναι αιματούχο άγαρ, υπάρχει πιθανότητα ψευδούς θετικού αποτελέσματος, επειδή τα ερυθρά αιμοσφαίρια στο αιματούχο άγαρ περιέχουν καταλάση.

Παράδειγμα θετικής δοκιμασίας είναι οι Σταφυλόκοκκοι, ενώ αρνητικής οι Εντερόκοκκοι.

## 1.2. Δοκιμασία παραγωγής κοαγκουλάσης (πηκτάσης)

### I. Γενικά

Η κοαγκουλάση είναι ένζυμο το οποίο προκαλεί πήξη του πλάσματος του ανθρώπου και διαφόρων ζώων. Η κοαγκουλάση διακρίνεται σε εξωκυτάρια ή ελεύθερη και συνδεδεμένη. Η ελεύθερη κοαγκουλάση βγαίνει από το μικροβιακό σώμα στο υλικό της καλλιέργειας. Η συνδεδεμένη κοαγκουλάση είναι προσκολλημένη στο κυτταρικό τοίχωμα του βακτηρίου.

Το βασικότερο κριτήριο, για να χαρακτηριστεί ένα στέλεχος Σταφυλόκοκκου ως *Staphylococcus aureus*, είναι η παραγωγή κοαγκουλάσης.

#### **A. Ανίχνευση εξωκυττάριας ή ελεύθερης κοαγκουλάσης**

Χρησιμοποιείται πρόσφατο πλάσμα από τα δείγματα αίματος του εργαστηρίου ή από φιάλες αιμοδοσίας. Καλό είναι να χρησιμοποιείται μείγμα πλάσματος από διάφορα δείγματα τα οποία έχουν ληφθεί με το αντιπηκτικό EDTA.

##### **Μέθοδος**

- Αραιώνουμε το πλάσμα με αποστειρωμένο φυσιολογικό ορό σε αναλογία 1:5.
- Σε αποστειρωμένο σωληνάριο μεταφέρουμε 0,5 ml του αραιωμένου πλάσματος.
- Από 24ωρη καλλιέργεια βακτηρίου σε ζωμό ή σε αιματούχο άγαρ μεταφέρουμε μερικές σταγόνες υγρού καλλιεργήματος ή μια αποικία στο σωληνάριο που περιέχει το αραιωμένο πλάσμα.
- Το σωληνάριο ανακινείται, ώστε να γίνει ανάμειξη του πλάσματος με το εξεταζόμενο στέλεχος και τοποθετείται σε υδατόλουτρο 37°C.
- Ελέγχουμε ανά ώρα και επί 3-6 ώρες για την εμφάνιση πύγματος.
- Σε θετική αντίδραση θα παρατηρήσουμε στο περιεχόμενο του σωληναρίου τη δημιουργία πύγματος.
- Εάν δε δημιουργηθεί πύγμα, συνεχίζεται η επώαση για 18 ώρες και ελέγχουμε ξανά.

#### **B. Ανίχνευση συνδεδεμένης κοαγκουλάσης**

##### **Μέθοδος**

- Επάνω σε αντικειμενοφόρο πλάκα παρασκευάζουμε πυκνό εναιώρημα του βακτηρίου σε μια σταγόνα φυσιολογικού ορού ή απεσταγμένου νερού.

- Προσθέτουμε στο εναιώρημα μια σταγόνα πλάσματος και αναμειγνύουμε με τον κρίκο για 10sec.
- Εάν στο εναιώρημα εμφανιστούν κροκίδες μέσα στα 10sec, το αποτέλεσμα είναι θετικό. Εάν οι κροκίδες εμφανιστούν σε μεγαλύτερο χρονικό διάστημα, το αποτέλεσμα είναι αρνητικό.

Η μέθοδος για την ανίχνευση της συνδεδεμένης κοαγκουλάσης είναι εύκολη και γρήγορη. Προτιμούμε να ελέγχουμε πρώτα για την παραγωγή συνδεδεμένης κοαγκουλάσης και εάν έχουμε αρνητικό αποτέλεσμα, τότε να εφαρμόζουμε τη μέθοδο για την ανίχνευση ελεύθερης κοαγκουλάσης.

Πριν γίνει η δοκιμασία παραγωγής κοαγκουλάσης πρέπει να ελέγχουμε εάν το στέλεχος του βακτηρίου είναι Gram θετικός κόκκος που παράγει καταλάση. Επειδή ορισμένα βακτήρια (π.χ. β-αιμολυτικός Στρεπτόκοκκος της Α ομάδας, *Escherichia coli* κ.ά.) προκαλούν πήξη του πλάσματος, χωρίς να παράγουν κοαγκουλάση, η δοκιμασία γίνεται, μόνο εάν το στέλεχος είναι Gram θετικός κόκκος και παράγει καταλάση.

### 1.3. Δοκιμασία παραγωγής δεοξυριβονουκλεάσης

#### 1. Γενικά

Ορισμένα βακτήρια παράγουν το ένζυμο δεοξυριβονουκλεάση (Dnase) που διασπά το DNA.

Η ανίχνευση της παραγωγής Dnase γίνεται σε στερεό υλικό το οποίο περιέχει DNA. Εάν το στέλεχος του βακτηρίου παράγει Dnase, γύρω από την ανάπτυξή του στο υλικό θα παρατηρηθεί διαυγής ζώνη, εάν προστεθεί 1N HCl. Εάν η αντίδραση είναι αρνητική, το υλικό θα θολώσει.

Χαρακτηριστικό του *Staphylococcus aureus* είναι η παραγωγή μιας θερμοανθεκτικής δεοξυριβονουκλεάσης η οποία δεν καταστρέφεται στους 100°C για 15 λεπτά. Αυτή η ιδιότητα του *Staphylococcus aureus* έχει την ίδια σημασία με την παραγωγή κοαγκουλάσης για την ταυτοποίησή του.

Το θρεπτικό υλικό το οποίο περιέχει DNA υπάρχει έτοιμο στο εμπόριο. Αποστειρώνεται σε θερμοκρασία 121°C, για 15min, και δια-



μοιράζεται σε τρυβλία.

## II. Μέθοδος

- Το βακτήριο το οποίο εξετάζεται εμβολιάζεται στην επιφάνεια του υλικού σε ευθεία γραμμή, η οποία αρχίζει από την περιφέρεια του τρυβλίου και κατευθύνεται προς το κέντρο. Σε κάθε τρυβλίο μπορούν να εμβολιαστούν τέσσερα διαφορετικά στελέχη.
- Το τρυβλίο επωάζεται σε θερμοκρασία 37°C, για 24 ώρες, αερόβια.
- Η επιφάνεια του υλικού καλύπτεται με 1N HCl και γίνεται έλεγχος αν εμφανίζεται διαυγής ζώνη γύρω από το σημείο ανάπτυξης του βακτηρίου, οπότε η δοκιμασία θεωρείται θετική.

## 1.4. Δοκιμασία ευαισθησίας στη βακιτρασίνη

### I. Γενικά

Η δοκιμασία της βακιτρασίνης είναι χρήσιμη, για να διαπιστωθεί γρήγορα και με μεγάλη ακρίβεια εάν ένα στέλεχος β-αιμολυτικού Στρεπτόκοκκου ανήκει στην ομάδα A, καθώς μόνο τα στελέχη της ομάδας A είναι ευαίσθητα σε πολύ μικρή ποσότητα του αντιβιοτικού αυτού.

Κατά την εκτέλεση της δοκιμασίας πρέπει να χρησιμοποιούμε δισκία βακιτρασίνης των 0,04 μονάδων και όχι των 10.

Πριν γίνει η δοκιμασία, πρέπει να είναι βέβαιο ότι πρόκειται για β-αιμολυτικό Στρεπτόκοκκο, διότι πολλά στελέχη του α-αιμολυτικού Στρεπτόκοκκου είναι ευαίσθητα σε αυτήν την πυκνότητα της βακιτρασίνης.

## II. Μέθοδος

- Με ευθύ κρίκο λαμβάνονται από καθαρή καλλιέργεια του βακτηρίου σε αιματούχο άγαρ αποικίες που περιβάλλονται από διαυγή ζώνη αιμόλυσης και εμβολιάζονται στη μισή επιφάνεια ενός αιματούχου άγαρ.
- Με αποστειρωμένα λαβίδα τοποθετείται πάνω στο υλικό ένα

δισκίο 0,04 μονάδων βακιτρασίνης και πιέζεται ελαφρά, ώστε να έλθει σε επαφή με το άγαρ.

- Το τρυβλίο επωάζεται σε θερμοκρασία 37°C, για 24 ώρες, αερόβια.
- Ελέγχεται η ανάπτυξη του στελέχους. Αν υπάρχει αναστολή της ανάπτυξής του γύρω από το δισκίο της βακιτρασίνης, σημαίνει ότι το στέλεχος ανήκει στην ομάδα A. Το μέγεθος της ζώνης αναστολής δεν έχει σημασία για την αξιολόγηση του αποτελέσματος.

Άλλη μέθοδος είναι να παρασκευαστεί πρώτα μικροβιακό εναιώρημα εμβολιάζοντας σε 4 ml ζωμού τρυπτικάσης-σόγιας μερικές αποικίες του στελέχους. Επωάζονται σε θερμοκρασία 37°C, για 2-5 ώρες, αερόβια, και επιστρώνεται το καλλιέργημα σε αιματούχο άγαρ με αποστειρωμένο βαμβακοφόρο στείλεό. Τα επόμενα στάδια είναι όμοια με αυτά της προηγούμενης μεθόδου.

## 1.5. Δοκιμασία ευαισθησίας στην οπτοχίνη

### I. Γενικά

Η ανάπτυξη του *Streptococcus pneumoniae* αναστέλλεται από την οπτοχίνη. Η οπτοχίνη είναι συνθετικό απολυμαντικό και υπάρχει στο εμπόριο με τη μορφή δισκίων διηθητικού χαρτιού.

Η δοκιμασία της ευαισθησίας στην οπτοχίνη είναι χρήσιμη, για να διαπιστωθεί γρήγορα και με μεγάλη ακρίβεια εάν ένα στέλεχος το οποίο παράγει α-αιμόλυση είναι *Streptococcus pneumoniae* ή α-αιμολυτικός *Στρεπτόκοκκος*. Τα περισσότερα στελέχη των α-αιμολυτικών *Στρεπτόκοκκων* είναι ανθεκτικά σε αυτήν.

### II. Μέθοδος

- Από καθαρή καλλιέργεια του βακτηρίου σε αιματούχο άγαρ λαμβάνονται με ευθύ κρίκο αποικίες που περιβάλλονται από πράσινη ζώνη αιμόλυσης και εμβολιάζονται στη μισή επιφάνεια ενός αιματούχου άγαρ.
- Με αποστειρωμένη λαβίδα τοποθετείται πάνω στο υλικό ένα δισκίο οπτοχίνης και πιέζεται ελαφρά, ώστε να έλθει σε επαφή

με το άγαρ.

- Το τρυβλίο επωάζεται σε θερμοκρασία 37°C, για 24 ώρες, αερόβια.
- Την επόμενη ημέρα ελέγχεται η διάμετρος της ζώνης αναστολής της ανάπτυξης του βακτηρίου γύρω από το δισκίο της οπτοχίνης. Ζώνη αναστολής με διάμετρο:
  1. Μεγαλύτερη από 18mm σημαίνει ότι το στέλεχος είναι *Streptococcus pneumoniae*.
  2. Μικρότερη των 18mm και μεγαλύτερη των 15mm σημαίνει ότι πρέπει να εξετάζεται η ευαισθησία του στελέχους στην επίδραση της χολής.
  3. Μικρότερη από 15mm σημαίνει ότι το στέλεχος δεν είναι *Streptococcus pneumoniae*.

Άλλη μέθοδος είναι να παρασκευαστεί πρώτα μικροβιακό εναιώρημα εμβολιάζοντας σε 4 ml ζωμού τρυπτικάσης-σόγιας μερικές αποικίες του στελέχους. Επωάζονται σε θερμοκρασία 37°C, για 2-5 ώρες, αερόβια, και επιστρώνεται το καλλιέργημα σε αιματούχο άγαρ με αποστειρωμένο βαμβακοφόρο σπειλέο. Τα επόμενα στάδια είναι όμοια με αυτά της προηγούμενης μεθόδου.

## 1.6. Δοκιμασία χολής

### I. Γενικά

Ουσίες όπως η χολή και τα χολικά άλατα ενεργοποιούν τα αυτολυτικά ένζυμα με αποτέλεσμα τη λύση των κυτάρων του *Streptococcus pneumoniae*. Η ιδιότητά του αυτή τον διαχωρίζει από τους α-αιμολυτικούς Στρεπτόκοκκους, οι οποίοι δεν κυτταρολύονται από την προσθήκη χολής ή χολικών αλάτων.

### II. Μέθοδος

- Από καθαρή καλλιέργεια βακτηρίου σε αιματούχο άγαρ λαμβάνονται μερικές αποικίες με πράσινη ζώνη αιμόλυσης και εμβολιάζονται σε 1 ml θρεπτικού ζωμού.
- Το μικροβιακό εναιώρημα επωάζεται για λίγες ώρες, μέχρι να

θολώσει.

- 0,5ml μικροβιακού εναιωρήματος τοποθετείται σε ένα σωληνάριο που το ονομάζουμε εξεταστέο. Το υπόλοιπο 0,5ml του μικροβιακού εναιωρήματος τοποθετείται σε δεύτερο σωληνάριο που το χρησιμοποιούμε ως μάρτυρα.
- Στο εξεταστέο σωληνάριο προστίθεται 0,5ml δεοξυχολικού νατρίου 10% και στο σωληνάριο-μάρτυρα 0,5ml φυσιολογικού ορού.
- Ελέγχεται η διαύγεια του μικροβιακού εναιωρήματος. Εάν το στέλεχος είναι *Streptococcus pneumoniae*, το εξεταστέο σωληνάριο θα γίνει σχεδόν αμέσως διαυγές ή μετά από αερόβια επώαση 2-3 ωρών, σε θερμοκρασία 37°C. Το σωληνάριο-μάρτυρας θα παραμείνει θολερό.

Το διάλυμα δεοξυχολικού νατρίου 10% παρασκευάζεται, εάν προστεθεί 1gr δεοξυχολικού νατρίου σε 10ml αποστειρωμένου απεσταγμένου νερού.

## 1.7. Υδρόλυση της εσουλίνης σε υλικό με χολή

### I. Γενικά

Βασική χαρακτηριστική ιδιότητα των Εντεροκόκκων είναι ότι υδrolύουν την εσουλίνη σε υλικό με χολή.

Το υλικό το οποίο χρησιμοποιείται για τη δοκιμασία υπάρχει έτοιμο στο εμπόριο. Μετά την αποστείρωση το θρεπτικό υλικό τοποθετείται σε σωληνάρια, σε λοξή θέση, και αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου, μέχρι να πήξει.

### II. Μέθοδος

- Με ευθύ κρίκο εμβολιάζεται το στέλεχος σε ένα σωληνάριο με το υλικό και επωάζεται σε θερμοκρασία 37°C, για 24 ώρες, αερόβια.
- Σε θετικό αποτέλεσμα εμφανίζεται μαύρο χρώμα στην περιοχή που αναπτύχθηκε το βακτήριο.

## 1.8. Δοκιμασία οξειδάσης

### I. Γενικά

Η οξειδάση είναι ένζυμο το οποίο παράγουν κυρίως οι Ναιϊσ-σέριες και οι Ψευδομονάδες. Το αντιδραστήριο είναι διάλυμα παραφαιλυλενοδιαμίνης 1%. Πρέπει να είναι άχρωμο ή ελαφρά ιώδες και φυλάσσεται σε σκοτεινόχρωμο φιαλίδιο. Είναι άχρηστο, εάν πάρει βαθύ ιώδες χρώμα.

### II. Μέθοδος

Πάνω στις ύποπτες αποικίες προστίθεται μια σταγόνα από το αντιδραστήριο και περιμένουμε για 10 sec. Εάν το βακτήριο παράγει οξειδάση, η αποικία παίρνει ένα βαθύ ιώδες χρώμα.

Αντί του αντιδραστήριου χρησιμοποιούνται δισκία εμποτισμένα με το αντιδραστήριο. Το δισκίο τοποθετείται στην ανακαλλιέργεια του βακτηρίου που εξετάζεται. Σε περίπτωση θετικού αποτελέσματος, σε 10-20 sec, οι αποικίες γύρω από το δισκίο παίρνουν βαθύ ιώδες χρώμα.

## 1.9. Δοκιμασία αναγωγής των νιτρικών αλάτων σε νιτρώδη

### I. Γενικά

Η αναγωγή των νιτρικών αλάτων σε νιτρώδη είναι χαρακτηριστική ιδιότητα των Εντεροβακτηριακών. Η δοκιμασία αναγωγής γίνεται σε θρεπτικό ζωμό που περιέχει  $\text{KNO}_3$  0,1 % (1000ml θρεπτικός ζωμός +1gr  $\text{KNO}_3$ ). Το υλικό μοιράζεται σε σωληνάρια και αποστειρώνεται στους 115°C για 20min. Η ανίχνευση των νιτρωδών αλάτων γίνεται με τα αντιδραστήρια Α και Β.

- Το αντιδραστήριο Α είναι διάλυμα διμεθυλ-α ναφθυλαμίνης 0,6% σε οξικό οξύ 5N (1000ml οξικό οξύ+6gr διμεθυλ-α ναφθυλαμίνη).
- Το αντιδραστήριο Β είναι διάλυμα σουλφανιλικού οξέος 0,8% σε οξικό οξύ 5N (1000ml οξικό οξύ+8gr σουλφανιλικό οξύ).

Τα νιτρώδη άλατα αντιδρούν μετά την προσθήκη ίσων όγκων από τα αντιδραστήρια Α και Β και εμφανίζεται κόκκινο χρώμα.

## II. Μέθοδος

- Το στέλεχος του βακτηρίου που εξετάζεται εμβολιάζεται με κρίκο στο θρεπτικό ζωμό που περιέχει το νιτρικό κάλιο ( $\text{KNO}_3$ ).
- Επώάζεται σε θερμοκρασία  $37^\circ\text{C}$ , για 24 ώρες, αερόβια.
- Την επόμενη ημέρα προστίθενται ίσες ποσότητες από τα δύο αντιδραστήρια.
- Αν το στέλεχος ανάγει τα νιτρικά άλατα σε νιτρώδη, εμφανίζεται κόκκινο χρώμα σε 1-2min και η αντίδραση θεωρείται θετική. Αν δεν εμφανιστεί κόκκινο χρώμα, η αντίδραση θεωρείται αρνητική.

Παράδειγμα θετικής δοκιμασίας είναι η *Escherichia coli*.

## 1.10. Δοκιμασία παραγωγής ινδόλης

### I. Γενικά

Ο έλεγχος της παραγωγής ινδόλης από την οξείδωση της τρυπτοφάνης αποτελεί βασική δοκιμασία για την ταυτοποίηση κυρίως των Εντεροβακτηριακών. Ορισμένα βακτήρια οξειδώνουν την τρυπτοφάνη με την παρουσία οξυγόνου σε ένα μόριο ινδόλης. Χρησιμοποιείται το αντιδραστήριο του Kovacs και ως θρεπτικό υλικό πεπτονούχος ζωμός. Το υλικό μοιράζεται ανά 5ml σε σωληνάρια και αποστειρώνεται στους  $121^\circ\text{C}$  για 15min. Το αντιδραστήριο του Kovacs υπάρχει έτοιμο στο εμπόριο.

### II. Μέθοδος

- Το στέλεχος του βακτηρίου που εξετάζεται εμβολιάζεται στον πεπτονούχο ζωμό.
- Επώάζεται σε θερμοκρασία  $37^\circ\text{C}$ , για 24 ώρες, αερόβια.
- Την επόμενη ημέρα προστίθενται 4-5 σταγόνες από το αντιδραστήριο Kovacs.
- Αν εμφανιστεί κόκκινο χρώμα, σημαίνει ότι το στέλεχος διασπά την τρυπτοφάνη και παράγει ινδόλη (ινδόλη + αντιδραστήριο Kovacs = κόκκινο χρώμα) και η αντίδραση θεωρείται θετική. Αν δεν εμφανιστεί κόκκινο χρώμα, η αντίδραση θεω-

ρείται αρνητική.

Παράδειγμα θετικής δοκιμασίας είναι η *Escherichia coli*, ενώ αρνητικής η *Klebsiella pneumoniae*.

## 1.11. Δοκιμασία ερυθρού του μεθυλίου (Methyl Red)

### I. Γενικά

Η δοκιμασία ερυθρού του μεθυλίου είναι βασική δοκιμασία για την ταυτοποίηση των Εντεροβακτηριακών, κυρίως αυτών που διασπούν τη λακτόζη. Με τη δοκιμασία ελέγχουμε τη ζύμωση της γλυκόζης σε υλικό που περιέχει γλυκόζη και πεπτόνη και τη μετατροπή του pH του υλικού σε όξινο, από τα όξινα προϊόντα της διάσπασης της γλυκόζης. Για τη δοκιμασία χρησιμοποιούνται:

- Το ειδικό θρεπτικό υλικό Clark και Lubs, που μοιράζεται ανά 5ml σε σωληνάρια και αποστειρώνεται στους 115°C για 15min.
- Ο δείκτης ερυθρού του μεθυλίου: Διαλύεται 0,1gr ερυθρού του μεθυλίου σε 300ml αιθυλικής αλκοόλης και συμπληρώνεται μέχρι 500ml με απεσταγμένο νερό.

Το διάλυμα του δείκτη διατηρείται στο ψυγείο.

### II. Μέθοδος

- Το στέλεχος του βακτηρίου που εξετάζεται εμβολιάζεται στο ειδικό θρεπτικό υλικό Clark και Lubs.
- Επώαζεται σε θερμοκρασία 37°C, για 24 ώρες, αερόβια.
- Την επόμενη ημέρα προστίθενται 4-5 σταγόνες του αντιδραστήριου ερυθρού του μεθυλίου.
- Αν εμφανιστεί ζωηρό κόκκινο χρώμα σε όλο το υλικό, η αντίδραση θεωρείται θετική. Αν το χρώμα του υλικού είναι κίτρινο, η αντίδραση θεωρείται αρνητική.

Παράδειγμα θετικής δοκιμασίας είναι η *Escherichia coli*, ενώ αρνητικής η *Klebsiella pneumoniae*.



## 1.12. Δοκιμασία παραγωγής ακετυλομεθυλοκαρβινόλης (Voges-Proskauer)

### I. Γενικά

Η δοκιμασία Voges-Proskauer είναι βασική δοκιμασία για την ταυτοποίηση των Εντεροβακτηριακών, κυρίως αυτών που διασπούν τη λακτόζη. Τα βακτήρια αυτά σχηματίζουν ακετυλομεθυλοκαρβινόλη από τη διάσπαση της γλυκόζης. Για τη δοκιμασία χρησιμοποιούνται:

- Το ειδικό θρεπτικό υλικό Clark και Lubs, που μοιράζεται ανά 5ml σε σωληνάρια και αποστειρώνεται στους 115° C για 15min.
- Το αντιδραστήριο A, που είναι διάλυμα α-ναφθόλης 5% (5gr α-ναφθόλη + 100ml αιθυλική αλκοόλη).
- Το αντιδραστήριο B, που είναι διάλυμα ΚΟΗ 40 % (40gr ΚΟΗ + 100ml απεσταγμένο νερό).

Τα αντιδραστήρια διατηρούνται σε ψυγείο.

### II. Μέθοδος

- Το στέλεχος του βακτηρίου που εξετάζεται εμβολιάζεται στο ειδικό θρεπτικό υλικό Clark και Lubs.
- Επωάζεται σε θερμοκρασία 37°C, για 24 ώρες, αερόβια.
- Την επόμενη ημέρα προστίθενται ίσες ποσότητες από τα διαλύματα, ΚΟΗ 40% και α-ναφθόλη 5% του αντιδραστήριου Voges-Proskauer.
- Αν εμφανιστεί κόκκινο χρώμα στην επιφάνεια του υλικού, σημαίνει ότι το στέλεχος παράγει ακετυλο-μεθυλο-καρβινόλη από τη διάσπαση της γλυκόζης και η αντίδραση θεωρείται θετική. Αν δεν εμφανιστεί κόκκινο χρώμα, η αντίδραση είναι αρνητική και το σωληνάριο επωάζεται μέχρι πέντε συνολικά ημέρες.

Παράδειγμα θετικής δοκιμασίας είναι η *Klebsiella pneumoniae*, ενώ αρνητικής η *Escherichia coli*.



## 1.13. Δοκιμασία των κιτρικών (Citrate)

### I. Γενικά

Η δοκιμασία των κιτρικών είναι χρήσιμη για την ταυτοποίηση κυρίως των Εντεροβακτηριακών. Ορισμένα βακτήρια μπορούν να πολλαπλασιάζονται σε συνθετικά θρεπτικά υλικά τα οποία περιέχουν ως μόνη πηγή άνθρακα το κιτρικό νάτριο. Η δοκιμασία του κιτρικού νατρίου γίνεται σε στερεά θρεπτικά υλικά, όπως το υλικό Simmons ή σε υγρά θρεπτικά υλικά, όπως το υλικό του Koser. Το στερεό θρεπτικό υλικό Simmons μοιράζεται ανά 5ml σε σωληνάρια και αποστειρώνεται στους 115°C για 20min. Μετά την αποστείρωση τα σωληνάρια τοποθετούνται σε λοξή θέση και σε θερμοκρασία δωματίου, μέχρι να πήξει το υλικό. Η λοξή επιφάνεια πρέπει να είναι μεγάλη. Το υγρό θρεπτικό υλικό Koser έχει την ίδια σύνθεση με το στερεό υλικό Simmons, δεν περιέχει όμως άγαρ και το δείκτη κυανό της βρωμοθυμόλης.

### II. Μέθοδος

- Το στέλεχος του βακτηρίου που εξετάζεται εμβολιάζεται στα συνθετικά υλικά Simmons ή Koser.
- Επώάζεται σε θερμοκρασία 37°C, για 24-48 ώρες, αερόβια.
- Μετά τις 48 ώρες, αν το στέλεχος του βακτηρίου αναπτυχθεί στο υλικό Simmons, παρατηρείται αλλαγή στο χρώμα του υλικού, το οποίο από πράσινο γίνεται βαθύ κυανό. Στο υλικό Koser η ανάπτυξη του βακτηρίου φαίνεται από τη θόλωση του υλικού. Αν δεν αναπτυχθεί το βακτήριο, δεν παρατηρείται αλλαγή του χρώματος του υλικού Simmons ούτε θόλωση στο υλικό Koser και η αντίδραση θεωρείται αρνητική. Σε αρνητική αντίδραση η επώαση των υλικών συνεχίζεται για τέσσερις συνολικά ημέρες.

Παράδειγμα θετικής δοκιμασίας είναι η *Klebsiella pneumoniae*, ενώ αρνητικής η *Escherichia coli*.

## 1.14. Δοκιμασία παραγωγής υδρόθειου ( $H_2S$ )

### I. Γενικά

Η δοκιμασία για τον έλεγχο της παραγωγής υδρόθειου γίνεται κυρίως για την ταυτοποίηση των Εντεροβακτηριακών και των Βρουκέλλων. Ορισμένα από τα είδη τους μπορούν να ανάγουν αμινοξέα τα οποία φέρουν θείο στο μόριό τους (π.χ. κυστεΐνη) και να παράγουν υδρόθειο. Υδρόθειο παράγεται επίσης από την αναγωγή ανόργανων ουσιών οι οποίες φέρουν θείο στο μόριό τους (π.χ.θειοθειικό ή υποθειώδες νάτριο).

Η παραγωγή του υδρόθειου διαπιστώνεται από ουσίες-δείκτες, όπως ο θειικός εναμμώνιος σίδηρος, ο οξικός μόλυβδος κ.ά. Το υδρόθειο που παράγεται αντιδρά με το σίδηρο ή το μόλυβδο και σχηματίζονται θειούχες ενώσεις οι οποίες έχουν μαύρο χρώμα. Ο έλεγχος παραγωγής υδρόθειου από τα Εντεροβακτηριακά γίνεται στο υλικό Kligler και από τις Βρουκέλλες στο υλικό Tryptose άγαρ. Το υλικό Kligler μοιράζεται ανά 7 ml σε σωληνάρια και αποστειρώνεται στους 121°C για 15min. Μετά την αποστείρωση τα σωληνάρια τοποθετούνται σε λοξή θέση, μέχρι να πήξει το υλικό. Φροντίζουμε η ευθεία στήλη στο υλικό να είναι αρκετά μεγάλη.

### II. Μέθοδος

#### A. Παραγωγή υδρόθειου από Εντεροβακτηριακά στο υλικό Kligler

- Το στέλεχος του βακτηρίου που εξετάζεται εμβολιάζεται με ευθύ κρίκο στην ευθεία στήλη του υλικού και στη συνέχεια στη λοξή επιφάνεια.
- Επωάζεται σε θερμοκρασία 37°C, για 24 ώρες, αερόβια.
- Μετά από 24 ώρες, αν εμφανιστεί μαύρο χρώμα στην ευθεία στήλη του υλικού, σημαίνει ότι το στέλεχος του βακτηρίου παράγει υδρόθειο και η αντίδραση θεωρείται θετική.
- Στο υλικό Kligler ελέγχουμε ταυτόχρονα τη ζύμωση της γλυκόζης με ή χωρίς παραγωγή αερίου και τη ζύμωση της λακτόζης:
  1. Αν το στέλεχος του βακτηρίου ζυμώνει τη γλυκόζη, το χρώμα του υλικού στην ευθεία στήλη μετατρέπεται σε κίτρινο από την αλλαγή του χρώματος του δείκτη ερυθρού της φαινόλης.

2. Αν η ζύμωση της γλυκόζης προκαλεί και παραγωγή αερίου, στην ευθεία στήλη του υλικού παρατηρούνται μια ή περισσότερες φυσαλίδες αέρα, ενώ σε μερικές περιπτώσεις από τη μεγάλη ποσότητα των αερίων μετακινείται το υλικό προς τα επάνω.
3. Αν το στέλεχος του βακτηρίου ζυμώνει τη λακτόζη, παρατηρείται αλλαγή στο χρώμα του δείκτη από κόκκινο σε κίτρινο και στη λοξή επιφάνεια του υλικού. Η ζύμωση της λακτόζης γίνεται στην ευθεία στήλη του υλικού, όπως και της γλυκόζης, αλλά τα όξινα προϊόντα που παράγονται είναι περισσότερα σε σχέση με εκείνα που παρατηρούνται κατά τη ζύμωση της γλυκόζης και διαχέονται σε όλο το υλικό, με αποτέλεσμα να αλλάζει το χρώμα του δείκτη και στη λοξή επιφάνεια του υλικού.

#### **Β. Παραγωγή υδρόθειου από Βρουκέλλες στο υλικό Tryptose άγαρ.**

Η παραγωγή υδρόθειου από την αναγωγή του αμινοξέος κυστεΐνη γίνεται στο υλικό Tryptose άγαρ και ο δείκτης του pH είναι ταινία διηθητικού χαρτιού, εμποτισμένη με διάλυμα οξικού μολύβδου 10 %.

- Το στέλεχος του βακτηρίου που εξετάζεται εμβολιάζεται σε σωληνάριο που έχει υλικό Tryptose άγαρ σε λοξή θέση. Μια ταινία διηθητικού χαρτιού, εμποτισμένη με διάλυμα οξικού μολύβδου 10%, συγκρατείται με το ένα της άκρο στο στόμιο του σωληναρίου και το άλλο άκρο αιωρείται μέσα στο σωληνάριο και σε μικρή απόσταση από τη λοξή επιφάνεια του υλικού.
- Το σωληνάριο επωάζεται αερόβια, σε θερμοκρασία 37°C και σε ατμόσφαιρα CO<sub>2</sub> 10% για 4 συνολικά ημέρες.
- Εξετάζεται καθημερινά για την παραγωγή υδρόθειου. Αν το στέλεχος παράγει υδρόθειο, η ταινία μαυρίζει από την αντίδραση του αερίου με τον οξικό μόλυβδο και το σχηματισμό θειούχου μολύβδου. Τότε η αντίδραση θεωρείται θετική. Η αλλαγή της ταινίας γίνεται καθημερινά. Η δοκιμασία θεωρείται αρνητική, αν δεν εμφανιστεί μαύρο χρώμα και μετά την τέταρτη ημέρα επώασης.

**Παράδειγμα θετικής δοκιμασίας είναι ο *Proteus Vulgaris*, ενώ αρνητικής η *Shigella sonnei*.**

## 1.15. Δοκιμασία καταβολισμού των αμινοξέων ορνιθίνης, λυσίνης και αργινίνης

### I. Γενικά

Ο καταβολισμός των αμινοξέων αποτελεί βασική δοκιμασία για την ταυτοποίηση των βακτηρίων και κυρίως των ειδών των Εντεροβακτηριακών. Η διάσπαση των αμινοξέων γίνεται με ειδικά ένζυμα. Από τη διάσπαση της ορνιθίνης παράγεται  $\text{CO}_2$  και πουτρεσκίνη. Από τη διάσπαση της λυσίνης παράγεται  $\text{CO}_2$  και καδαβερίνη, ενώ από τη διάσπαση της αργινίνης παράγεται ορνιθίνη,  $\text{CO}_2$  και αμμωνία.

Το υλικό Möller, με το οποίο μελετάμε τη διάσπαση των αμινοξέων, έχει όξινο pH. Το ειδικό αυτό υλικό μοιράζεται σε τέσσερα ίσα μέρη (από 250ml κάθε μέρος). Στο ένα μέρος του υλικού προστίθεται υδροχλωρική L-ορνιθίνη σε τελική συγκέντρωση 1% (2,5gr στα 250ml του υλικού), στο δεύτερο μέρος προστίθεται υδροχλωρική L-λυσίνη σε τελική συγκέντρωση 1% και στο τρίτο μέρος υδροχλωρική L-αργινίνη σε τελική συγκέντρωση 1%. Το τέταρτο μέρος του υλικού δεν περιέχει αμινοξύ και χρησιμεύει ως μάρτυρας. Το pH του υλικού είναι όξινο (pH =6.0). Πρέπει να ρυθμίζεται το pH που περιέχει ορνιθίνη. Η ρύθμιση γίνεται με διάλυμα 10N NaOH (1ml διαλύματος 10N NaOH στα 250ml υλικού Möller που περιέχει ορνιθίνη 1%). Το κάθε μέρος του υλικού μοιράζεται ανά 5ml σε βιδωτά σωληνάρια και αποστειρώνεται στους 121°C για 10min. Το υλικό φυλάσσεται στους 4°-10°C.

### II. Μέθοδος

- Το στέλεχος του βακτηρίου που εξετάζεται εμβολιάζεται στο σωληνάριο με το κατάλληλο αμινοξύ και στο σωληνάριο που χρησιμεύει ως μάρτυρας (δεν έχει αμινοξύ). Τα σωληνάρια καλύπτονται με 2-3ml υγρής αποστειρωμένης παραφίνης.
- Τα σωληνάρια επωάζονται σε θερμοκρασία 37°C, για 24 ώρες έως τέσσερις ημέρες, αερόβια, και εξετάζονται καθημερινά.
- Αν το στέλεχος του βακτηρίου διασπά το αμινοξύ, στο αντίστοιχο σωληνάριο το υλικό έχει ιώδες χρώμα και η αντίδρα-

ση θεωρείται θετική. Στο σωληνάριο που χρησιμεύει ως μάρτυρας το υλικό έχει κίτρινο χρώμα από τη διάσπαση της γλυκόζης. Αν το στέλεχος δε διασπά το αμινοξύ, το χρώμα του υλικού είναι κίτρινο από τη διάσπαση της γλυκόζης και η αντίδραση θεωρείται αρνητική.

## 1.16. Δοκιμασία παραγωγής ουρεάσης

### I. Γενικά

Η δοκιμασία παραγωγής ουρεάσης χρησιμοποιείται κυρίως για την ταυτοποίηση των Εντεροβακτηριακών, αλλά είναι χρήσιμη και για την ταυτοποίηση των στελεχών των Βρουκελλών και της Μπορντετέλλας. Ορισμένα από τα είδη τους παράγουν ένα ένζυμο, την ουρεάση, η οποία υδρολύει την ουρία και ελευθερώνει αμμωνία. Η αμμωνία μετατρέπει το pH του υλικού σε αλκαλικό και αλλάζει το χρώμα του δείκτη και του υλικού σε κόκκινο. Η δοκιμασία της ουρεάσης γίνεται σε στερεό και υγρό θρεπτικό υλικό.

Το στερεό θρεπτικό υλικό αποστειρώνεται σε θερμοκρασία 115°C για 15min. Μετά την αποστείρωση η φιάλη με το υλικό μπαίνει σε υδατόλουτρο στους 45°-50°C. Όταν η θερμοκρασία της φιάλης είναι 45°-50°C, προστίθενται 50ml υδατικού διαλύματος ουρίας 40%, το οποίο προηγουμένως έχει αποστειρωθεί με διήθηση. Η φιάλη ανακινείται, για να αναμειχθεί η ουρία με το υλικό και μοιράζεται ανά 3ml σε αποστειρωμένα σωληνάκια, που τοποθετούνται σε λοξή θέση, μέχρι να πήξει το υλικό.

Τα συστατικά του υγρού θρεπτικού υλικού διαλύονται σε 900ml απεσταγμένου νερού και αποστειρώνονται σε θερμοκρασία 121°C για 15min. Στη συνέχεια προστίθενται 100ml υδατικού διαλύματος ουρίας 20%, το οποίο έχει αποστειρωθεί με διήθηση. Το υλικό μοιράζεται ανά 3ml σε αποστειρωμένα σωληνάκια.

## II. Μέθοδος

### A. Παραγωγή ουρεάσης σε στερεό θρεπτικό υλικό.

- Το στέλεχος του βακτηρίου που εξετάζεται εμβολιάζεται στη λοξή επιφάνεια του στερεού θρεπτικού υλικού. Η ευθεία στήλη δεν εμβολιάζεται και χρησιμεύει ως μάρτυρας της αλλαγής του χρώματος του υλικού.
- Το σωληνάριο επωάζεται στους 37<sup>o</sup> C, για 24 ώρες, αερόβια.
- Την επόμενη ημέρα αν εμφανιστεί κόκκινο χρώμα στη λοξή επιφάνεια του υλικού, σημαίνει ότι το στέλεχος παράγει ουρεάση και η αντίδραση θεωρείται θετική.

Παράδειγμα θετικής δοκιμασίας είναι ο *Proteus Vulgaris*, ενώ αρνητικής η *Escherichia coli*.

### B. Παραγωγή ουρεάσης σε υγρό θρεπτικό υλικό.

- Το στέλεχος του βακτηρίου που εξετάζεται εμβολιάζεται στο υγρό υλικό και το σωληνάριο ανακινείται, για να ομογενοποιηθεί το εναιώρημα των κυττάρων.
- Το σωληνάριο επωάζεται σε θερμοκρασία 37<sup>o</sup> C, για 24 ώρες, αερόβια.
- Την επόμενη ημέρα αν εμφανιστεί κόκκινο χρώμα σε όλο το ύψος του υλικού, σημαίνει ότι το στέλεχος παράγει ουρεάση και η αντίδραση θεωρείται θετική.
- Αν η αντίδραση είναι αρνητική, η επώαση παρατείνεται για 48 ώρες. Το υγρό θρεπτικό υλικό χρησιμοποιείται μόνο για τους Πρωτεΐς.

## 1.17. Δοκιμασία απαμίνωσης της φαινυλαανίνης (PPA)

### I. Γενικά

Η παραγωγή φαινυλο-πυροσταφυλικού οξέος από την οξειδωτική απαμίνωση της φαινυλαανίνης είναι χαρακτηριστική ιδιότητα των Πρωτέων. Η ανίχνευση του οξέος γίνεται με υδατικό διάλυμα FeCl<sub>3</sub> 10% (χλωριούχου σιδήρου). Ο FeCl<sub>3</sub> αντιδρά με το φαινυλο-πυροσταφυλικό οξύ και σχηματίζει ένωση που έχει χρώμα πράσινο.

Το κατάλληλο θρεπτικό υλικό μοιράζεται ανά 5ml σε σωληνάκια

και αποστειρώνεται σε θερμοκρασία 121<sup>o</sup> C για 15min. Μετά την αποστείρωση τα σωληνάρια τοποθετούνται σε λοξή θέση, μέχρι να πήξει το υλικό. Προσέχουμε η λοξή επιφάνεια να είναι μεγάλη.

Το αντιδραστήριο είναι διάλυμα FeCl<sub>3</sub> 10%. (10grFeCl<sub>3</sub> +100ml απεσταγμένο νερό) και διατηρείται στο ψυγείο σε σκοτεινή φιάλη.

## II. Μέθοδος

- Το στέλεχος του βακτηρίου που εξετάζεται εμβολιάζεται σε όλη τη λοξή επιφάνεια του θρεπτικού υλικού.
- Επώάζεται σε θερμοκρασία 37<sup>o</sup> C, για 24 ώρες, αερόβια.
- Την επόμενη ημέρα προστίθενται σταγόνες από το διάλυμα του FeCl<sub>3</sub>. Αν εμφανιστεί πράσινο χρώμα στη λοξή επιφάνεια του υλικού, σημαίνει ότι το στέλεχος προκαλεί απαμίνωση της φαινυλαλανίνης και παράγεται φαινυλο-πυροσταφυλικό οξύ, οπότε η αντίδραση θεωρείται θετική.

**Παράδειγμα θετικής δοκιμασίας είναι οι Πρωτεΐς, ενώ αρνητικής η *Escherichia coli*.**

## 1.18. Δοκιμασία ρευστοποίησης της πηκτής

### I. Γενικά

Ο έλεγχος της ικανότητας ενός βακτηρίου να ρευστοποιεί την πηκτή είναι μια δοκιμασία που χρησιμοποιείται για την ταυτοποίηση Gram θετικών και Gram αρνητικών βακτηρίων. Ορισμένα είδη βακτηρίων παράγουν ένζυμα (ζελατινάσες) που διασπούν την πηκτή, με αποτέλεσμα να ρευστοποιείται το διάλυμα, το οποίο παραμένει σε υγρή κατάσταση και δεν πήζει ούτε στη θερμοκρασία του ψυγείου (4<sup>o</sup>C).

Το θρεπτικό υλικό που χρησιμοποιείται είναι πηκτή και θρεπτικός ζωμός (12gr πηκτή+1000ml ζωμός). Το υλικό μοιράζεται ανά 5ml σε σωληνάρια και αποστειρώνεται σε θερμοκρασία 121<sup>o</sup>C για 12min. Στη θερμοκρασία δωματίου είναι σε στερεή κατάσταση.



**II. Μέθοδος**

- Το στέλεχος του βακτηρίου που εξετάζεται εμβολιάζεται με ευθύ κρίκο στο σωληνάριο που περιέχει πηκτική και θρεπτικό ζωμό.
- Επωάζεται σε θερμοκρασία 37<sup>0</sup> C, για 14 ημέρες, αερόβια.
- Κάθε 2-3 ημέρες το σωληνάριο τοποθετείται στο ψυγείο (4<sup>0</sup>C) για δύο ώρες και εξετάζεται, για να διαπιστώσουμε τη ρευστοποίηση της πηκτικής. Αν το στέλεχος παράγει ένζυμα που διασπούν την πηκτική, το υλικό δε θα πήξει, όταν μπει στο ψυγείο (αντίδραση θετική). Αν το στέλεχος δε ρευστοποιεί την πηκτική, το υλικό, όταν μπει στο ψυγείο, θα πήξει (αντίδραση αρνητική). Πάντα πρέπει να χρησιμοποιείται ως μάρτυρας σωληνάριο που έχει πηκτική χωρίς στέλεχος βακτηρίου. Στο σωληνάριο αυτό το υλικό πρέπει να είναι σε υγρή κατάσταση σε θερμοκρασία 37<sup>0</sup>C και να πήξει στο ψυγείο στους 4<sup>0</sup>C.

**1.19. Δοκιμασία ελέγχου κινητικότητας****I. Γενικά**

Ο έλεγχος της κινητικότητας χρησιμεύει για την ταυτοποίηση ενός βακτηρίου και γίνεται σε σωληνάριο που περιέχει ημίρρευστο θρεπτικό υλικό. Συνήθως τα βακτήρια εμφανίζουν κινητικότητα σε θερμοκρασία μικρότερη των 37<sup>0</sup>C. Επομένως ο έλεγχος της κινητικότητας πρέπει πάντα να γίνεται σε δύο σωληνάρια από τα οποία το ένα επωάζεται στους 37<sup>0</sup>C και το άλλο σε θερμοκρασία δωματίου. Το κατάλληλο θρεπτικό υλικό μοιράζεται σε σωληνάρια και αποστειρώνεται στους 121<sup>0</sup>C για 15min.

**II. Μέθοδος**

- Το στέλεχος του βακτηρίου εμβολιάζεται σε θρεπτικό ζωμό και επωάζεται σε θερμοκρασία 37<sup>0</sup>C, για 24 ώρες, αερόβια.
- Από την καλλιέργεια του στελέχους στο θρεπτικό ζωμό λαμβάνεται μια σταγόνα με ευθύ κρίκο και εμβολιάζεται κατά μήκος της στήλης του ημίρρευστου υλικού. Εμβολιάζονται δύο σωληνάρια.



- Το ένα σωληνάριο επωάζεται σε θερμοκρασία 37°C, για 24 ώρες, και το άλλο σε θερμοκρασία δωματίου για 5 ημέρες.
- Αν το στέλεχος είναι κινητό, τα κύτταρά του κινούνται και πέρα από την ευθεία γραμμή του εμβολιασμού και η θόλωση καταλαμβάνει όλη τη στήλη του υλικού. Αν το στέλεχος είναι ακίνητο, αναπτύσσεται μόνο στην ευθεία γραμμή του εμβολιασμού και η θόλωση παρατηρείται μόνο σε αυτήν την περιοχή του υλικού.

## 1.20. Δοκιμασία διάσπασης των σακχάρων

### I. Γενικά

Η μελέτη διάσπασης των σακχάρων είναι σημαντική δοκιμασία για την ταυτοποίηση των βακτηρίων. Στο εργαστήριο η διάσπαση των ουσιών αυτών και η παραγωγή οξέος διαπιστώνεται, αν προσθέσουμε στο στερεό ή υγρό υλικό ένα δείκτη του pH. Η παραγωγή οξέος μετατρέπει το αλκαλικό pH σε όξινο, με αποτέλεσμα να αλλάζει το χρώμα του δείκτη και του υλικού.

Η μελέτη της παραγωγής αερίου από τη διάσπαση των σακχάρων γίνεται σε υγρά ή στερεά θρεπτικά υλικά. Η παραγωγή αερίου στα υγρά διαπιστώνεται, αν στο σωληνάριο του υλικού βάλουμε μικρό ανεστραμμένο σωληνάριο. Το αέριο που θα παραχθεί παγιδεύεται στο ανεστραμμένο σωληνάριο. Η παραγωγή αερίου σε στερεά υλικά που είναι σε λοξή θέση διαπιστώνεται από τις φυσαλίδες ή τα ρήγματα μέσα στο άγαρ.

Τα Gram αρνητικά βακτήρια διακρίνονται σε εκείνα που ζυμώνουν τη γλυκόζη, όπως τα Εντεροβακτηριακά, και σε εκείνα που προκαλούν οξείδωση της γλυκόζης, όπως οι Ψευδομονάδες. Η ζύμωση της γλυκόζης γίνεται κάτω από αναερόβιες συνθήκες και τα τελικά προϊόντα είναι πολύ όξινα. Η οξείδωση γίνεται κάτω από αερόβιες συνθήκες και τα τελικά προϊόντα είναι CO<sub>2</sub> και νερό, ενώ τα ενδιάμεσα προϊόντα μεταβολισμού ελαττώνουν την οξύτητα στο υλικό της καλλιέργειας.

Η οξειδωτική και ζυμωτική διάσπαση των σακχάρων ελέγχεται με

τη δοκιμή παραγωγής οξέος και αερίου σε σακχαρούχα και πεπτούχα υλικά που περιέχουν δείκτη του pH, όπως το υλικό Oxidation Fermentation medium (O/F). Το ειδικό αυτό υλικό αποστειρώνεται στους 121<sup>o</sup> C, για 15min. Το σάκχαρο που θα μελετηθεί αποστειρώνεται με διήθηση και προστίθεται στο υλικό σε τελική συγκέντρωση 1%. Στη συνέχεια το υλικό μοιράζεται σε μικρά σωληνάκια.

## II. Μέθοδος

- Το στέλεχος του βακτηρίου που εξετάζεται εμβολιάζεται σε δύο σωληνάκια. Η επιφάνεια του ενός σωληναρίου καλύπτεται με 25mm στρώματος αποστειρωμένης, υγρής παραφίνης για τη δημιουργία αναερόβιων συνθηκών.
- Τα σωληνάκια επωάζονται σε θερμοκρασία 37<sup>o</sup> C, για 1-2 ημέρες, αερόβια.
- Η αλλαγή στο χρώμα του υλικού μόνο στο σωληνάριο που είναι χωρίς παραφίνη σημαίνει ότι το στέλεχος προκαλεί οξείδωση του σακχάρου. Η αλλαγή στο χρώμα του υλικού και στα δύο σωληνάκια σημαίνει ότι το στέλεχος προκαλεί ζύμωση του σακχάρου. Αν δεν παρατηρείται αλλαγή στο χρώμα του υλικού των δύο σωληναρίων, το στέλεχος δεν οξειδώνει και δε ζυμώνει το σάκχαρο.

**Παράδειγμα θετικής δοκιμασίας οξείδωσης: *Pseudomonas aeruginosa*.**

**Παράδειγμα θετικής δοκιμασίας ζύμωσης: *Escherichia coli*.**

## 1.21. Ταυτοποίηση βακτηρίων με API 20 E

### I. Γενικά

Το API 20 E είναι ένα σύστημα έτοιμων, προπαρασκευασμένων αντιδραστηρίων-υλικών σε πλαστικά πλακίδια με ειδικές θέσεις (20 μικροσωληνάκια και το καθένα από αυτά αποτελείται από ένα σωληνάριο και ένα φρεάτιο) για κάθε υλικό με το οποίο ελέγχονται 22 βιοχημικές ιδιότητες. Με το API 20 E ταυτοποιούνται σχεδόν πλήρως 27 Gram αρνητικά Εντεροβακτηριακά και άλλα 23 Gram αρνητικά βακτήρια, που απομονώνονται από τις καλλιέργειες των κλινι-

κών δειγμάτων. Τα αντιδραστήρια που πρέπει να έχει το εργαστήριο και τα οποία μπορούμε να προμηθευτούμε μαζί με τις ταινίες είναι:

- Διάλυμα  $\text{FeCl}_3$  10%.
- Αντιδραστήριο ινδόλης Κοναcs.
- Αντιδραστήριο οξειδάσης.
- Αντιδραστήρια αναγωγής νιτρικών αλάτων.
- Αντιδραστήρια Voges-Proskauer.
- Όλα τα υλικά του API, αποστειρωμένο απεσταγμένο νερό και παραφινέλαιο.

## II. Μέθοδος

Η δοκιμή θα γίνει από καθαρή καλλιέργεια του βακτηρίου.

- Κάνουμε εναιώρημα μιας αποικίας σε 3ml αποστειρωμένο απεσταγμένο νερό.
- Ανοίγουμε ένα API set και βάζουμε στον πάγκο το δισκάκι του, στο οποίο σημειώνουμε το νούμερο της καλλιέργειας. Ρίχνουμε 3ml απεσταγμένο νερό, για να διατηρείται υγρή η ατμόσφαιρα κατά τη διάρκεια της επώασης.
- Βάζουμε στο δισκάκι την πλάκα API 20 E με τα αντιδραστήρια.
- Με σύριγγα ή πιπέττα Pasteur αναροφούμε το μικροβιακό εναιώρημα και γεμίζουμε μόνο τα σωληνάκια. Στις θέσεις κιτρικών, Voges-Proskauer και Gel γεμίζουμε και το σωληνάριο και το φρεάτιο με εναιώρημα βακτηρίου, ενώ στις θέσεις ADH, LDC, ODC, H<sub>2</sub>S και URE γεμίζουμε τα σωληνάκια με



Εικόνα 1.1: API 20 E

μικροβιακό εναιώρημα και τα φρεάτια με υγρή αποστειρωμένη παραφίνη για δημιουργία αναερόβιων συνθηκών.

- Σκεπάζουμε το δισκάκι με το κάλυμμά του και επωάζουμε για 24 ώρες, σε θερμοκρασία 37°C, αερόβια.
- Την επόμενη ημέρα διαβάζουμε και σημειώνουμε στο ειδικό έντυπο πρώτα τις άμεσες αντιδράσεις και μετά αυτές που χρειάζεται να προσθέσουμε αντιδραστήρια.
- Οι άμεσες αντιδράσεις διαβάζονται από το χρώμα που θα εμφανίσουν (πίνακας 1.1).

	Θετική	Αρνητική
<b>ONPG</b>	Κίτρινο	Άχρωμο
<b>ADH</b>	Κόκκινο ή πορτοκαλί	Κίτρινο
<b>LDC</b>	Κόκκινο ή πορτοκαλί	Κίτρινο
<b>ODC</b>	Κόκκινο ή πορτοκαλί	Κίτρινο
<b>LCITI</b>	Μπλε	Πράσινο
<b>H<sub>2</sub>S</b>	Μαύρο ίζημα	Όχι μαύρο ίζημα
<b>URE</b>	Κόκκινο	Κίτρινο
<b>GEL</b>	Διάχυση πήγματος	Όχι πήγμα
<b>Σάκχαρα</b>	Κίτρινο	Μπλε - πράσινο

Πίνακας 1.1: Χρώματα των άμεσων αντιδράσεων του API 20 E

Οι αντιδράσεις στις οποίες χρειάζεται να προσθέσουμε αντιδραστήριο είναι οι εξής:

1. Στη θέση της ινδόλης προσθέτουμε μια σταγόνα από το αντιδραστήριο Kovacs και διαβάζουμε μέσα σε 2min. Αν η αντίδραση είναι θετική, εμφανίζεται κόκκινος δακτύλιος.
2. Στη θέση της τρυπτοφάνης προσθέτουμε μια σταγόνα διαλύματος FeCl<sub>3</sub> 10%. Αν η αντίδραση είναι θετική, εμφανίζεται καστανό χρώμα, ενώ, αν είναι αρνητική, κίτρινο.
3. Στη θέση Voges-Proskauer προσθέτουμε μια σταγόνα από τα δύο διαλύματα και περιμένουμε 10min περίπου. Αν η αντίδραση είναι θετική, έχουμε κόκκινο χρώμα, ενώ, αν είναι αρνητική, το υλικό παραμένει άχρωμο.
4. Για τη δοκιμή οξειδάσης προσθέτουμε μια σταγόνα του αντι-

δραστηρίου της οξειδάσης στη θέση ONPG ή του  $H_2S$ , εφόσον οι αντιδράσεις αυτές είναι αρνητικές. Αν η αντίδραση είναι θετική, θα εμφανιστεί βαθύ ιώδες χρώμα. Περιμένουμε 20min, πριν θεωρήσουμε την αντίδραση αρνητική.

5. Στη θέση της γλυκόζης, μετά την ανάγνωση της αντίδρασής της, προσθέτουμε δύο σταγόνες από κάθε αντιδραστήριο για την αναγωγή των νιτρικών αλάτων σε νιτρώδη. Αν η αντίδραση είναι θετική, εμφανίζεται κόκκινο χρώμα μετά από 2-3min.
6. Οι θετικές και αρνητικές δοκιμές βαθμολογούνται ανά τριάδα, σύμφωνα με τις έντυπες οδηγίες, με αριθμό από 0-9. Έτσι παράγονται επταψήφιοι αριθμοί. Με τον ειδικό κατάλογο αριθμητικής ταξινόμησης βρίσκεται το είδος του βακτηρίου.



Εικόνα 1.2: API 20 E *Escherichia coli*

### 1.22. Δοκιμή εξάρτησης από τους X και V παράγοντες (*Haemophilus influenzae*)

Σε τρυβλίο με άγαρ χωρίς τους παράγοντες X και V, όπως το TSA άγαρ, εμβολιάζουμε το βακτήριο που εξετάζουμε. Το βακτήριο έχει καλλιεργηθεί σε ζυμό Lewinthal και όχι πάνω σε σοκολατόχρωμο άγαρ, για να αποφύγουμε τη μεταφορά του X παράγοντα.

Πάνω στο τρυβλίο βάζουμε δισκία (ή ταινίες διηθητικού χαρτιού) εμποτισμένα ένα με τον παράγοντα X, ένα άλλο με τον παράγοντα V και ένα τρίτο με τους δύο παράγοντες μαζί.

Το τρυβλίο επωάζεται αερόβια, για 24-48 ώρες, σε θερμοκρασία 37°C. Το βακτήριο, εφόσον είναι *Haemophilus influenzae*, θα αναπτυχθεί μόνο γύρω από το XV δισκίο, γιατί έχει ανάγκη και τους δύο παράγοντες.

### 1.23. Δοκιμασία εξοιδήσεως του ελύτρου

#### I. Γενικά

Ο *Streptococcus Pneumoniae*, η *Neisseriae meningitidis* και ο *Haemophilus influenzae* διακρίνονται σε ορολογικούς τύπους με βάση την αντιγονική σύσταση του ελύτρου. Η ορολογική τυποποίηση γίνεται με τη δοκιμασία εξοιδήσεως του ελύτρου με τους ειδικούς αντιορούς.

Όταν αναμειχθεί εναιώρημα κυττάρων ενός ελυτροφόρου στελέχους με τον ειδικό αντιορό (τον ορό που περιέχει αντισώματα εναντίον του ελύτρου του συγκεκριμένου στελέχους), τα αντισώματα ενώνονται με το έλυτρο και σχηματίζουν ίζημα στην περιφέρεια των κυττάρων.

Κατά τη μικροσκοπική εξέταση φαίνεται ότι τα κύτταρα περιβάλλονται από μια στεφάνη η οποία διαχωρίζεται πλήρως από το σώμα του βακτηρίου. Αυτό οφείλεται στη διαφορετική διαθλαστικότητα που έχει το ίζημα σε σχέση με το εναιώρημα των κυττάρων. Στην πραγματικότητα δεν πρόκειται για εξοίδηση του ελύτρου, αλλά για ίζημα που σχηματίζεται στην περιφέρεια του κυττάρου από την ένωση του ελύτρου με τα ειδικά αντισώματα.

## II. Μέθοδος

- Παρασκευάζουμε εναιώρημα μιας αποικίας του στελέχους του βακτηρίου σε μια σταγόνα φυσιολογικού ορού πάνω σε αντικειμενοφόρο πλάκα και την αφήνουμε να στεγνώσει.
- Με κρίκο που έχει οπή βάζουμε μια σταγόνα υδατικού διαλύματος με κυανό του μεθυλενίου 1% σε μια καλυπρίδα.
- Στη συνέχεια τοποθετούμε μια σταγόνα ειδικού αντιορού στην αντικειμενοφόρο πλάκα που έχει το εναιώρημα του βακτηρίου.
- Τον αντιορό που μένει στον κρίκο τον αναμειγνύουμε με τη σταγόνα του κυανού του μεθυλενίου πάνω στην καλυπρίδα και μετά με τον αντιορό που είναι στην πλάκα.
- Καλύπτουμε το παρασκεύασμα με την καλυπρίδα που έχει το κυανό του μεθυλενίου, βάζουμε κεδρέλαιο και μικροσκοπούμε.
- Αν η αντίδραση είναι θετική, δηλαδή τα αντισώματα είναι ειδικά για τα αντιγόνα του ελύτρου, τα κύτταρα του βακτηρίου περιβάλλονται από μια στεφάνη η οποία διαχωρίζεται πλήρως από το σώμα του βακτηρίου.

## Α

**Απόστημα:** Εντοπισμένη συλλογή πύου μέσα σε κοιλότητα, η οποία σχηματίζεται από την αποσύνθεση ιστών.

**Αρθροσπóρια:** Μονογονικά σπόρια Μυκήτων που παράγονται με κατάτμηση των υφών του μυκητύλλιου.

**Αυξανόγραμμα:** Δοκιμασία με την οποία ελέγχεται η ικανότητα του Μύκητα να χρησιμοποιεί κάποιο σάκχαρο ως πηγή άνθρακα για την ανάπτυξή του. Ο Μύκητας καλλιεργείται σε συνθετικό θρεπτικό υλικό, στο οποίο δεν αναπτύσσεται, γιατί δεν υπάρχει πηγή άνθρακα. Στην επιφάνεια της καλλιέργειας τοποθετούνται δισκία εμποτισμένα το καθένα με κάποιο σάκχαρο. Το τρυβλίο επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου. Ο Μύκητας θα αναπτυχθεί γύρω από το δισκίο που περιέχει το σάκχαρο, το οποίο και χρησιμοποιεί, για να αναπτυχθεί.

## Β

**Βακτηριοφάγοι:** Ιοί που προσβάλλουν τα βακτήρια.

## Γ

**Γένος:** Βαθμίδα ταξινόμησης που περιλαμβάνει ένα ή περισσότερα είδη.

## Δ

**Διήθημα:** Διαυγές υγρό το οποίο λαμβάνεται μετά τη διήθηση.

## Ε

**Είδος:** Η πρώτη βαθμίδα ταξινόμησης των βακτηρίων.

**Εμπύημα:** Συλλογή πύου μέσα σε μια κοιλότητα του σώματος.

**Εναιώρημα:** Διάλυμα μιας στερεάς ουσίας σε υγρό, μέσα στο οποίο τα μόριά της αιωρούνται.

**Εξέλκωση:** Δημιουργία έλκους.

**Επιθηλιακά κύτταρα:** Μεγάλα πολυεδρικά κύτταρα, που προέρχονται από το συνδετικό ιστό.

**Ερυσμός:** Ιδιότητα ορισμένων βακτηρίων να απλώνονται σε όλη την επιφάνεια του θρεπτικού υλικού.



### Κ

**Καλλιέργημα:** Προϊόν από την καλλιέργεια του βακτηρίου.

### Μ

**Μικροβαιμία:** Η κυκλοφορία παθογόνων ή μη βακτηρίων μέσα στο αίμα.

### Ξ

**Ξενιστής:** Οργανισμός που φιλοξενεί ή διατρέφει έναν άλλο οργανισμό (παράσιτο).

### Π

**Πηκτή:** Προϊόν που λαμβάνεται από τη μερική υδρόλυση του κολλαγόνου του δέρματος, του συνδετικού ιστού και των οστών των ζώων. Έχει μικρή θρεπτική αξία για τα βακτήρια.

### Σ

**Σηψαιμία:** Η μικροβαιμία που συνοδεύεται από εμφάνιση τοξικών φαινομένων.

**Στέλεχος:** Καθαρό καλλιέργημα βακτηρίου που προέρχεται από μια αποικία. Έχει όλες τις βασικές ιδιότητες που χαρακτηρίζει το είδος, διαφέρει όμως σε δευτερεύουσες ιδιότητες.

### Υ

**Υφή:** Νηματοειδής σχηματισμός του Μύκητα που βλαστάνει από το σπόρο.

### Φ

**Φαγοκύτταρα:** Ζωντανά λευκοκύτταρα του οργανισμού (ουδετερόφιλα πολυμορφοπύρρηνα και μακροφάγα του αίματος και των ιστών) που σχετίζονται με την άμυνά του στα βακτήρια και ιούς.

**Φλεγμονώδες απόστημα:** Απόστημα που συνοδεύεται από οξεία φλεγμονή του υποδόριου ιστού.

## Χ

**Χλαμυδοσπόρια:** Σπόρια Μυκήτων με παχύ διπλό τοίχωμα που βλαστάνουν από τις υφές τους.

## Ψ

**Ψευδομυκητύλλιο:** Υφή που σχηματίζεται από εκβλάστηση πολλών βλαστοσπορίων μαζί.

**Μέρος Πρώτο**

Εικόνα 2.1	2.2. <i>Staphylococcus aureus</i>
Εικόνα 3.1	3.2. Γενικά είδη
Εικόνα 3.2	3.3. <i>Streptococcus pneumoniae</i>
Εικόνα 3.3	3.4. <i>Enterococcus</i>
Εικόνα 5.1	5.1. Γενικά Εντεροβακτηριακών
Εικόνα 5.2	5.2. <i>Escherichia coli</i>
Εικόνα 5.3	5.5. <i>Klebsiella pneumoniae</i>
Εικόνα 5.4	5.6. <i>Proteus</i>
Εικόνα 6.1	6.2. <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
Εικόνα 8.1	8.2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Εικόνα 10.1	10.2. <i>Haemophilus influenzae</i>

**Μέρος Δεύτερο**

Εικόνα 1.1	1.2. Μελέτη υγρών και εκκριμάτων
Εικόνα 2.1	2.3. Καλλιέργεια πτυέλων
Εικόνα 3.1	3.1. Καλλιέργεια κοιλιακού εκκρίματος
Εικόνα 3.2	3.1. Καλλιέργεια κοιλιακού εκκρίματος
Εικόνα 5.1	5.2. Καλλιέργεια ούρων
Εικόνα 5.2	5.2. Καλλιέργεια ούρων
Εικόνα 6.1	6.1. Καλλιέργεια αίματος
Εικόνα 6.2	6.1. Καλλιέργεια αίματος
Εικόνα 8.1	8.2. Μυκητολογική εξέταση δερματικών βλαβών
Εικόνα 8.2	8.2. Μυκητολογική εξέταση δερματικών βλαβών
Εικόνα 10.1	10.1. Μέτρα προστασίας στο μικροβιολογικό εργαστήριο
Εικόνα 10.2	10.1. Μέτρα προστασίας στο μικροβιολογικό εργαστήριο
Εικόνα 10.3	10.1. Μέτρα προστασίας στο μικροβιολογικό εργαστήριο
Εικόνα 10.4	10.1. Μέτρα προστασίας στο μικροβιολογικό εργαστήριο

**Μέρος Τρίτο**

Εικόνα 1.1	1.2.1. Ταυτοποίηση των βακτηρίων με API 20E
Εικόνα 1.2	1.2.1. Ταυτοποίηση των βακτηρίων με API 20E

ΠΙΝΑΚΕΣ

ΑΝΤΙΣΤΟΙΧΙΑ ΣΕ ΕΝΟΤΗΤΑ ΚΕΦΑΛΑΙΟΥ

**Μέρος Πρώτο**

Πίνακας 2.1	2.2. <i>Staphylococcus aureus</i>
Πίνακας 3.1	3.2. <i>Streptococcus pyogenes</i>
Πίνακας 3.2	3.3. <i>Streptococcus pneumoniae</i>
Πίνακας 3.3	3.4. <i>Enterococcus</i>
Πίνακας 4.1	4.2. <i>Neisseria meningitidis</i>
Πίνακας 4.2	4.3. <i>Neisseria gonorrhoeae</i>
Πίνακας 5.1	5.2. <i>Escherichia coli</i>
Πίνακας 5.2	5.3. <i>Shigella</i>
Πίνακας 5.3	5.4. <i>Salmonella</i>
Πίνακας 5.4	5.5. <i>Klebsiella pneumoniae</i>
Πίνακας 5.5	5.6. <i>Proteus</i>
Πίνακας 5.6	5.6. <i>Proteus</i>
Πίνακας 6.1	6.2. <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
Πίνακας 7.1	7.2. <i>Corynebacterium diphtheriae</i>
Πίνακας 8.1	8.2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Πίνακας 10.1	10.2. <i>Haemophilus influenzae</i>
Πίνακας 11.1	11.2. <i>Bordetella</i>
Πίνακας 12.1	12.2. <i>Brucella</i>
Πίνακας 13.1	13.2. <i>Clostridium tetani</i>
Πίνακας 14.1	14.2. <i>Vibrio cholerae</i>
Πίνακας 15.1	15.2. <i>Mycoplasma pneumoniae</i>
Πίνακας 15.2	15.3. <i>Ureaplasma urealyticum</i>

**Μέρος Τρίτο**

Πίνακας 1.1	1.21. Ταυτοποίηση των βακτηρίων με API 20E
-------------	--

ΣΧΗΜΑΤΑ

ΑΝΤΙΣΤΟΙΧΙΑ ΣΕ ΕΝΟΤΗΤΑ ΚΕΦΑΛΑΙΟΥ

**Μέρος Πρώτο**

Σχήμα 3.1	3.2. <i>Streptococcus pyogenes</i>
Σχήμα 3.2	3.3. <i>Streptococcus pneumoniae</i>
Σχήμα 4.1	4.2. <i>Neisseria meningitidis</i>
Σχήμα 6.1	6.2. <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
Σχήμα 7.1	7.2. <i>Corynebacterium diphtheriae</i>
Σχήμα 9.1	9.2. <i>Treponema pallidum</i>
Σχήμα 13.1	13.2. <i>Clostridium tetani</i>
Σχήμα 13.2	13.3. <i>Clostridium perfringens</i>

**Μέρος Δεύτερο**

Σχήμα 9.1	9.2. Παρασιτολογική εξέταση κοπράνων
Σχήμα 9.2	9.2. Παρασιτολογική εξέταση κοπράνων

**Μέρος Τρίτο**

Σχήμα 1.1.	1.21. Ταυτοποίηση των βακτηρίων με API 20E
------------	--

ΕΙΚΟΝΕΣ - ΣΧΗΜΑΤΑ

Οι φωτογραφίες έχουν ληφθεί ειδικά για το βιβλίο Μικροβιολογία II στο Μικροβιολογικό Εργαστήριο του Εθνικού Ιδρύματος Αποκατάστασης Αναπήρων (Διευθύντρια Δρ. Ε. Νικολο-πούλου - Ντέρου).

Η δημιουργία σχημάτων και εικόνων έγινε από τις Ευαγγελία και Αθανασία Ντέρου.

AIDS .....	17, 52, 63, 78
α-αιμολυτικοί Στρεπτόκοκκοι.....	28
Αεριογόνος γάγγραινα.....	100
Αιμολυσίνες Σταφυλόκοκκου.....	23
Αλλόχρωμα κοκκία.....	69, 71
Αντιγόνα εξωτερικής μεμβράνης της <i>N. gonorrhoeae</i> .....	42
Αντιγόνα ινιδίων της <i>N. gonorrhoeae</i> .....	42
Αντιγόνο ελύτρου K της <i>E. Coli</i> .....	48
Αντιτετανικό εμβόλιο.....	99
Αφροδίσιο λεμφοκοκκίωμα.....	118
β-αιμολυτικός Στρεπτόκοκκος της ομάδας A.....	30
Βλεννόρροια.....	42, 123
Βλεφαριδικό αντιγόνο H της <i>E. Coli</i> .....	47
Βρουκελλώσεις.....	92, 93
γ-αιμολυτικοί Στρεπτόκοκκοι.....	28
Γένη Εντεροβακτηριακών.....	45
Γονοκοκκική ουρηθρίτιδα.....	42, 118
Γονοκοκκική οφθαλμία.....	42
Δεοξυριβονουκλεάσες.....	23, 25, 31
Διάρροια ταξιδιωτών.....	48
Διφθέρα.....	70
Διφθερίτιδα.....	70, 71
Διφθεριτική τοξίνη.....	70
Δορυφορισμός.....	81
Είδη κρίκων για εξέταση ούρων.....	152
Ειδικά αντισώματα σύφιλης.....	78
Εμβόλιο BCG.....	65, 66
Εμβόλιο διφθερίτιδας.....	71
Εντερικές σαλμονελλώσεις.....	52
Εντεροτοξίνες Σταφυλόκοκκου.....	24
Εξωεντερικές σαλμονελλώσεις.....	53
Εξωτερική ωτίτιδα.....	146
Επιδερμολυτική τοξίνη.....	24
Ερυθρογόνος τοξίνη του <i>S. pyogenes</i> .....	31
Κοκκύτης.....	88, 89
Κυματοειδής πυρετός.....	92

Λεπρωματώδης λέπρα.....	65, 66
Μελιταίος πυρετός.....	92
Μη γονοκοκκική ουρηθρίτιδα.....	112, 113, 118
Μη ειδικά αντισώματα σύφιλης.....	78
Μπνιγγίτιδα.....	39,40
Μικροβιακή δυσεντερία.....	50
Μόνιμη φυσιολογική Χλωρίδα.....	16
Νεογνική επιπεφυκίτιδα.....	118, 149
Οξεία μέση ωτίτιδα.....	146
Ορολογική τυποποίηση κατά Lancefield.....	30
Παροδική φυσιολογική Χλωρίδα.....	16
Πνευμονία άτυπη από <i>M. pneumoniae</i> .....	110
Πολυμορφισμός.....	81,163
Προστατίτιδα.....	112
Πρωτοπαθές σύμπλεγμα.....	63
Πυοκυανίνη.....	73, 75
Σαλμονελλώσεις.....	52
Συγκολλητινοαντίδραση Widal.....	53
Συγκολλητινοαντίδραση Wright.....	92, 94
Σύφιλη.....	78
Συφιλιδική ροδόανθη.....	78
Σωματικό αντιγόνο Ο της <i>E. Coli</i> .....	47
Τέτανος.....	102
Τετανοσπασμίνη.....	102
Τράχωμα.....	118, 119
Τριπλό εμβόλιο.....	89, 99
Τροφική δηλητηρίαση.....	52, 173
Τυφοειδής πυρετός.....	52, 53
Υαλουρονιδάση του <i>S. aureus</i> .....	24
Υαλουρονιδάση του <i>S. pyogenes</i> .....	31,36
Φυματίνη.....	65
Φυματινοαντίδραση Mantoux.....	63,65
Φυματίωση.....	63,65
Φυματώδης λέπρα.....	65,66
Χλαμυδίασεις.....	118
Χολέρα.....	106,107

## ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

<b>ADH</b>	Αργινίνη-διυδρολάση
<b>CDC</b>	Διεθνές Κέντρο Ελέγχου των Λοιμώξεων
<b>CIT</b>	Κιτρικά
<b>Clu</b>	Γλυκόζη
<b>cm</b>	εκατοστό του μέτρου
<b>DNA</b>	Δεοξυριβονουκλεϊνικό οξύ
<b>ENY</b>	Εγκεφαλονωτιαίο υγρό
<b>GEL</b>	Πηκτή
<b>gr</b>	γραμμάριο (χιλιοστό του κιλού)
<b>H<sub>2</sub>S</b>	Υδροθείο
<b>LDC</b>	Λυσίνη d-καρβοξυλάση
<b>min</b>	λεπτό της ώρας
<b>ml</b>	χιλιοστό του λίτρου
<b>mm</b>	χιλιοστό του μέτρου
<b>N</b>	Κανονικότητα
<b>NAD</b>	Νικοτιναμιδο-αδενινο-δινουκλεοτίδιο
<b>ODC</b>	Ορνιθίνη d-καρβοξυλάση
<b>ONPG</b>	β-γαλακτοσιδάση
<b>PCR</b>	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης
<b>RNA</b>	Ριβονουκλεϊνικό οξύ
<b>sec</b>	δευτερόλεπτο
<b>TSA</b>	Trypticase Soye Agar
<b>URE</b>	Ουρία
<b>WHO</b>	Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας



## Βιβλιογραφία

- Αντωνιάδης Α., Αντωνιάδης Γρ., Λεγάκης Ν., Τσελέντης Ι.:** «Ιατρική Μικροβιολογία», 1ος τόμος, ιατρικές εκδόσεις Π. Χ. Πασχαλίδη, Αθήνα 1998.
- Αντωνιάδης Α., Αντωνιάδης Γρ., Λεγάκης Ν., Τσελέντης Ι.:** «Ιατρική Μικροβιολογία», 2ος τόμος, ιατρικές εκδόσεις Π. Χ. Πασχαλίδη, Αθήνα 1999.
- Αρσένη Α.:** «Κλινική Μικροβιολογία και Εργαστηριακή Διάγνωση Λοιμώξεων», τόμοι Ι και ΙΙ, ιατρικές εκδόσεις Ζήτα, Αθήνα 1994.
- Αρσένη Α.:** «Εξετάσεις των υγρών του σώματος. Γενικές εξετάσεις και καλλιέργειες», ιατρικές εκδόσεις Ζήτα, Αθήνα 2000.
- Αρσένη Α.:** «Ιατρική Μικροβιολογία Θεωρία Πράξη», Αθήνα 1982.
- Αρσένη Α.:** «Καλλιέργειες Μικροβίων στη Διαγνωστική των Λοιμώξεων», Αθήνα 1971.
- Αρσένη Α.:** «Γενικές εξετάσεις υγρών και εκκριμάτων» Αθήνα 1971
- CDC:** Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories (BMBL) 4th Edition, May 1999
- Δημητρακόπουλος Γ.:** «Εισαγωγή στην Κλινική Μικροβιολογία και τα Λοιμώδη Νοσήματα», ιατρικές εκδόσεις Π. Χ. Πασχαλίδη, Αθήνα 1987.
- Δημητρακόπουλος Γ.:** «Ιατρική Βακτηριολογία», ιατρικές εκδόσεις Π. Χ. Πασχαλίδη, Αθήνα 1987.
- Δημητρακόπουλος Γ.:** «Μικροβιολογία ΙΙ», Ίδρυμα Ευγενίδου, Αθήνα 1991.
- Δημητρακόπουλος Γ.:** «Βακτηριολογία», Ίδρυμα Ευγενίδου, Αθήνα 1994.
- E. Jawetz, J. Melnick, E. Adelberg:** «Ιατρική Μικροβιολογία», επιστημονικές εκδόσεις Γρ. Παρισιάνου, Αθήνα 1985.
- Λεγάκης Ν. Ι., Παπαβασιλείου Θ.Ι.:** «Στοιχεία γενικής Βακτηριολογίας», επιστημονικές εκδόσεις Γρ. Παρισιάνου, Αθήνα 1981.
- Μαρσέλου-Κιντή Ο.:** «Ιατρική Μυκητολογία», Αθήνα 1986.
- Μαρσέλου-Κιντή Ο.:** «Εγχειρίδιο Ιατρικής παρασιτολογίας», Αθήνα 1986.
- Μενεγάτου Δ., Κονταξή Π. :** «Εφαρμοσμένη Μικροβιολογία Τροφίμων», εκδόσεις Λιβάνη Αθήνα 1999.
- Μπεζιρτζόγλου Ε.:** «Φυσιολογική Μικροβιακή χλωρίδα του Ανθρώ-

που», Ιωάννινα 1994.

**Νικολοπούλου-Ντέρου Ε, Θάνου Ν., Τσιγάρα Ε.:** «Υγιεινή Μικροβιολογία», εκδόσεις Λιβάνη, Αθήνα 1999.

**Παπαβασιλείου Θ.Ι.:** «Ιατρική Μικροβιολογία», 2ος τόμος, Επιστημονικές εκδόσεις Γρ. Παρισιάνου, Αθήνα 1981.

**Παπααναγιώτου Γ.:** «Ιατρική Μικροβιολογία και Ανοσοβιολογία», εκδόσεις Παρατηρητής, Θεσσαλονίκη 1989.

**Ενέργεια 2.3.2.:** «Ανάπτυξη των Τ.Ε.Ε. και Σ.Ε.Κ.»

**ΠΑΙΔΑΓΩΓΙΚΟ ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ:**

**Σταμάτης Αλαχιώτης**

Καθηγητής Γενετικής Πανεπιστημίου Πατρών

Πρόεδρος του Παιδαγωγικού Ινστιτούτου

Έργο: «Βιβλία Τ.Ε.Ε.»

- Επιστημονικός υπεύθυνος του Έργου:

**Γεώργιος Βούτσινος**

Σύμβουλος του Παιδαγωγικού Ινστιτούτου

- Υπεύθυνος του Τομέα Υγείας και Πρόνοιας:

**Ματίνα Στάππα**, Οδοντίατρος

Πάρεδρος ε.θ. του Παιδαγωγικού Ινστιτούτου