# ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΟ ΛΥΚΕΙΟ

ΤΑΞΗ Γ΄

(Βοηθών ιατρικών και βιολογικών εργαστηρίων)

# ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΙΙ

ΣΗΜΕΙΩΣΕΙΣ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΩΝ ΕΞΕΤΑΣΕΩΝ

(ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ)

Παραδόσεις του καθηγητή

(μικρόκοκκοι)

κόκκος

Γ. Λ. ΘΕΟΔΩΡΑΚΟΠΟΥΛΟΥ Τεχνολόγου Ιατρικών Εργαστηρίων

ΑΘΗΝΑ 2013

# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Γενικές οδηγίες λήψης δείγματος για καλλιέργεια	3
Συμπληρωματικές επεξηγήσεις στη λήψη του δείγματος	4
ΚΕΦΑΛΑΙΌ Ι	5
Α. Καλλιέργεια ούρων:	
Συλλογή του δείγματος:	5
ΠΟΙΟΤΙΚΗ ΟΥΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ	6
ΠΟΣΟΤΙΚΗ ΟΥΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ	6
ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΙΙ	9
Β. Καλλιέργεια πτυέλων:	9
Καλλιέργεια πτυέλων (απλή)	11
Γ. Καλλιέργεια Φαρυγγικού:	12
Καλλιέργεια Φαρυγγικού (απλή)	
Καλλιέργεια φαρυγγικού (ή άλλου υλικού)	14
για Διφθερίτιδα	14
ΚΕΦΑΛΑΙΟ III	
Δ. Καλλιέργεια οφθαλμικού:	16
ΚΕΦΑΛΑΙΟ IV	
Ε. Καλλιέργεια αίματος:	16
ΚΕΦΑΛΑΙΟ V	21
ΣΤ. Καλλιέργεια Ε.Ν.Υ:	
Κυτταρολογική και Χημική εξέταση Ε.Ν.Υ	
ΚΕΦΑΛΑΙΟ VI	
Ζ. Καλλιέργεια κοπράνων:	
KEΦAΛΑΙΟ VII	
Η. Καλλιέργεια κολπικού:	
Θ. Καλλιέργεια προστατικού – ουρηθρικού εκκρίματος:	
KEΦAΛΑΙΟ VIII	
Ι. Καλλιέργεια πύου:	
Γενική καλλιέργεια πύου ή υγρών παρακεντήσεως:	
ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΙΧ	
Κ. Δοκιμή ευαισθησίας στα αντιβιοτικά:	
Α. Μέθοδος δίσκων:	
Β. Μέθοδος αραιώσεων σε σωληνάρια:	
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ	38

# Γενικές οδηγίες λήψης δείγματος για καλλιέργεια

- 1. Κάθε δείγμα πρέπει να έχει πάνω στο δοχείο μεταφοράς α) την αυτοκόλλητη ετικέτα με τον αριθμό μητρώου β) την χρωματιστή αυτοκόλλητη ετικέτα με την ένδειξη της κλινικής.
- 2. Κάθε δείγμα να συνοδεύεται από την προβλεπόμενη καρτέλα (παραπεμπτικό) που θα έχει και τις δύο προαναφερθείσες αυτοκόλλητες ετικέτες στις θέσεις που ορίζει το έντυπο και θα πρέπει να είναι συμπληρωμένα όλα τα ενδεικνυόμενα στοιχεία. Αν κατά τη γνώμη του κλινικού κάποιες πρόσθετες κλινικές πληροφορίες θα βοηθήσουν το μικροβιολόγο, παρακαλούμε να αναγράφονται. Επίσης παρακαλούμε να επικοινωνείτε προσωπικά για τα επείγοντα.
- 3. Η λήψη του δείγματος θα πρέπει να γίνεται πριν από τη χορήγηση αντιμικροβιακών φαρμάκων ή πριν από την τοπική χρήση αντισηπτικών, κολλυρίων ή αλοιφών. Όταν πρόκειται για χειρουργικά τραύματα πριν από την αλλαγή.
- 4. Ιδιαίτερη προσοχή πρέπει να δίνεται στην αποφυγή επιμόλυνσης του δείγματος κατά τη λήψη, με την φυσιολογική χλωρίδα της περιοχής. Αν αυτό είναι αναπόφευκτο η προετοιμασία του ασθενούς και οι οδηγίες πρέπει να είναι τέτοιες ώστε να γίνεται η ελάχιστη πρόσμιξη με τα σαπρόφυτα της περιοχής π.χ. όταν στέλνομε πτύελα για καλλιέργεια πρέπει ο άρρωστος να βήξει και να βγάλει βρογχική έκκριση όχι απλώς να φτύσει σίελο ή ρινολαρυγγικά εκκρίματα.
- 5. Η απομόνωση του παθογόνου αιτίου έχει σχέση με το στάδιο της λοίμωξης γι αυτό η λήψη του δείγματος πρέπει να γίνεται κατά τη φάση απελευθέρωσης άφθονων μικροοργανισμών.
- 6. Η ποσότητα του δείγματος θα πρέπει να είναι αρκετή και να συμφωνεί με τις επί μέρους οδηγίες.
- 7. Το δοχείο μεταφοράς θα πρέπει να είναι κατάλληλο (βλέπε οδηγίες) και να κλείνει καλά αποφεύγοντας διασπορά παθογόνων μικροοργανισμών στο νοσοκομείο και το προσωπικό.

# Συμπληρωματικές επεξηγήσεις στη λήψη του δείγματος.

Τοπική αντισηψία δέρματος επιτυγχάνεται ως εξής:

Τρίβουμε με ένα κομμάτι βαμβάκι βρεγμένο με οινόπνευμα 95% στο σημείο του δέρματος που θα γίνει η παρακέντηση, κυκλικά από το κέντρο προς την περιφέρεια. Αφήνουμε να στεγνώσει για 2 λεπτά. Μετά με ένα άλλο βαμβάκι με βάμμα ιωδίου 2% ή Betadine Solution αλείβομε την περιοχή του δέρματος που καθαρίσαμε προηγουμένως. Με τον ίδιο τρόπο καθαρίζουμε και τα δάκτυλά μας που θα ψηλαφίσουμε στη συνέχεια την περιοχή.

- Η προϊσταμένη κάθε τμήματος θα έχει φροντίσει να έχει προμηθευτεί από το μικροβιολογικό τα στείρα δοχεία ή σωληνάρια με υλικό μεταφοράς και να μάθει τη χρήση τους.
- Οι ζωμοί αιμοκαλλιεργειών καθώς και τα υλικά μεταφοράς των αναερόβιων μικροοργανισμών λόγω σημαντικού κόστους πρέπει κάθε φορά να γίνεται συνεννόηση και προμήθεια κατ ευθείαν από το εργαστήριο.
- Η ποσότητα αίματος που εμβολιάζεται στους ζωμούς αιμοκαλλιεργειών έχει σημασία να πληροί τη σχέση  $\frac{\alphaίμα}{ζωμός} = \frac{1}{10}$ , δηλ. 5 ml αίμα στα 50 ml ζωμό (ή 10 ml στα 100). Καθαρίστε το πώμα της φιάλης όπως και το δέρμα δηλ. με οινόπνευμα και Betadine και αλλάξτε βελόνα όταν πρόκειται να ενέσετε το αίμα στη φιάλη. Προσέχουμε να μην μπει αέρας μέσα στις φιάλες που περιέχουν  $CO_2$  ή κενό αέρα.

### <u>ΚΕΦΑΛΑΙΟ Ι</u>

### Α. Καλλιέργεια ούρων:

Τα ούρα σε ένα φυσιολογικό άτομο είναι στείρα μικροβίων, διότι παράγονται και συγκεντρώνονται σε κλειστό σύστημα ιστών και οργάνων.

Σ΄ όλο το τμήμα του ουροποιητικού συστήματος δεν υπάρχουν μικρόβια (φυσιολογικά), εκτός από το στόμιο της ουρήθρας όπου βρίσκονται ως φυσιολογική χλωρίδα. Τα μικρόβια αυτά αναμειγνύονται με τα ούρα κατά την ούρηση και πολλαπλασιάζονται αν τα ούρα παραμείνουν σε θερμοκρασία πάνω από 20° C (περιβάλλοντος).

Παθολογικά είναι δυνατόν, μικροοργανισμοί να εγκατασταθούν σε διάφορα σημεία του ουροποιητικού, από διάφορες αιτίες (ανατομικές, λειτουργικές, λίθοι κ.ά.) και να προκαλέσουν φλεγμονές.

Έτσι, αναζητώντας τους μικροοργανισμούς αυτούς με την καλλιέργεια ούρων (με ανάλογη κάθε φορά διαδικασία λήψης του δείγματος), μπορούμε να εντοπίσουμε την περιοχή της βλάβης, το είδος του παθογόνου μικροβίου και να προτείνουμε το κατάλληλο αντιβιοτικό (αντιβιόγραμμα).

# Συλλογή του δείγματος:

Διακρίνουμε τις εξής περιπτώσεις:

1. Με ούρηση: α) Σε ενήλικες: Ο εξεταζόμενος προμηθεύεται αποστειρωμένο ποτηράκι μιας χρήσης από το εργαστήριο ή το φαρμακείο και το πρωί της μέρας που θα γίνει η καλλιέργεια πλένεται καλά στην περιοχή των έξω γεννητικών οργάνων (ουρήθρας και περινέου) με νερό και σαπούνι (όχι αντισηπτικό).

Ξεπλένεται με άφθονο νερό, δεν σκουπίζεται με πετσέτα, ουρεί και απορρίπτει τα πρώτα ούρα στην λεκάνη και στο μέσο της ούρησης, αφού έχει ανοίξει με προσοχή το καπάκι του δοχείου για να μην ακουμπήσει πουθενά, ουρεί στο δοχείο 5 – 10 ml ούρα περίπου και κλείνει το καπάκι. Τα υπόλοιπα ούρα απορρίπτονται.

Σημείωση: Η διαδικασία λήψης του δείγματος αλλάζει όταν τα ούρα καλλιεργούνται για γενικότερο έλεγχο της ουρογεννητικής οδού (εξέταση STAMEY – MEARS βλ. προστατικό υγρό).



Εικόνα: 1 Ουροσυλλέκτης

β) Σε νεογνά και βρέφη: Για τα νεογνά και τα βρέφη υπάρχουν ειδικά νάιλον σακουλάκια για αγοράκια ή κοριτσάκια με αυτοκόλλητη ταινία για να κολλιόνται στην περινεϊκή ζώνη, φυσικά αποστειρωμένα.

Η διαδικασία γίνεται από μεγαλύτερο άτομο, δηλαδή πλένεται το μωρό όπως και οι ενήλικες με τη διαφορά ότι σκουπίζεται η περιοχή που θα κολληθεί το σακουλάκι με αποστειρωμένη γάζα.

Αφού κολληθεί το σακουλάκι, περιμένουμε να ουρήσει το μωρό, το ξεκολλάμε προσεκτικά και σφραγίζουμε με το αυτοκόλλητο το άνοιγμα του.

Τα ούρα πρέπει να έρθουν στο εργαστήριο εντός μισής ώρας, διαφορετικά διατηρούνται στο ψυγείο ( $4^{\circ}$  C) έως ότου έρθουν.

Το δείγμα πρέπει να συνοδεύουν κλινικές πληροφορίες για λήψη αντιβιοτικών, έντονη συχνουρία, ουροκαθετήρα, μεταμόσχευση νεφρού, λίθο, πυελονεφρίτιδα κ.ά.

- 2. Με ουροκαθετήρα: Γίνεται αντισηψία στο σημείο παρακέντησης του σωλήνα. Κάνουμε αποκλεισμό του σωλήνα του ουροκαθετήρα 5 εκατοστά από το στόμιο της ουρήθρας. Περιμένουμε να μαζευτούν λίγα ούρα και με σύριγγα παίρνουμε 1 2 ml ούρα και τα βάζουμε σε στείρο σωληνάριο. Ποτέ δεν πρέπει να καλλιεργούνται ούρα από τον ουροσυλλέκτη.
- 3. <u>Ουρητηροστομία:</u> Με αντισηψία του δεξιού ή αριστερού στομίου και αναγραφή αντίστοιχα στο δείγμα, παίρνουμε 1 2 ml ούρα και τα βάζουμε σε στείρο σωληνάριο.



Εικόνα: 2 Ουροκαθετήρας

- **4.** Με Υπερηβική παρακέντηση: Γίνεται σε επίμονη πυουρία με στείρες καλλιέργειες για κοινά παθογόνα και Β. Κoch. Το δείγμα λαμβάνεται σε ειδικό φιαλίδιο μεταφοράς αναερόβιων για την αναζήτηση τους.
- **5.** <u>Ούρα για B. Koch:</u> Αποστέλλονται τα πρώτα πρωινά ούρα επί τρεις συνεχείς ημέρες (ή ούρα 24ώρου) με την ένδειξη «Καλλιέργεια για B. Koch» και στη συνέχεια γίνεται κατεργασία κατά Petroff (αν χρειαστεί) και εμβολιασμός στο υλικό Lowenstein.

### ΠΟΙΟΤΙΚΗ ΟΥΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ

Η ποιοτική ουροκαλλιέργεια γίνεται για να αποκτήσουμε γενική εικόνα του αριθμού των μικροοργανισμών που μπορεί να υπάρχουν και της σχέσης των διαφόρων ειδών. Επίσης μπορούμε να έχουμε να έχουμε αποτελέσματα πιο σύντομα σε πιο επείγουσες καταστάσεις.

Χρησιμοποιούνται πρωινά ούρα τα οποία εμβολιάζονται σε αιματούχο και Mc Conkey N° 3 με μια από τις μεθόδους εμβολιασμού σε όλη την επιφάνεια (βλ. σημειώσεις Μικροβιολογίας Β΄ τάξης).

Παράλληλα με την ποιοτική ουροκαλλιέργεια γίνεται και το αντιβιόγραμμα.

Σε κάθε περίπτωση όμως, η ποιοτική ουροκαλλιέργεια δεν είναι αξιόπιστη μέθοδος ενώ συχνά είναι παραπλανητική λόγω της ανάπτυξης και μικροβίων που επιμολύνουν το δείγμα και τα οποία μόνο με την αρίθμηση των αποικιών στην ποσοτική ουροκαλλιέργεια ξεχωρίζουν.

# ΠΟΣΟΤΙΚΗ ΟΥΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ

Το δείγμα λαμβάνεται με την κατάλληλη διαδικασία, ενώ καλό είναι ο ασθενής να μην παίρνει αντιβιοτικά τουλάχιστον για 48 ώρες. Τα ούρα μεταφέρονται στο εργαστήριο και φυλάσσονται σε κοινό ψυγείο (4° C) όπου μπορούν να παραμείνουν αναλλοίωτα για μερικές ώρες, ακόμη και για 24ωρο.

Πριν από την καλλιέργεια λαμβάνεται ποσότητα ούρων άσηπτα (με αποστειρωμένη πιπέττα, σε αποστειρωμένο σωληνάριο, κοντά σε φλόγα), φυγοκεντρείται και το ίζημα επιστρώνεται, βάφεται κατά Gram και μικροσκοπείται. Εάν στο δείγμα υπάρχουν πολλά πλακώδη επιθήλια και

πολλοί κόκκοι και βακτήρια Gram θετικά, τα ούρα απορρίπτονται ως ακατάλληλα. Αλλιώς προχωράμε στην καλλιέργεια.

### Τεχνική:

### Απαιτούμενα υλικά:

- Ένα τρυβλίο με αιματούχο άγαρ (ή θρεπτικό άγαρ)
- Ένα τρυβλίο με Mc Conkey άγαρ N° 3 (για ανάπτυξη κυρίως Gram αρνητικών)
- Μία αμπούλα φυσιολογικού ορού (NaCl 0,9 %) των 5 ml
- Μία πιπέττα αποστειρωμένη του 1 ml
- Μία πιπέττα αποστειρωμένη των 0,1 ml
- Αποστειρωμένα σωληνάρια Wassermann ή αποστειρωμένα παστεράκια με κεκαμμένο το κλειστό ρύγχος (όχι πάντως βαμβακοφόρο στυλεό)
- Λύχνο Bunsen

# Πορεία:

- Ανοίγουμε την αμπούλα Φ.Ο κοντά στη φλόγα και με την πιπέττα του 1 ml παίρνουμε 1 ml Φ.Ο και το χύνουμε.
- Με την ίδια πιπέττα του 1 ml, παίρνουμε 1 ml από τα ούρα τα οποία έχουμε ανακινήσει και το ρίχνουμε στην αμπούλα με τα 4 ml Φ.Ο χωρίς να φυσήξουμε στην πιπέττα.
- Με την πιπέττα των 0,1 ml που γεμίζουμε με αραιωμένα (1:5) ούρα μέχρι το 0, βάζουμε 0,01 ml (μια σταγόνα) στο ένα τρυβλίο (αιματούχο ή θρεπτικό άγαρ) και 0,01 ml στο άλλο (Mc Conkey άγαρ).
- Επιστρώνεται η σταγόνα με ξεχωριστό σωληνάριο ή παστεράκι σε όλη την επιφάνεια.
- Επωάζονται και τα δύο τρυβλία στους 37° C για 24 ώρες και κατόπιν διαβάζουμε το αποτέλεσμα.



Εικόνα: 3 Θετική ουροκαλλιέργεια

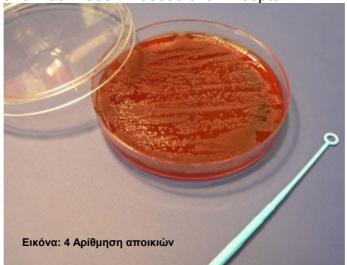
### Αξιολόγηση:

Εάν στα αραιωμένα (1:5) ούρα δεν υπάρχουν μικρόβια το καλλιέργημα είναι στείρο, αλλιώς μετράται ο αριθμός των αποικιών.

Ο υπολογισμός του αριθμού των μικροβίων ανά ml ούρων γίνεται πολλαπλασιάζοντας τον αριθμό των αποικιών επί 500 και αυτό διότι η

εμβολιασθείσα ποσότητα ούρων στην πραγματικότητα είναι το 1:500 της αρχικής (0,01 X 1:5 = 1:500).

**Παράδειγμα:** Αν στην επιφάνεια του ενός τρυβλίου (η μέτρηση γίνεται στο τρυβλίο με το αιματούχο ή το θρεπτικό άγαρ, διότι στο Mc Conkey  $N^{\circ}$  3 δεν αναπτύσσονται όλα τα μικρόβια) μετρηθούν 200 αποικίες, ο αριθμός των μικροβίων θα είναι 200 X 500 = 100000 ανά ml ούρων.



Εάν αναπτυχθούν περισσότερα από ένα μικρόβια, εκ των οποίων το ένα σε μικρό αριθμό, τότε αυτό θεωρείται χωρίς σημασία (επιμόλυνση).

Μόνο αν ο αριθμός των μικροβίων είναι άνω των θεωρουμένων ως ενδεικτικών ουρολοίμωξης γίνεται αξιολόγηση αυτών, μορφολογική και βιοχημική αναγνώριση και η δοκιμασία ευαισθησίας στα αντιβιοτικά.

Κατά γενική συμφωνία, αριθμός μικροβίων πάνω από 100000/ml ούρων δηλώνει πάντα ουρολοίμωξη, ενώ αριθμός κάτω από 1000/ml δηλώνει επιμόλυνση κατά τη λήψη και χαρακτηρίζεται ως αρνητική εξέταση.

Αριθμός από 1000 – 10000/ml δηλώνει είτε επιμόλυνση κατά τη λήψη, είτε υποχώρηση της μικροβιουρίας σε ασθενείς που παίρνουν αντιβίωση.

Αριθμός από 10000 – 100000/ml για μεν τους ενήλικες απλώς δημιουργεί υπόνοια ουρολοίμωξης, για δε τα παιδιά δηλώνει ουρολοίμωξη.

Αριθμός πάνω από 100000/ml δηλώνει πάντα ουρολοίμωξη.

Εάν αναπτυχθούν δύο μικρόβια σε μεγάλο αριθμό, τότε μετρούνται και τα δύο χωριστά και αν οι αριθμοί και των δύο είναι στις 100000, τότε θα αξιολογηθούν και τα δύο κυρίως με κλινικά στοιχεία από τον ασθενή αλλά και με στοιχεία των μικροβίων.

Αν αναπτυχθούν τρία είδη μικροβίων, το καλλιέργημα από την αρχή θα πρέπει να θεωρηθεί ως «ακατάλληλο δείγμα» και να γίνει επανάληψη.

Οι περιπτώσεις στις οποίες χρειάζεται ή δεν χρειάζεται επανάληψη της ουρικαλλιέργειας είναι οι εξής:

### Δεν χρειάζεται επανάληψη:

- Όταν η πρώτη καλλιέργεια είναι στείρα
- Όταν αναπτυχθεί ένα μικρόβιο (ή δύο) και σε αριθμό πάνω από 100000/ml
- Όταν αναπτυχθούν 1-2 αποικίες, δηλαδή αριθμός κάτω από 1000/ml

### Χρειάζεται επανάληψη:

 Όταν το δείγμα αποδείχθηκε ακατάλληλο γιατί αναπτύχθηκαν τρία είδη μικροβίων

- Όταν αναπτύχθηκαν δύο είδη μικροβίων, που οικολογικά ανήκουν στα μικρόβια του περιβάλλοντος
- Όταν ο ασθενής έχει πάρει πολύ πρόσφατα χημειοθεραπεία

# Μικρόβια που παθολογικά βρίσκονται σε μια ουροκαλλιέργεια:

Κολοβακτηρίδιο (Ε. Coli), Κλεμπσιέλλα, Πρωτέας, Εντερόκοκκος, Σταφυλόκοκκος χρυσίζων, Στρεπτόκοκκος πρασινίζων, Μυκοβακτηρίδιο της φυματίωσης (Β. Koch), άλλα εντεροβακτηριοειδή κλπ.



Εικόνα: 5 Σαλμονέλα

# ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΙΙ

### Β. Καλλιέργεια πτυέλων:

Λήψη δείγματος: Ξέπλυμα του στόματος με νερό βρύσης, πρωινά πτύελα με βήχα και αν δεν υπάρχουν υποβοηθούμε με φυσιοθεραπεία και ενυδάτωση (στους ενήλικες).

Στα βρέφη δεν είναι δυνατόν να έχουμε πτύελα προς εξέταση. Στις περιπτώσεις αυτές καλό είναι να ληφθούν αυτά από το στομάχι με πλύση (όπου είναι δυνατόν) ή να ληφθεί φαρυγγικό επίχρισμα και από αυτό να γίνει καλλιέργεια απευθείας ή κατόπιν αραίωσης σε σταγόνα ζωμού για να ληφθούν μεμονωμένες αποικίες.

**Ποσότητα:** Μέχρι 10 ml (αν είναι για Β. Koch επί τρεις μέρες)

**Δοχείο:** Στείρο που να κλείνει καλά (ουροσυλλέκτης ή τρυβλίο αν η λήψη γίνει στο εργαστήριο)

**Τεχνική λήψης:** Χρειάζονται βλεννοπυώδη πτύελα από τους βρόγχους και όχι από τον οπίσθιο ρινοφάρυγγα ή σάλιο από το στόμα. Άμεση μεταφορά στο εργαστήριο (μέσα σε μισή ώρα από τη λήψη). **Ποτέ** τα πτύελα δεν καλλιεργούνται για αναερόβια.

**Κλινικές πληροφορίες:** Πρέπει να αναφέρεται πνευμονία, χρόνια βρογχίτιδα κ.ά., ο προσδιορισμός ειδικού παθογόνου ή για κοινά μικρόβια. Άμεση επικοινωνία για τα επείγοντα.

### Καλλιέργεια:

# Α. Για απλά μικρόβια:

- Αιματούχο με οπτοχίνη (δεν αναπτύσσεται ο πνευμονιόκοκκος)
- Mc Conkey
- Sabouraud
- Σοκολατόχρουν με μπακιτρασίνη (αναπτύσσεται ο πνευμονιόκοκκος ενώ δεν αναπτύσσονται σχεδόν όλα τα ευαίσθητα στην πενικιλίνη στελέχη των στρεπτόκοκκων της ομάδας Α και αρκετά Gram—).
- Chapman

Ο εμβολιασμός γίνεται σε όλη την επιφάνεια του υλικού για μεμονωμένες αποικίες. Επώαση στους  $37^{\circ}$  C σε ατμοσφαιρικό αέρα ή παρουσία  $CO_2$  5-10 %

Ο εμβολιασμός στο αιματούχο άγαρ μπορεί να γίνει και κατόπιν αραίωσης των πτυέλων σε θρεπτικό ζωμό. Έτσι έχουμε μεμονωμένες αποικίες και γνωρίζουμε την ποσοτική τους σχέση. Επιπλέον επικρατεί το μικρόβιο που προκαλεί τη νόσο, λόγω αραίωσης των υπολοίπων.

### B. Για B. Koch:

- Κατεργασία κατά Petroff (σκοτώνει τα άλλα μικρόβια πλην των Β. Koch)
- 2 ml εξεταστέου υλικού
- 4-6 ml διαλύματος NaOH 4%
- Ισχυρή ανακίνηση και επώαση στους 37° C για 20 min
- Εξουδετέρωση με H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 15% (PH=7.0)
- Φυγοκέντρηση στις 3000 σ.α.λ. επί 15 min
- Εμβολιασμός από το ίζημα των δειγμάτων και των τριών ημερών

### - Θρεπτικά υλικά:

- Lowenstein
- Dorset

# **Χρώση:** Ziehl – Neelsen

# Τεχνική:

- 1. Αραιωμένη φαινικούχος φουξίνη (5-20 min)
- 2. Επαναλαμβανόμενη θέρμανση μέχρι να βγουν ατμοί
- 3. Ξέπλυμα με νερό βρύσης
- 4. Διαφοροποίηση με οξινισμένη αλκοόλη (7% HCl σε αλκοόλη 95°)
- 5. Ξέπλυμα με νερό βρύσης
- 6. Κυανό του μεθυλενίου για 10 min
- 7. Ξέπλυμα με νερό βρύσης

# Αποτελέσματα:

Οξεάντοχα βακτηρίδια – κόκκινα

Υπόστρωμα – ωχρό μπλε

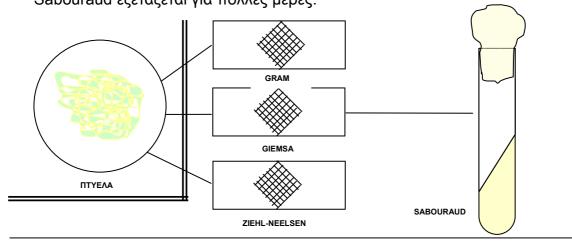
Τα μικρόβια που απομονώνονται συνήθως από μια καλλιέργεια πτυέλων είναι Σταφυλόκοκκος χρυσίζων, πνευμονιόκοκκος, κορυνοβακτηρίδιο της διφθερίτιδας, αιμόφιλοι, μύκητες, Β. Κoch κ.ά.

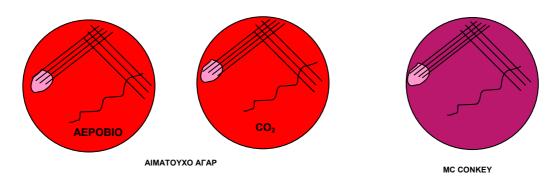
# Καλλιέργεια πτυέλων (απλή)

Δείγμα: Σε τρυβλίο. Από τα πυώδη μέρη μεταφέρονται σε τρεις αντικειμενοφόρες πλάκες για χρώση Gram, Giemsa και Ziehl – Neelsen (αν χρειάζεται).

Εμβολιασμός: Σε δύο τρυβλία με αιματούχο άγαρ (αερόβιο, CO2), ένα Mc Conkey και ένα κεκλιμένο Sabouraud.

Ανάγνωση: Αναζητούνται οι ύποπτες αποικίες, γίνεται Gram χρώση, ανακαλλιέργειες για απομόνωση, ταυτοποίηση και αντιβιόγραμμα. Το Sabouraud εξετάζεται για πολλές μέρες.





Πνευμονιόκοκκος Αιμόφιλος Σταφυλόκοκκος β- αιμολυτικός στρεπτόκοκκος

Κλεμπσιέλλα, άλλα Gram

# Γ. Καλλιέργεια Φαρυγγικού:

Προετοιμασία: Όχι γαργάρες ή ξέπλυμα του στόματος.

**Λήψη:** Η λήψη γίνεται περιστρέφοντας τον ειδικό στυλεό μεταφοράς στην περιοχή της δεξιάς ή αριστεράς αμυγδαλής και αμέσως μετά τοποθετείται στο υλικό μεταφοράς (Stuart).

Η διαδικασία απαιτεί προσοχή να μην ακουμπήσει ο στυλεός στο υπόλοιπο στόμα.

Το δείγμα πρέπει να συνοδεύει παραπεμπτικό, με το οποίο να ζητάται ακριβώς το ή τα είδη των μικροβίων που χρειάζεται να απομονωθούν, δηλαδή β-αιμολυτικό στρεπτόκοκκο, γονόκοκκο ή φυσιολογική χλωρίδα στους λευκοπενικούς κ.λ.π.

Εξέταση του υλικού:

Δεν απαιτείται ταυτοποίηση του συνόλου των μικροβίων που υπάρχουν αλλά συνήθως αναζητούνται τα εξής:

- Στρεπτόκοκκος πυογόνος
- Σταφυλόκοκκος παθογόνος (χρυσίζων)
- Ναϊσσέρια της μηνιγγίτιδας
- Κορυνοβακτηρίδιο της διφθερίτιδας
- Αιμόφιλος του κοκκύτη
- Μονίλια η λευκάζουσα
- Ατρακτόμορφο βακτηρίδιο του Vincent

## • Στρεπτόκοκκος πυογόνος:

Εμβολιασμός δύο τρυβλίων αιματούχου άγαρ. Επώαση στους 37° C για 24 έως 48 ώρες. Εξετάζεται η παρουσία αποικιών που περιβάλλονται από ζώνη αιμολύσεως β (διαυγής). Ακολουθεί η ταυτοποίηση.

### • Σταφυλόκοκκοι παθογόνοι:

Εμβολιασμός υλικού Chapman. Επώαση στους 37° C για 24-48 ώρες. Ταυτοποίηση κατά τα γνωστά.

## • Ναϊσσέρια της μηνιγγίτιδας:

Η παρουσία στην ρινοφαρυγγική κοιλότητα πολλών σαπροφυτικών ναϊσσεριών καθιστά δύσκολη την ανεύρεση της ναϊσσέριας της μηνιγγίτιδας.

Συνιστάται η χρήση ειδικού θρεπτικού υλικού (Mueller-Hinton) και ο εμβολιασμός να γίνει το αργότερο σε μια ώρα από τη λήψη του υλικού. Επώαση στους  $37^{\circ}$  C επί 48ωρο και σε ατμόσφαιρα  $CO_2$  10%. Απομόνωση. Ταυτοποίηση.

### Κορυνοβακτηρίδιο της διφθερίτιδας:

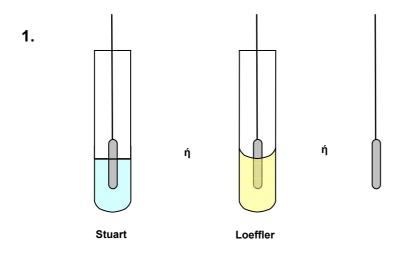
Εμβολιασμός σε υλικό Loeffler. Απόχυση του νερού συμπύκνωσης, εμβολιάζουμε περιστρέφοντας το στυλεό στην επιφάνεια του υλικού και επωάζουμε στους  $37^{\circ}$  C . Οι αποικίες του κορυνοβακτηριδίου της διφθερίτιδας παίρνουν ένα υποκίτρινο χρώμα στο υλικό Loeffler.

# • <u>Αιμόφιλος του κο</u>κκύτη:

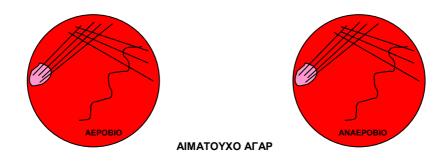
Ο εμβολιασμός γίνεται στο υλικό Bordet-Gengou μετά πενικιλίνης και διαμιδίνης.

# Καλλιέργεια Φαρυγγικού (απλή)

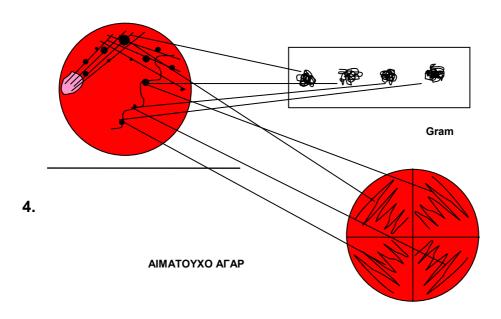
- 1. Το Δείγμα μπαίνει αμέσως σε υλικό Stuart ή σε υλικό Loeffler ή χρησιμοποιείται αμέσως για εμβολιασμό.
- 2. Εμβολιασμός σε δύο τρυβλία αιματούχο άγαρ και επίστρωση με κρικοφόρο στυλεό. Επωάζονται το ένα αναερόβια και το άλλο αερόβια για 24 ώρες.
- 3. Ανάγνωση. Αναζητούνται αποικίες παθογόνων μικροβίων (β-αιμολυτικές, πνευμονιόκοκκου, αιμόφιλου). Γίνεται παρασκεύασμα από αυτές, χρώση Gram και μικροσκοπούνται.
- Από τις ύποπτες αποικίες γίνονται ανακαλλιέργειες σε αιματούχο άγαρ, για να έχουμε καθαρό καλλιέργημα για την ταυτοποίηση και το αντιβιόγραμμα.



2.



3.



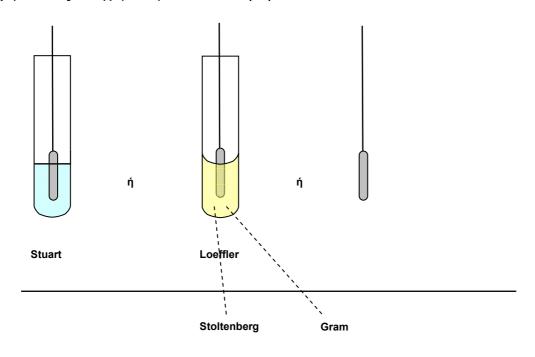
# <u>Καλλιέργεια φαρυγγικού (ή άλλου υλικού)</u> για Διφθερίτιδα

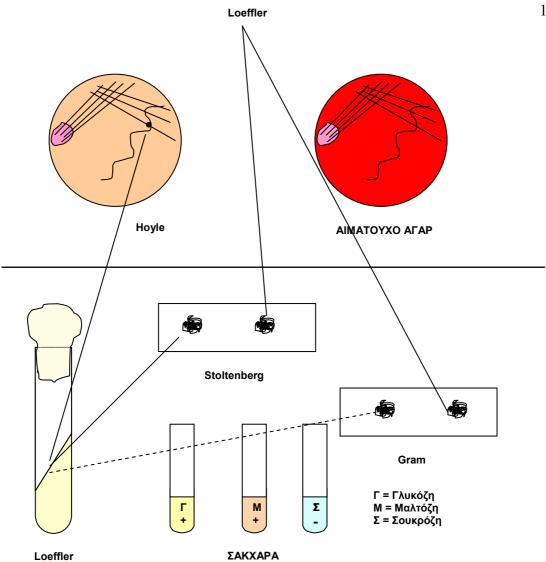
Δείγμα: Αμέσως μετά τη λήψη μπαίνει σε υλικό μεταφοράς Stuart ή εμβολιάζεται απευθείας στο υλικό Loeffler και στα άλλα υλικά.

**Εμβολιασμός:** Σε υλικό με τελλουριώδες κάλιο (Hoyle) και σε ένα αιματούχο. Επώαση στους 37° C για 24 ώρες (το Hoyle για 48 ώρες τουλάχιστον).

**Ανάγνωση:** Από το Loeffler χρώση Stoltenberg (ή άλλη παρόμοια) καθώς και Gram. Από το αιματούχο αναζήτηση β-αιμολυτικού στρεπτόκοκκου.

Από το Hoyle μετά 48ωρο αναζήτηση χαρακτηριστικών αποικιών (γκριζόμαυρες), χρώση Gram απ αυτές και αν είναι κορυνοβακτηρίδια, απομόνωση με ανακαλλιέργεια σε Loeffler. Απ αυτό ή από το Hoyle δοκιμές ζυμώσεως σακχάρων για ταυτοποίηση.





Χρώση Stoltenberg: (Μέθοδος εκλογής για κορυνοβακτηρίδια) Η μέθοδος αυτή είναι τροποποίηση της Albert και γίνεται σε έναν χρόνο.

# Χρωστική:

•	Πράσινο του μαλαχίτη	2,5	gr		
•	Κυανό της τολουϊδίνης	0,5	gr		
•	Αιματοξυλίνη	0,1	gr		
•	Οξικό οξύ παγόμορφο (Glacial)	30,0	ml		
•	Μεθυλική αλκοόλη	30,0	ml		
•	Απεσταγμένο νερό (D.W)	1000,0	ml		
	Διαλύονται οι χρωστικές στην αλκοόλη, προστίθ	θεται το	ο οξύ	και	την
оттз	μένη ημέρα προστίθεται το νερό.				

### Τεχνική:

- Το παρασκεύασμα μονιμοποιείται στη φλόγα (4-5 φορές), προστίθεται η χρωστική και παραμένει για 20 min.
- Ξέπλυμα με νερό βρύσης (απαλή ροή)
- Στέγνωμα μικροσκόπηση

### Αποτέλεσμα:

Τα κοκκία των κορυνοβακτηριδίων χρωματίζονται ερυθροϊώδη, τα μικροβιακά σώματα κυανοπράσινα.

# <u>ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΙΙΙ</u>

### Δ. Καλλιέργεια οφθαλμικού:

### Δείγμα:

<u>Ι. Χειρουργικό δείγμα:</u> Γίνεται προσυνεννόηση με το εργαστήριο για άμεσο ενοφθαλμισμό και ακολουθείται η διαδικασία μικροσκοπικής εξέτασης και καλλιέργειας όπως στα υγρά παρακεντήσεων και το πύο που περιγράφεται πιο κάτω (σελ. 33)

<u>ΙΙ. Από επιπεφυκότα:</u> Δεν πρέπει να έχουν χρησιμοποιηθεί αλοιφές ή κολλύρια.

Γίνεται εφύγρανση βαμβακοφόρου στυλεού με φυσιολογικό ορό. Πρέπει να σημειωθεί αν το δείγμα είναι από τον αριστερό ή τον δεξιό οφθαλμό.

**Λήψη δείγματος:** Η λήψη γίνεται ως εξής: Ανασηκώνουμε τα βλέφαρα και με περιστροφική κίνηση του στυλεού παίρνουμε αρκετό υλικό, το οποίο βάζουμε σε υλικό μεταφοράς κοινών παθογόνων μικροβίων (Stuart).

Το δείγμα πρέπει να συνοδεύουν κλινικές πληροφορίες και ακριβής εντολή για αναζήτηση συγκεκριμένου παθογόνου μικροβίου που υποπτεύεται ο γιατρός της κλινικής.

Η πορεία που ακολουθείται (μικροσκοπική, καλλιέργεια κ.ά) είναι ανάλογη με το αναζητούμενο μικρόβιο.

# ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΙΥ

# Ε. Καλλιέργεια αίματος:

**Λήψη:** Παίρνουμε περιφερικό αίμα κατόπιν τοπικής αντισηψίας του δέρματος στο σημείο φλεβοκέντησης. Συνήθως απαιτούνται 3 δείγματα αίματος με ημίωρη διαφορά στο χρόνο λήψης ή επί ενδοκαρδίτιδας μέχρι 7 δείγματα το 24ωρο (συνεννόηση με το εργαστήριο). Αναλογία αίματος – ζωμού 1/10.

Η λήψη γίνεται σε 2 φιάλες (κάθε φορά) Castaneda (1 για αναερόβια καλλιέργεια). Η φλεβική παρακέντηση γίνεται μετά από προσεκτική τοπική αντισηψία. Επί συνεχούς πυρετού λήψη αιμοκαλλιεργειών οποτεδήποτε. Επί κυματοειδούς πυρετού η λήψη γίνεται πριν το ρίγος.

Στο παραπεμπτικό που συνοδεύει τα δείγματα πρέπει να αναφέρεται η λήψη αντιβιοτικών (συνεννόηση με το εργαστήριο), η ανοσολογική κατάσταση του ασθενούς, αν υπάρχει φλεβοκαθετήρας ή μόσχευμα. Διφασικό υλικό Hemoline (Castaneda):

Οι φιάλες με το διφασικό υλικό περιέχουν υλικά με ειδικούς παράγοντες που καθιστούν δυνατή την αποκάλυψη των αερόβιων και αναερόβιων μικροβίων που αποτελούν την συγκεκριμένη αιτία μιας σηψαιμίας.

Το υλικό αυτό συνιστάται για την ταχεία αύξηση των εντεροβακτηριοειδών,

# Hemoline (Castaneda) θρεπτικό υλικό εχήμα: 1 Διφασικό υλικό Υλικό για αναερόβια Διπλό υλικό(DUO)

της ψευδομονάδας, του σταφυλόκοκκου του στρεπτόκοκκου και της Candida. Οι εμπλουτιστικοί παράγοντες περιλαμβάνονται για να ευνοήσουν την ανάπτυξη των δύσκολα αναπτυσσόμενων βακτηριδίων.

Τέτοιοι παράγοντες εμπλουτιστικοί είναι:

- α. Αμινοξέα (που περιέχονται στην καζεΐνη και τη ζελατίνη)
- β. Βιταμίνες και νουκλεϊνικά οξέα
- γ. ΝΑD και Αιμίνη (κυρίως για τον αιμόφιλο)
- δ. Βιταμίνη Β<sub>6</sub> (κυρίως για στρεπτόκοκκο και σταφυλόκοκκο)
- ε.  $CO_2$  (απαραίτητο για ναϊσσέρια, βρουκέλλα, αιμόφιλο και πνευμονιόκοκκο).



Εικόνα: 6 Διφασικό υλικό (Castaneda)



Εικόνα: 7 Διάφοροι τύποι Θρ. Υλικών για αιμοκαλλιέργεια

### <u> Χρηση:</u>

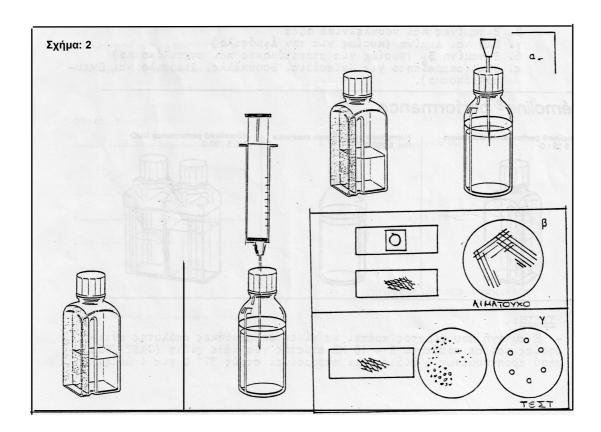
- Η συλλογή του αίματος πρέπει να γίνει σε συνθήκες απόλυτης αντισηψίας και σε ποσότητα 10 ml αίματος (λιγότερο έως 5 ml αν υπάρχει δυσκολία) για κάθε φιάλη (Castaneda), αφού προηγουμένως η φιάλη έχει παραμείνει στους 37° C για 4 ώρες (Σημείωση: οι φιάλες διατηρούνται σε ψυγείο στους 4° C μέχρι τη χρήση και έως την ημερομηνία λήξης τους).
- Επάλειψη του άγαρ με το ζωμό με ανακίνηση της φιάλης.
- Αν υπάρχουν 2 φιάλες (Castaneda DUO) για κάθε ασθενή, την μία την αερίζουμε (για αερόβια τρυπώντας το ελαστικό πώμα με διαφορετική βελόνα μιας χρήσεως για την κάθε μια υπό αυστηρά άσηπτες συνθήκες).
- Εάν είναι μόνο μία φιάλη (διφασική) για τον ασθενή, την αερίζουμε εκτός αν ζητούν καλλιέργεια για βρουκέλλα.
- Ελέγχουμε όλες τις αερόβιες εάν έχουν αποικίες πάνω στο άγαρ καθημερινά για 13 ημέρες, οπότε ανοίγεται υποχρεωτικά (την 13<sup>η</sup>) πριν πεταχτεί. (Σημείωση: οι αναερόβιες αιμοκαλλιέργειες και για βρουκέλλα φυλάσσονται 16 ημέρες).

### Θετική αιμοκαλλιέργεια: (σχ. 2)

- Την ανοίγουμε με σύριγγα (αφού έχουμε καθαρίσει προσεκτικά το πώμα με αντισηπτικό κυρίως οινόπνευμα την περίσσεια του οποίου στη συνέχεια καίμε για καλύτερο αποτέλεσμα αντισηψίας)
- 2. Στάζουμε 2 σταγόνες σε ένα πλακάκι και βάφουμε κατά Gram
- 3. Εμβολιάζουμε σε αιματούχο και Mc Conkey στάζοντας 3-4 σταγόνες στο κάθε τρυβλίο και κουνώντας το για να απλωθεί.

4. Σε ένα ζωμό για το test ευαισθησίας ρίχνουμε 2-3 σταγόνες από τη φιάλη, τον επωάζουμε μέχρι να θολώσει και στη συνέχεια βάζουμε test.

Αναερόβιες: Στις 72 ώρες τυφλή ανακαλλιέργεια (φαίνεται ή όχι ανάπτυξη αποικιών) με σύριγγα σε αιματούχο, Mc Conkey και Br άγαρ (το αιματούχο και το Mc Conkey αερόβια, το Br άγαρ αναερόβια). Υποψία θετικής (θολή ή ίζημα) στρώνουμε ένα πλακάκι.



### Ανάγνωση αιμοκαλλιέργειας

Όπως προαναφέραμε, μια αιμοκαλλιέργεια διαρκεί 13 ημέρες (και για βρουκέλλα 16), εκτός αν θετικοποιηθεί νωρίτερα. Στο διάστημα αυτό περνάει από διάφορα στάδια:

**Ι. Επισκόπηση** (καθημερινός έλεγχος) χωρίς ανακίνηση των φιαλιδίων. Αυτό γίνεται από την επόμενη ημέρα του εμβολιασμού και κάθε μέρα μέχρι να εντοπισθούν σημάδια θετικής αιμοκαλλιέργειας. Αν δεν εντοπισθούν, η αιμοκαλλιέργεια ανοίγει οπωσδήποτε την 13<sup>η</sup> ή 16<sup>η</sup> ημέρα.

Τέτοια σημάδια μπορεί να είναι:

- α) Αιμόλυση (έντονη ή ελαφρά)
- β) Θολερότητα διάχυτη στο ζωμό σε κάποιο από τα δείγματα
- γ) Θολερότητα κοκκιώδης ή με ίζημα
- δ) Αποικίες ή άλλη αλλαγή στην επιφάνεια του άγαρ
- ε) Υμένιο (μεμβράνη) στην επιφάνεια του ζωμού

- στ) Πήξη του ζωμού χαλαρή (σαν ζελατίνα)
- ζ) Αλλαγή στο χρώμα του ζωμού ή του άγαρ
- η) Καμία αλλαγή, που σημαίνει ότι δεν υπάρχει καμία φανερή ανάπτυξη μικροβίων χωρίς όμως και να αποκλείεται.

### ΙΙ. Ανακαλλιέργεια

Η ανακαλλιέργεια μετά την 24ωρη επώαση (έχει δεν έχει ενδείξεις) και κατόπιν όταν εμφανιστούν ενδείξεις θετικής αιμοκαλλιέργειας και οπωσδήποτε την 13<sup>η</sup> ή 16<sup>η</sup> ημέρα πριν κλείσουν (κατά το σχήμα 2 σελ. 19):

- α. Λήψη δείγματος με σύριγγα υπό άσηπτες συνθήκες, από την ύποπτη περιοχή.
- **β.** Κάνουμε παρασκευάσματα (Gram ή απαιωρημένη σταγόνα) και εμβολιασμό σε αιματούχο άγαρ και Mc Conkey  $N^{\circ}$  3 (ή άλλο υλικό όπως TSA, Brucella άγαρ, σοκολατόχρουν κ.ά)
- γ. Παρασκεύασμα από το τρυβλίο, ανακαλλιέργεια και τεστ ευαισθησίας.

# ΙΙΙ. Ανάγνωση της ανακαλλιέργειας

Η ανακαλλιέργεια (και όλη η αιμοκαλλιέργεια) χαρακτηρίζεται στείρα αν δεν παρατηρηθούν αποικίες ή διάχυτη ανάπτυξη στα τρυβλία. Αν όμως παρατηρηθεί ανάπτυξη, προχωρούμε στην ταυτοποίηση και το τεστ ευαισθησίας.

# **ΙV. Ταυτοποίηση μικροβίων** (Πίνακας Ι σελ. 20)

Η ταυτοποίηση των μικροβίων από τη μορφολογία των αποικιών, τη μικροσκοπική εξέταση και με μία ή περισσότερες από τις χαρακτηριστικές δοκιμασίες κάθε μικροβίου (βιολογικές, βιοχημικές, ορολογικές κ.λ.π).

Πίνακας Ι. Μικρόβια που ζητάμε στην αιμοκαλλιέργεια και βασικά χαρακτηριστικά τους.

Μικρόβια	Μορφολογία και Gram χρώση	Αποικίες στο αιματούχο άγαρ	Δοκιμές ταυτοποιητικές
Σταφυλόκοκκος χρυσίζων	Θ. κόκκοι Σταφυλοειδείς	Μεγάλες, χρυσωπές, Αιμόλυση	Κοαγκουλάση = θετική
Στρεπτόκοκκος πρασινίζων	Θ. κόκκοι, αλυσίδες ή ζεύγη	Μικρές, πράσινη ζώνη Αιμολύσεως	Καταλάση = αρνητική
Στρεπτόκοκκος β-αιμολυτικος Α – ομάδος	Θ. κόκκοι, αλυσίδες πιεσμένες	Μικρές, διαυγής κυκλική ζώνη αιμολύσεως	Μπακιτρασίνη = ευαισθη- σία
Πνευμονιόκοκκος	Θ. κόκκοι λογχοειδείς, ζεύγη, άλως	Μικρές, με κεντρική κοί- λανση, πρασινίζουσες	Υπεροξειδάση = θετική, Διαλυτός στη χολή
Εντερόκοκκος	Θ. κόκκοι ζεύγη, αλυσίδες	Μικρές, μερικές β-αιμολυ- τικές	Ανάπτυξη σε Mc Conkey
Μηνιγγιτιδόκοκκος	Α. κόκκοι διπλόκοκκοι	Μέσου μεγέθους, γκριζω- πές	Οξειδάση = θετική, Συγκόλ ληση με ειδικούς ορούς
Αιμόφιλος γρίπης	Α. βακτηρίδια μικρά πολυμορφισμός	Μικρές χωρίς αιμόλυση	Δορυφορισμός αποικιών γύρω από σταφυλόκοκκο
Σαλμονέλες	Α. βακτηρίδια	Μεγάλες (άχρωμες στο Mc Conkey)	Συγκόλληση με ειδικούς ορούς. Βιοχημικές δοκιμές
Βρουκέλλες	Α. κοκκοβακτηρίδια	Μικρές με βραδεία ανά- πτυξη	Συγκόλληση με ειδικούς ορούς. Βιοχημικές δοκιμές ευαισθησία σε χρωστικές
Εσχερίχιες (E. coli)	Α. βακτηρίδια	Μεγάλες (ροδέρυθρες στο Mc Conkey)	Βιοχημικές δοκιμές
Κλεμπσιέλλες	Α. βακτηρίδια	Ως άνω, βλεννώδεις	Βιοχημικές δοκιμές
Πρωτείς	Α. βακτηρίδια	Ερπίζουσες, άχρωμες στο Mc Conkey	Ερπυσμός, ΡΡΑ = θετική
Ψευδομονάδες	Α. βακτηρίδια	Πράσινη χροιά στο άγαρ, άχρωμες στο Mc Conkey	Οξειδάση = θετική
Σταφυλόκοκκος λευκός	Θ. κόκκοι σταφυλοειδείς	Μεγάλες, άσπρες χωρίς αιμόλυση	Νιτρικά = θετικά Κοαγκουλάση = αρνητική

### Επαλήθευση επιμολύνσεως αιμοκαλλιέργειας κατά τη λήψη

Αν υπάρχει υποψία (από το είδος του μικροβίου) ότι το μικρόβιο που αναπτύχθηκε δεν προέρχεται από το αίμα αλλά από το δέρμα του ασθενή, επαναλαμβάνεται η λήψη από τον Μικροβιολόγο αυτή τη φορά και γίνεται η ακόλουθη δοκιμή επιμόλυνσης:

Μετά την άσηπτη λήψη και τον εμβολιασμό στα φιαλίδια (Castaneda), από το αίμα που έμεινε στη σύριγγα, εμβολιάζεται 1 ml αίμα σε 15 ml περίπου λειωμένο άγαρ (θερμοκρασίας 45° C περίπου). Το μίγμα ανακινείται και χύνεται σε τρυβλίο, παγώνει και επωάζεται στους 37° C για 24ωρο.

Αν υπάρχουν πάνω από 5 αποικίες μικροβίων, πιθανόν αυτό προέρχεται από το αίμα, ενώ αν είναι λιγότερες ή καθόλου τότε το μικρόβιο που αναπτύχθηκε στην προηγούμενη αιμοκαλλιέργεια είναι πολύ πιθανό να προέρχεται από επιμόλυνση.

# <u>ΚΕΦΑΛΑΙΟ V</u>

# ΣΤ. Καλλιέργεια Ε.Ν.Υ:

**Λήψη:** Η λήψη γίνεται κατόπιν αυστηρής τοπικής αντισηψίας.

**Όγκος:** Όσα περισσότερα ml επιτρέπεται, μοιράζονται σε τρία διαδοχικά σωληνάρια:

- 1° σωληνάριο (στείρο)
- 2° σωληνάριο (στείρο)
- 3° σωληνάριο (ηπαρινισμένο)

Τεχνική λήψης: Ωσφυονωτιαία ή αυχενική παρακέντηση από πολύ έμπειρο άτομο με πολύ μεγάλη προσοχή και άμεση μεταφορά στο εργαστήριο.

### Α. Άμεση μικροσκοπική εξέταση:

Φυγοκέντρηση ΕΝΥ στις 5000 στροφές ανά λεπτό (σ.α.λ.) επί 20 min μέσα σε κωνικά σωληνάρια αποστειρωμένα.

Άδειασμα του υπερκείμενου υγρού σε άλλο σωληνάριο προκειμένου να γίνουν οι βιοχημικές εξετάσεις.

Επίστρωση, ξήρανση, μονιμοποίηση, χρώση με:

- α. Κυανό του μεθυλενίου (ή Giemsa)
- β. Gram
- y. Ziehl Neelsen

### Μικρόβια που αναζητούνται στο Ε.Ν.Υ:

Μηνιγγιτιδόκοκκος, πνευμονιόκοκκος, αιμόφιλος, εντεροβακτηριακά, ψευδομονάδα, μυκοβακτηρίδιο της φυματίωσης κ.ά.

### Χρώση κυανού του μεθυλενίου (κατά Loefler):

- Κυανό του μεθυλενίου 30% σε D.W. (από μητρικό) επί 3 min
- Ξέπλυμα με νερό βρύσης (απαλή ζωή)

### Χρώση Gram:

- 1. Ξήρανση και μονιμοποίηση
- 2. Crystal Violet 1% ή Methyl Violet για 30 sec 1 min
- 3. Ξέπλυμα με νερό βρύσης
- 4. Lugol για 30 sec
- 5. Έκχυση Lugol και αποχρωματισμός με αλκοόλη
- 6. Ξέπλυμα με νερό βρύσης

- 7. Σαφρανίνη ή φουξίνη για 20 sec
- 8. Ξέπλυμα με νερό βρύσης
- 9. Στέγνωμα

# Β. Καλλιέργεια:

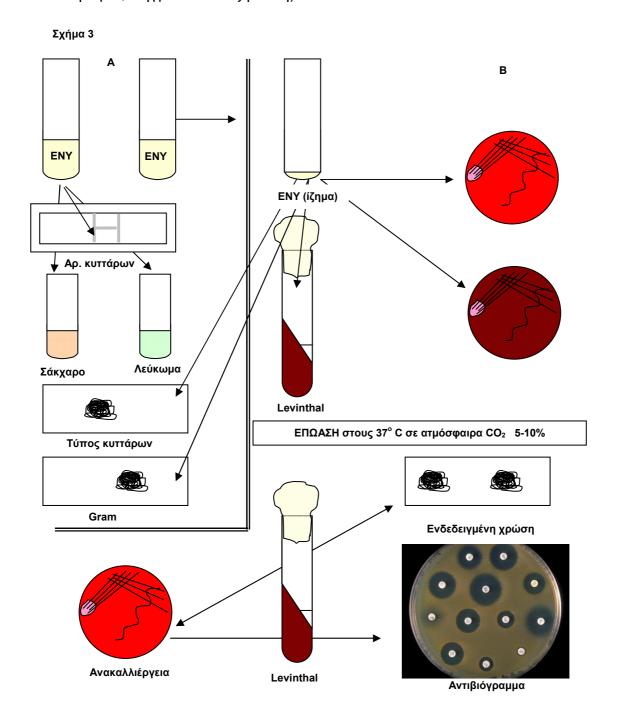
Εκτός των περιπτώσεων τραυματικής μηνιγγίτιδας, σπάνια στις άλλες περιπτώσεις ανευρίσκονται περισσότερα από ένα είδη μικροβίων στο Ε.Ν.Υ.

Ο ενοφθαλμισμός (εμβολιασμός) γίνεται ως εξής:

- Ένα υλικό για αναερόβια (10 σταγόνες Ε.Ν.Υ)
- Αιματούχο άγαρ (4-5 σταγόνες Ε.Ν.Υ)
- Mc Conkey
- Σοκολατόχρουν άγαρ και CO<sub>2</sub> 10% και άγαρ Levinthal
- Επώαση στους 37° C

Απομόνωση και ταυτοποίηση των μικροβίων κατά τα γνωστά.

(**Σημείωση:** Το υλικό Levinthal είναι βρασμένο αιματούχο άγαρ σε σωληνάριο, πηγμένο σε λοξή θέση).



Γενική εξέταση (Α) και καλλιέργεια (Β) εγκεφαλονωτιαίου υγρού (Ε.Ν.Υ)

Α. Από το δείγμα, χωρίς φυγοκέντρηση, μεταφέρονται σταγόνες ΕΝΥ σε πλάκα Neubauer (ή Thoma's) και οι απαραίτητες ποσότητες για τον προσδιορισμό σακχάρου και λευκώματος.

Β. Από το άλλο δείγμα (άσηπτο παρμένο και διατηρημένο) μετά από φυγοκέντρηση μεταφέρονται με πιπέττα Pasteur (αποστειρωμένη) σταγόνες σε αντικειμενοφόρους πλάκες και στα τρία θρεπτικά υλικά.

Μετά από 24ωρη επώαση γίνεται μικροσκοπική εξέταση, αν υπάρχουν αποικίες ανακαλλιέργειες, τεστ ευαισθησίας (αντιβιόγραμμα) και ταυτοποίηση.

### Κυτταρολογική και Χημική εξέταση Ε.Ν.Υ

### Ι. Κυτταρολογική εξέταση:

Περιλαμβάνει την μέτρηση του αριθμού των κυττάρων και τον προσδιορισμό του τύπου τους.

### Ια. Μέτρηση κυττάρων:

Θα χρησιμοποιηθεί Ε.Ν.Υ χωρίς πήγμα (με αντιπηκτικό), χωρίς φυγοκέντρηση και χωρίς αραίωση. Η μέτρηση γίνεται σε κυτταρομετρική πλάκα (π.χ Neubauer). Αν υπάρχουν πολλά ερυθρά, τότε μπορεί να προστεθεί μια σταγόνα οξικού οξέος 33% σε 10 σταγόνες Ε.Ν.Υ αρκεί να πολλαπλασιαστεί ο τελικός αριθμός των κυττάρων επί 1,1. Φυσιολογικά στο Ε.Ν.Υ υπάρχουν 1-10 κύτταρα ανά ml και είναι κυρίως μονοπύρηνα. Στα βρέφη ο αριθμός μπορεί να φθάσει στα 30.

# Ιβ. Τύπος κυττάρων:

Το ίζημα (μετά από φυγοκέντρηση σε κωνικό στις 5000 σ.α.λ για 20 min) ή αυτούσιο το Ε.Ν.Υ αν είναι θολερό, θα χρωματιστεί με May – Grunwald Giemsa και θα υπολογιστεί η εκατοστιαία αναλογία (λευκοκυτταρικός τύπος)

Στον πίνακα ΙΙ που ακολουθεί αναφέρονται τα κυτταρολογικά και χημικά ευρήματα στο Ε.Ν.Υ στις διάφορες μορφές μηνιγγίτιδας.

Πίνακας ΙΙ. Ευρήματα στο Ε.Ν.Υ στις διάφορες μορφές μηνιγγίτιδας

Μηνιγγίτιδες	Όψη	Σάκχαρο	Αριθμός Κυττάρων	Τύπος κυττάρων
Φυσιολογικό Ε.Ν.Υ	Διαυγής	½ του αίματος. 50-60 mgr %	0 – 30 παιδιά 1 – 10 ενήλικες	Μονοπύρηνα
Μηνιγγιτιδοκοκκική	Θολή	0 – 40	100 – 10000	95% πολυμορφοπύ- ρηνα
Πνευμονιοκοκκική	Θολή	0 – 40	100 – 10000	Πολυμορφοπυρη- νικός
Αιμόφιλου	Θολή	0 – 40	200 – 3000	90% πολυμ/κός στην αρχή λεμφοκυτ/κός
Φυματιώδης	Διαυγής - ελ. θολή	0 – 40	20 – 1000	Λεμφοκυτταρικός
Άσηπτος από ιούς	Διαυγής	50 – 60	10 – 200	Λεμφοκυτταρικός

### ΙΙ. Χημική εξέταση:

Περιλαμβάνει τον προσδιορισμό του ποσού του λευκώματος και του σακχάρου στο Ε.Ν.Υ καθώς και άλλων στοιχείων όπως τα χλωριούχα.

### ΙΙα. Προσδιορισμός λευκώματος:

Γίνεται συνήθως με θολομετρική μέθοδο με την οποία συγκρίνεται η θολερότητα που εμφανίζεται στο Ε.Ν.Υ όταν προστεθεί θειοσαλικυλικό οξύ, με την θολερότητα μιας σταθερής θολομετρικής κλίμακας ή καμπύλης. Η σύγκριση γίνεται με φωτόμετρο.

Φυσιολογικά υπάρχουν 15 – 45 mgr %. Μεγάλη αύξηση υπάρχει στις μικροβιακές μηνιγγίτιδες.

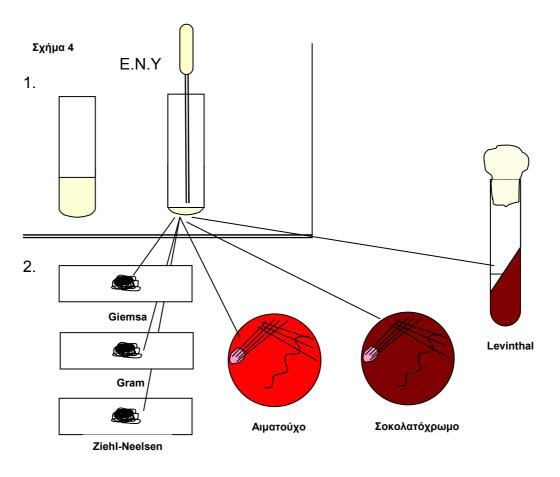
# ΙΙβ. Προσδιορισμός σακχάρου:

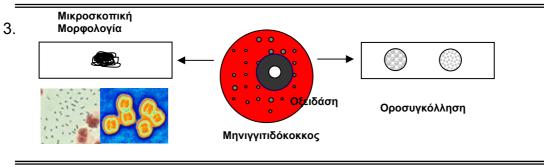
Γίνεται με την ενζυματική μέθοδο προσδιορισμού γλυκόζης στο αίμα. Επειδή όμως φυσιολογικά το ποσό του σακχάρου στο Ε.Ν.Υ είναι περίπου το μισό απ αυτό του αίματος, η ποσότητα του εξεταστέου Ε.Ν.Υ είναι διπλάσια από αυτή του αίματος για κάθε μέθοδο που εφαρμόζεται.

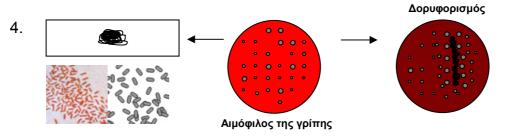
Στα νεογνά το ποσό είναι περίπου όσο και στο αίμα.

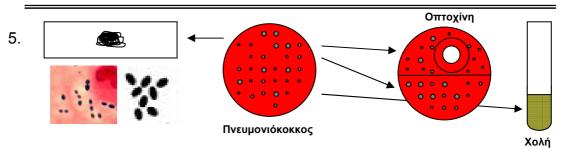
Σχηματική παράσταση της καλλιέργειας Ε.Ν.Υ και ταυτοποίησης των τριών συχνότερων μικροβίων που προκαλούν μηνιγγίτιδα (μηνιγγιτιδόκοκκος, αιμόφιλος, πνευμονιόκοκκος) στο Σχήμα 4 στη σελίδα 25 που ακολουθεί:

- 1. Το Ε.Ν.Υ φυγοκεντρείται
- 2. Με πιπέττα Pasteur αποστειρωμένη μεταφέρονται σταγόνες από το ίζημα σε αντικειμενοφόρες πλάκες για **μικροσκοπική εξέταση** (Giemsa, Gram και Ziehl Neelsen) και για καλλιέργεια στα τρία θρεπτικά υλικά (αν δεν υπάρχουν και τα τρία, τότε μόνο στο Levinthal). Μετά 24ωρη επώαση αναζητούνται αποικίες, γίνεται μικροσκοπική εξέταση και προχωρούμε στην ταυτοποίηση.
- 3. **Ανάπτυξη Μηνιγγιτιδόκοκκου.** Gram αρνητικοί καφεοειδείς διπλόκοκκοι. Οξειδάση θετικοί (βαθύ ιώδες ή μαύρο χρώμα αποικιών γύρω από το δισκίο Οξειδάσης). Συγκολλούνται με τον ειδικό αντιορό.
- 4. Ανάπτυξη Αιμόφιλου. Gram αρνητικά βακτηρίδια με έντονο πολυμορφισμό. Δοκιμή δορυφορισμού θετική (αν σε τρυβλίο με σοκολατόχρωμο άγαρ που έχει εμβολιαστεί πιθανός αιμόφιλος, εμβολιάσουμε στέλεχος σταφυλόκοκκου κατά προτίμηση χρυσίζοντα που παράγει τον παράγοντα ανάπτυξης V του αιμόφιλου, σε ευθεία γραμμή και οι αποικίες που περιβάλουν αυτές του σταφυλόκοκκου είναι μεγαλύτερες από τις υπόλοιπες του καλλιεργήματος, τότε πρόκειται για αιμόφιλο)
- 5. **Ανάπτυξη Πνευμονιόκοκκου.** Gram θετικοί λογχοειδείς διπλόκοκκοι, ευαίσθητοι στην οπτοχίνη, ξάσπρισμα στο σοκολατόχρωμο άγαρ, θετική δοκιμή διαλυτότητας στη χολή.









### ΚΕΦΑΛΑΙΟ VI

### Ζ. Καλλιέργεια κοπράνων:

**Λήψη:** Δεν πρέπει να χρησιμοποιηθούν αντιδιαρροϊκά ή καθαρτικά. Η λήψη γίνεται σε ειδικό στείρο δοχείο μεταφοράς κοπράνων (με κουταλάκι) ή σε τρυβλίο αποστειρωμένο.

Λήψη 5 gr περίπου κοπράνων από το βλεννοπυώδες μέρος, όχι ανάμειξη με ούρα. Άμεση μεταφορά στο εργαστήριο. Αν προβλέπεται καθυστέρηση ζητάμε ειδικό Buffer μεταφοράς κοπράνων. Αν ψάχνουμε για κλωστηρίδιο Difficile, γίνεται συνεννόηση με το εργαστήριο. Αν ψάχνουμε για σιγγέλλα, πρέπει να έρθουν αμέσως στο εργαστήριο για ενοφθαλμισμό.

Το δείγμα πρέπει να συνοδεύει παραπεμπτικό με κλινικές πληροφορίες όπως ο επακριβής προσδιορισμός του εντεροπαθογόνου δηλαδή σαλμονέλα ή σιγγέλλα, Cl. Difficile ή Campylobacter κ.λ.π., σχέση της νόσου με ταξίδια, ή τροφή.

Αν μετά την καλλιέργεια το δείγμα βγει αρνητικό ως προς το ερευνούμενο μικρόβιο, καλό είναι να ζητηθεί επανάληψη σε τρία δείγματα διαδοχικών ημερών.

**Επίχρισμα ορθού:** Σε έντονο διαρροϊκό σύνδρομο, γίνεται λήψη με βαμβακοφόρο στυλεό ή κατά την ορθοσκόπηση από φλεγμονώδεις αλλοιώσεις.

Αν ψάχνουμε για CI. Difficile, η λήψη γίνεται με αναερόβιο σετ (στυλεός – υλικό μεταφοράς). Κατάλληλο ορθικό δείγμα είναι αυτό που έχει χρωματίσει το βαμβάκι. Αμέσως μετά τη λήψη ο βαμβακοφόρος στυλεός μπαίνει σε σωληνάριο με το υλικό μεταφοράς Stuart.

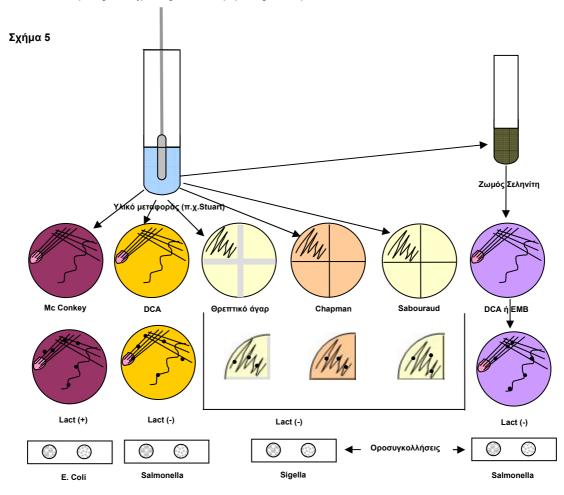
Μικροσκοπική εξέταση: Δεν χρειάζεται να γίνει λόγω πολλών μικροοργανισμών που υπάρχουν στα κόπρανα ως φυσιολογική χλωρίδα.

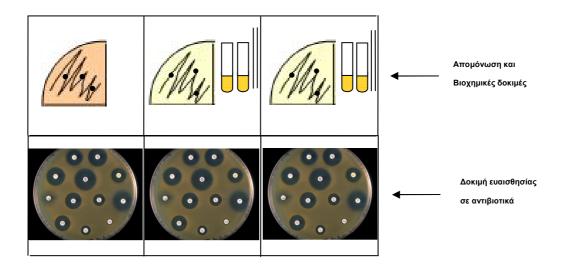
**Καλλιέργεια:** Για μια πλήρη και γενική καλλιέργεια κοπράνων θα χρησιμοποιηθούν όλα ή τα περισσότερα από τα παρακάτω θρεπτικά υλικά. Μπορεί όμως να γίνει καλή καλλιέργεια (απλή) μόνο με Mc Conkey  $N^{\circ}$  3 και θρεπτικό άγαρ ή με Mc Conkey  $N^{\circ}$  3 και DCA.

Κατά σειρά αναγκαιότητας, τα θρεπτικά υλικά που χρειάζονται για την καλλιέργεια των κοπράνων είναι τα εξής:

- 1. Μc Conkey άγαρ  $N^\circ$  3. Είναι το βασικό υλικό για την ανάπτυξη των κολοβακτηριδίων αλλά εν ανάγκη και για την ανάπτυξη σαλμονελλών και σιγγελλών.
- 2. DCA (δεσοξυχολικό κιτρικούχο άγαρ), ή SS άγαρ κατάλληλα για την ανάπτυξη των σαλμονελλών και των σιγγελλών.
- 3. Ζωμός σεληνίτη, κατάλληλο εμπλουτιστικό υλικό για την ανάπτυξη των σαλμονελλών.
- 4. Θρεπτικό άγαρ (κοινό), κατάλληλο για την εύκολη αναγνώριση των πρωτέων (ερπυσμός) και της ψευδομονάδας Aeroginosa (γαλαζοπράσινο χρώμα).
- 5. Chapman (άγαρ), κατάλληλο για την ανάπτυξη σταφυλόκοκκου και την αρίθμηση των αποικιών.
- 6. Sabouraud (άγαρ), κατάλληλο για την ανάπτυξη μυκήτων.
- 7. ΕΜΒ άγαρ (άγαρ με ηωσίνη και κυανό του μεθυλενίου) για την ανακαλλιέργεια από το ζωμό σεληνίτη.

Στη σχηματική παράσταση που ακολουθεί (Σχήμα 5) απεικονίζεται όλη η διαδικασία μιας πλήρους καλλιέργειας κοπράνων.





# Καλλιέργεια κοπράνων πλήρης:

Δείγμα: Σε βαμβακοφόρο στυλεό από το ορθό ή από πρόσφατη κένωση μέσα σε υλικό μεταφοράς Stuart.

**Εμβολιασμός (Σπορά):** Σε 6 θρεπτικά υλικά κατά το Σχήμα 5 (σελ. 27). Από τον ζωμό σεληνίτη μετά από 4ωρη επώαση στους 37° C, ανακαλλιέργεια σε ΕΜΒ. Όλα τα τρυβλία επωάζονται στους 37° C για 24 ώρες.

**Ανάγνωση:** Στο **Mc Conkey No 3** αναγνωρίζονται οι αποικίες κολοβακτηριδίου (Ε. Coli) και γίνεται οροσυγκόλληση με ειδικούς αντιορούς, όταν πρόκειται για κόπρανα βρεφών και νεογνών.

Στο **DCA** αναζητούνται άχρωμες αποικίες σαλμονελλών και σιγγελλών καθώς και στο **EMB** ανακαλλιέργειας από το ζωμό σεληνίτη. Οι άχρωμες αποικίες ανακαλλιεργούνται σε κοινό άγαρ και την επόμενη ή αυθημερόν εφόσον είναι πολλές, γίνονται δοκιμές συγκόλλησης με ορούς σαλμονελλών και σιγγελλών.

Στο **θρεπτικό άγαρ** αναγνωρίζονται εύκολα ο πρωτέας από τον ερπυσμό και η ψευδομονάδα από το γαλαζοπράσινο χρώμα.

Στο **Chapman** αναγνωρίζονται οι πορτοκαλί αποικίες του χρυσίζοντα σταφυλόκοκκου και γίνεται δοκιμή παραγωγής κοαγκουλάσης. Συνήθως το τρυβλίο αυτό διαβάζεται μετά 48ωρο.

Στο **Sabouraud** αναγνωρίζονται οι αποικίες των Candida (μύκητες). Γίνεται δοκιμή παραγωγής χλαμυδοσπορίων (σε καλλιέργεια στους  $20^{\circ}$  C).

Στα μικρόβια που συγκολλήθηκαν με ορούς σαλμονελλών ή σιγγελλών μπαίνουν απαραίτητα και βιοχημικές δοκιμασίες κατά προτίμηση με ΑΡΙ. Σε κάθε αξιολογήσιμο μικρόβιο γίνεται αντιβιόγραμμα (τεστ ευαισθησίας στα αντιβιοτικά).

# Μικρόβια εντεροπαθογόνα στα κόπρανα

Πάντοτε παθογόνα	Ευκαιριακά παθογόνα
Σαλμονέλες και αριζόνες	Χρυσίζων σταφυλόκοκκος
Σιγγέλλες	Κιτροβακτηρίδια
Εσχερίχιες, εντεροπαθογόνοι ορότυποι	Κλεμπσιέλλες
(μόνο για παιδιά κάτω των 2 ετών)	Πρωτείς
Δονάκια χολέρας, παρααιμολυτικά κ.ά.	Ψευδομονάδες
	Κοινά κολοβακτηρίδια εντεροτοξινογόνα
	Κάντιντες-Γεώτριχα
	Κλωστηρίδια, Καμπυλοβακτηρίδια κ.ά.



Εικόνα: 8 Ε. Coli



Εικόνα: 9 Pseudomonas aeruginosa

### <u>ΚΕΦΑΛΑΙΟ VII</u>

# Η. Καλλιέργεια κολπικού:

Η (Γενική) καλλιέργεια κολπικού εκκρίματος γίνεται σε χρόνια κολπίτιδα (λευκόρροια) μόνο εφόσον από την απλή μικροσκοπική εξέταση διαπιστωθεί ότι υπάρχουν άφθονα πυοσφαίρια και αποκλεισθεί η (οξεία) κολπίτιδα από τριχομονάδες και μύκητες. Επίσης μπορεί να γίνει σε περίπτωση σηπτικής αποβολής, οπότε θα εξεταστεί σαν πύο τραύματος και σε περίπτωση τραχηλίτιδας.

Λήψη: Το έκκριμα λαμβάνεται στο Μικροβιολογικό εργαστήριο ή σε εξωτερικό γυναικολογικό ιατρείο από έμπειρο άτομο. Προηγείται τοπικό πλύσιμο από την εξεταζόμενη με ζεστό νερό και σαπουνάδα. Δεν πρέπει να γίνει ενδοκολπική πλύση, ή χρήση αλοιφών και αντισηπτικών. Χρησιμοποιούνται τρεις βαμβακοφόροι στυλεοί:

- 1<sup>ος</sup> στυλεός + 1 ml φυσιολογικό ορό (για τριχομονάδες και πυοσφαίρια)
- 2<sup>ος</sup> στυλεός + υλικό μεταφοράς κοινών παθογόνων (Stuart) (για καλλιέργεια)
- $3^{o\varsigma}$  στυλεός σε κοινό στείρο σωληνάριο (για μικροσκοπικό παρασκεύασμα και χρώση Gram)

Η λήψη γίνεται από τον οπίσθιο θόλο του κόλπου (κολπικό έκκριμα), τον τράχηλο (ενδοτραχηλικό) και τους βαρθολίνειους αδένες.

Το παραπεμπτικό της εξέτασης πρέπει να αναγράφει τις απαραίτητες κλινικές πληροφορίες (π.χ πρόβλημα στειρότητας, αποβολές, παλίνδρομες κυήσεις, υπερέκκριση κ.ά.).

Η λήψη ενδοτραχηλικού ή ουρηθρικού εκκρίματος, γίνεται πριν από την ούρηση ή εφόσον έχει προηγηθεί ούρηση 3-4 ώρες πριν τη λήψη. Χρησιμοποιούνται βαμβακοφόροι στυλεοί ανάλογα με την ένδειξη:

- 1<sup>ος</sup> στυλεός για γονόκοκκο
- 2<sup>ος</sup> στυλεός για αναερόβια (ενδοτραχηλικό έκκριμα)
- 3<sup>ος</sup> στυλεός για κοινά αερόβια
- 4<sup>ος</sup> στυλεός για μυκοπλάσματα
- 5<sup>ος</sup> στυλεός για χλαμύδια (αποφυγή βλέννης)

Η γενική καλλιέργεια του κολπικού εκκρίματος περιλαμβάνει τις εξής φάσεις:

- Λήψη του δείγματος
- Μικροσκοπική εξέταση
- Εμβολιασμός σε θρεπτικά υλικά και επώαση
- Ανάγνωση, αναγνώριση και απομόνωση παθογόνων μικροβίων
- Αξιολόγηση και έκθεση αποτελέσματος

Μικροσκοπική εξέταση: Γίνεται νωπό παρασκεύασμα (λίγο έκκριμα σε μια σταγόνα Φ.Ο.) και ξηρό το οποίο βάφεται κατά Gram.

Στο νωπό αναζητούνται πυοσφαίρια και τριχομονάδες. Αν βρεθούν τριχομονάδες, δεν προχωρά η γενική καλλιέργεια και δίνεται θεραπεία για τις τριχομονάδες. Αν δεν βρεθούν πυοσφαίρια, θα αναβάλλουμε την εξέταση για μια φάση με έξαρση της κολπίτιδας.

Στο βαμμένο κατά Gram αναζητούνται πάλι πυοσφαίρια αλλά και βλαστοσπόρια και ψευδομυκητύλλια της Candida. Αν βρεθεί Candida, η καλλιέργεια θα γίνει και σε Sabouraud για την απομόνωση και ταυτοποίηση

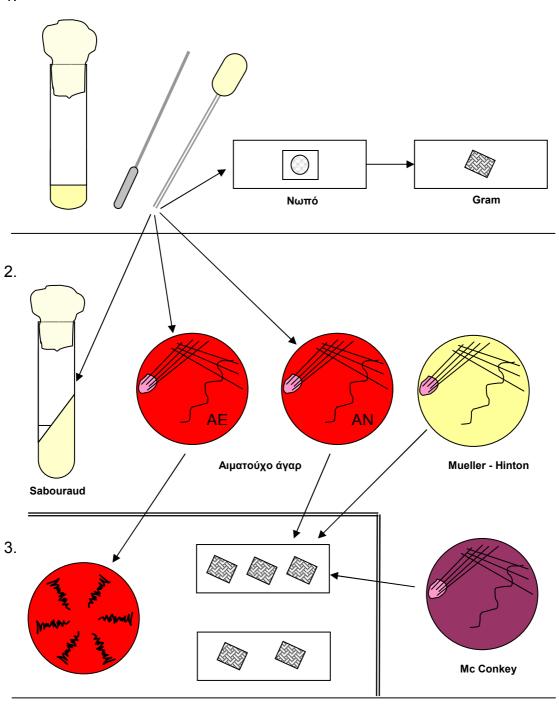
του μύκητα. Επίσης με τη μικροσκοπική εξέταση αποκτούμε μια γενική εικόνα του μικροβιακού πληθυσμού.

# Καλλιέργεια: (Σχήμα 6)

Τα θρεπτικά υλικά που μπορεί να χρησιμοποιηθούν για την καλλιέργεια κολπικού είναι: Σοκολατόχρωμο άγαρ, Thayer-Martin, Mueller-Hinton με βανκομυσίνη, κολιστίνη και νυστατίνη (VCN), Αιματούχο άγαρ, Mc Conkey άγαρ Ν° 2, Sabouraud, ζωμός κρέατος.

Σχήμα 6

1.



# Θ. Καλλιέργεια προστατικού – ουρηθρικού εκκρίματος:

Η καλλιέργεια προστατικού ή ουρηθρικού εκκρίματος, γίνεται κυρίως στις περιπτώσεις οξείας ή χρόνιας φλεγμονής (προστατίτιδα ή ουρηθρίτιδα), που οφείλεται σε κοινά παθογόνα μικρόβια. Όταν αναζητείται γονόκοκκος, η λήψη του δείγματος γίνεται από τον Μικροβιολόγο στο εργαστήριο μετά από τοπικό καθαρισμό με αποστειρωμένο φυσιολογικό ορό, αφού αναβλύσει έκκριμα αυτόματα ή μετά από ελαφριά μάλαξη. Το έκκριμα λαμβάνεται με κρίκο αποστειρωμένο και κατ ευθείαν επιστρώνεται σε θρεπτικό υλικό για γονόκοκκο (Thayer-Martin ή Muller-Hinton με VCN) και στη συνέχεια γίνονται παρασκευάσματα (νωπό και ξηρό κατά Gram).

# **Λήψη προστατικού υγρού:** (κατά Stamey – Mears)

Γίνεται για τη διάγνωση προστατίτιδας και τη διαφοροποίηση της από φλεγμονές της έξω ουρήθρας ή της βαλάνου και της πόσθης αφενός και της ανώτερης ουροφόρου οδού αφετέρου, ενώ σε συνδυασμό με καλλιέργεια σπέρματος γίνεται αξιολόγηση για ύπαρξη επιδιδυμίτιδας ή ορχίτιδας. Πρέπει να υπάρχει αποχή για 5 ημέρες και ο εξεταζόμενος να προσέλθει στον ειδικό ιατρό το πρωί μετά από καλό πλύσιμο των έξω γεννητικών οργάνων χωρίς να έχει ουρήσει.

Λαμβάνονται τρία δείγματα ούρων (VB<sub>1</sub>, VB<sub>2</sub> και VB<sub>3</sub>) και ένα δείγμα προστατικό υγρό ως εξής:

 $VB_1$ : Σε αποστειρωμένο σωληνάριο λαμβάνονται οι πρώτες σταγόνες των ούρων (0,5 ml ούρα).

**VB<sub>2</sub>:** Σε άλλο αποστειρωμένο σωληνάριο λαμβάνονται τα επόμενα 5,0 ml ούρων (και η κύστη παραμένει γεμάτη).

**Προστατικό υγρό:** Σε αποστειρωμένο τρυβλίο ή ποτήρι λαμβάνονται μερικές σταγόνες προστατικό υγρό με δακτυλική μάλαξη του προστάτη.

**VB<sub>3</sub>:** Σε τρίτο αποστειρωμένο σωληνάριο λαμβάνονται μετά τη μάλαξη του προστάτη, άλλα 2-3 ml ούρα και τα υπόλοιπα απορρίπτονται.

Ακολουθεί ο εμβολιασμός των δειγμάτων στα κατάλληλα θρεπτικά υλικά για κάθε αναζητούμενο μικρόβιο.

### Λήψη ουρηθρικού εκκρίματος:

Λαμβάνεται στο εργαστήριο η πρώτη πρωινή σταγόνα ουρηθρικού εκκρίματος, χωρίς να έχει προηγηθεί πλύσιμο της ουρήθρας (πέους) και χωρίς ο εξεταζόμενος να έχει ουρήσει τις τελευταίες 3-4 ώρες.

Η λήψη γίνεται με λεπτό κρικοφόρο (αποστειρωμένο μιας χρήσεως στυλεό) ή βαμβακοφόρο στυλεό και είτε εμβολιάζεται αμέσως είτε τοποθετείται σε υλικό μεταφοράς (Stuart). Γίνεται είσοδος του στυλεού 1-2 cm μέσα στην ουρήθρα και περιστρέφεται ελαφρά. Για ειδικές καλλιέργειες (τριχομονάδες, μυκοπλάσματα, χλαμύδια κ.ά.) απαιτείται συνεννόηση με το εργαστήριο. Για γονόκοκκο πρέπει να γίνει άμεσος εμβολιασμός στα κατάλληλα θρεπτικά υλικά και τίθεται για επώαση σε ατμόσφαιρα CO<sub>2</sub>.

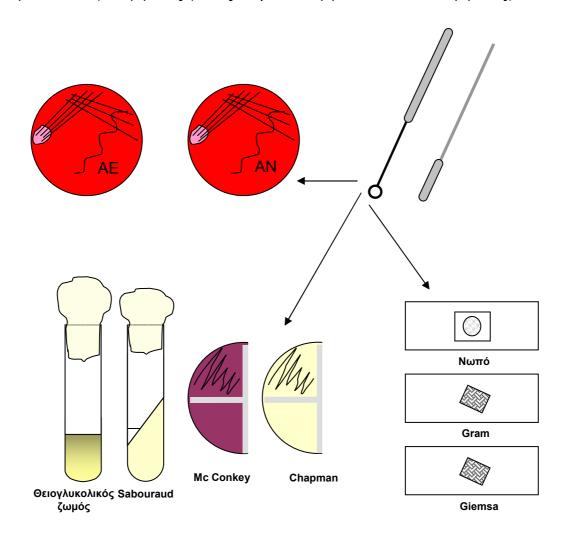
# <u>Καλλιέργεια ουρηθρικού:</u> (ή προστατικού) (Σχήμα 7)

Θρεπτικά υλικά:

- Αιματούχο άγαρ (δύο τρυβλία ένα για αερόβιο και ένα για αναερόβιο επώαση)
- Chapman
- Sabouraud
- Σοκολατόχρωμο ή άγαρ Herella

Θειογλυκολικός ζωμός (ή ζωμός με εκχύλισμα κρέατος)
 Σχήμα 7

Εμβολιασμός, επώαση και ανάγνωση καλλιέργειας ουρηθρικού (ή προστατικού) εκκρίματος (όπως στην καλλιέργεια κολπικού εκκρίματος).



**Δείγμα:** Παίρνεται με κρίκο (αν υπάρχει αρκετό έκκριμα), αλλιώς με βαμβακοφόρο στυλεό μέσα από την ουρήθρα. Μεταφέρεται ποσότητα σε αντικειμενοφόρες πλάκες και γίνονται τρία παρασκευάσματα (νωπό, Gram, Giemsa).

**Εμβολιασμός:** Κατ ευθείαν σε δύο τρυβλία αιματούχο άγαρ (το ένα για αναερόβια επώαση) σε Mc Conkey, σε Sabouraud. Αν δεν υπάρχουν ευκολίες για αναερόβια επώαση, ο εμβολιασμός γίνεται στον θειογλυκολικό ζωμό.

### <u>ΚΕΦΑΛΑΙΟ VIII</u>

### Ι. Καλλιέργεια πύου:

Το πύο εξετάζεται σαν υλικό χωρίς χλωρίδα, όπως το αίμα και το Ε.Ν.Υ., εφόσον πάρθηκε από κλειστή κοιλότητα με παρακέντηση ή μετά από χειρουργική διάνοιξη.

Πύο από συρίγγιο ή από απόστημα που παροχετεύεται, επιμολύνεται από μικρόβια του δέρματος και του περιβάλλοντος και θα εξετασθεί ανάλογα. Λήψη πύου: Το πύο παίρνεται αναλόγως της φλεγμονής με παρακέντηση ή διάνοιξη χειρουργική (από τις παρυφές της κοιλότητας), φροντίζοντας να προφυλάξουμε το δείγμα όσο είναι δυνατό από επιμολύνσεις με μικρόβια του δέρματος και του περιβάλλοντος.

Γίνεται τοπική αντισηψία στο σημείο παρακέντησης και με σύριγγα από την οποία έχουμε αφαιρέσει όλο τον αέρα (όπως στα αέρια αίματος) παίρνουμε 1-2 ml πύο και φράσσουμε το άνοιγμα της βελόνας καρφώνοντας την σε ελαστικό πώμα. Αν δεν υπάρχει πολύ υλικό, η λήψη γίνεται με βαμβακοφόρο στυλεό που τον βάζουμε σε υλικό Stuart ή για αναερόβια, ή ακόμη με λεπτή βελόνα και στέλνεται σε αποστειρωμένο σωληνάριο στο εργαστήριο.

Το δείγμα πρέπει να έλθει στο εργαστήριο σε μισή ώρα, αν προβλέπεται καθυστέρηση χρησιμοποιείται ειδικό φιαλίδιο για αναερόβια.

Λήψη υλικού τραύματος, από επιφανειακά εγκαύματα κ.λ.π: Γίνεται καθαρισμός με φυσιολογικό ορό. Δεν πρέπει να έχουν χρησιμοποιηθεί αντισηπτικά ή αλοιφές. Η λήψη γίνεται με βαμβακοφόρο στυλεό με πίεση στην ύποπτη περιοχή. Αν η καλλιέργεια είναι αρνητική ή δώσει σαπρόφυτα, ζητάμε 2° και 3° δείγμα.

# Γενική καλλιέργεια πύου ή υγρών παρακεντήσεως:

- Α. Από το δείγμα (αυτούσιο ή συντηρημένο σε υλικό Stuart ή ίζημα προκειμένου για υγρά παρακεντήσεως) μεταφέρονται:
- B. 1) Σε τρεις αντικειμενοφόρες πλάκες για μικροσκοπική εξέταση (χρώσεις Gram, Giemsa και Ziehl-Neelsen αν χρειασθεί)
  - 2) Σε ένα τρυβλίο με αιματούχο άγαρ για αερόβια ανάπτυξη
  - 3) Σε ένα δεύτερο τρυβλίο με αιματούχο άγαρ για αναερόβια ανάπτυξη
  - 4) Σε ένα σωληνάριο με θειογλυκολικό ζωμό ή ζωμό με εκχύλισμα κρέατος (για ανακαλλιέργεια σε περίπτωση αρνητικών καλλιεργειών στα τρυβλία)
- Γ. Μετά 24ωρη επώαση στους 37° C αναζητούνται στα τρυβλία αποικίες μικροβίων, γίνεται μικροσκοπική εξέταση από κάθε είδος αποικίας και προχωρούμε στην απομόνωση και ταυτοποίηση του μικροβίου.
- Δ. Αν δεν παρατηρηθεί ανάπτυξη αποικιών στα τρυβλία, θα γίνει ανακαλλιέργεια από το ζωμό σε δύο τρυβλία αιματούχου άγαρ για αερόβια και αναερόβια ανάπτυξη και σ αυτά θα αναζητηθούν αποικίες μετά από 24ωρη επώαση. Ταυτόχρονα θα ξαναεπωασθούν και τα τρυβλία της πρωτοκαλλιέργειας. Στο σχήμα 8 παριστάνεται η περίπτωση ανάπτυξης αναερόβιου μικροβίου στην ανακαλλιέργεια από το ζωμό.

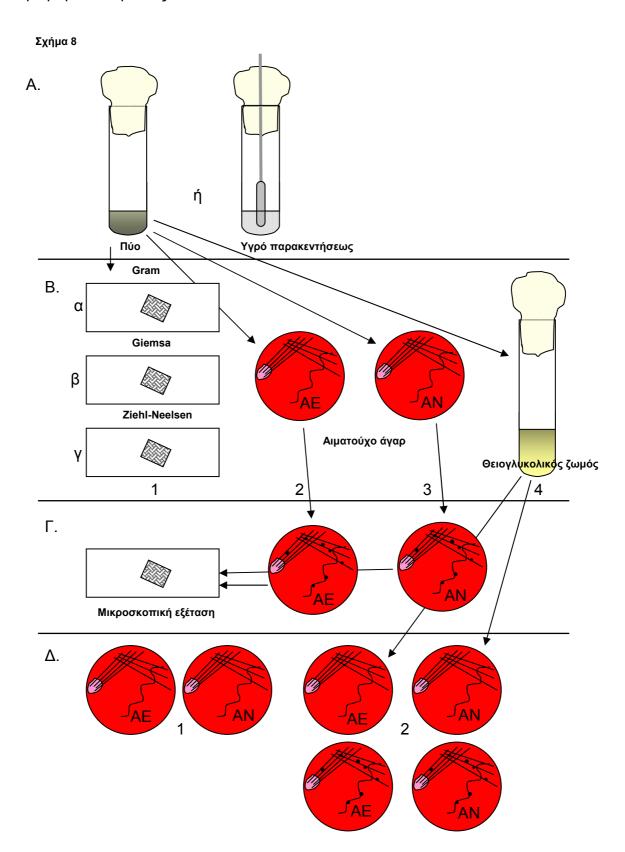
Τα συχνότερα αερόβια μικρόβια που εύκολα ταυτοποιούνται και βρίσκονται στο πύο είναι τα εξής:

**Χρυσίζων σταφυλόκοκκος, β-αιμολυτικός στρεπτόκοκκος** Α ομάδας, **πνευμονιόκοκκος**, **ψευδομονάδα κυανίζουσα** (στο πύο ωτίτιδας, σε

πυώδεις φλεγμονές μετεγχειρητικών τραυμάτων, εγκαυμάτων κ.ά.), κολοβακτηρίδια και κλεμπσιέλλες (βρίσκονται σε μολύνσεις χειρουργικών τραυμάτων της κοιλιάς, στο πύο ομφαλίτιδας κ.ά).

**Προβιντένσιες** (βρίσκονται στο πύο εγκαυμάτων και μολυσμένων τυχαίων τραυμάτων), **πρωτείς**, κ.ά.

Η ταυτοποίηση των μικροβίων γίνεται με τις κατάλληλες για κάθε μικρόβιο δοκιμασίες.



### ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΙΧ

### Κ. Δοκιμή ευαισθησίας στα αντιβιοτικά:

(test ευαισθησίας – αντιβιόγραμμα)

Γίνεται για την μελέτη της ευαισθησίας των μικροβίων στα αντιβιοτικά, με την παρατήρηση των ζωνών αναστολής ανάπτυξης της ανάπτυξης τους, που προκαλούνται με την τοποθέτηση συγκεκριμένης ποσότητας αντιβιοτικών πάνω σε κατάλληλα ενοφθαλμισμένο θρεπτικό υλικό (ενοφθαλμισμός σε όλη την επιφάνεια). Η διάμετρος της ζώνης αναστολής εξαρτάται από την ευαισθησία του μικροβίου στο αντιβιοτικό.

### Τεχνική:

# Α. Μέθοδος δίσκων:

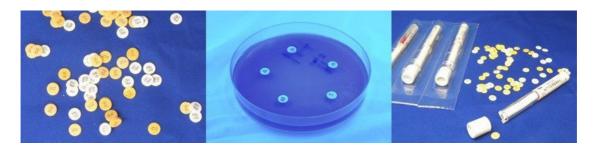
Θρεπτικά υλικά: α. Mueller-Hinton

β. Αιματούχο άγαρ κυρίως για τον εντερόκοκκο

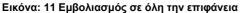
Υλικό αραίωσης αποικιών: Trypticase Soy Broth (3-10 αποικίες σε 4 ml)

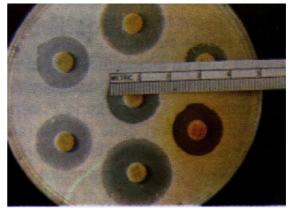
- Επώαση στους 37° C για 2 5 ώρες μέχρι να εμφανισθεί μέτρια θολερότητα στο ζωμό
- Ομοιόμορφη επίστρωση του καλλιεργήματος του ζωμού σε όλη την επιφάνεια του άγαρ (Mueller-Hinton κ.λ.π) με μια από τις μεθόδους εμβολιασμού σε όλη την επιφάνεια (βλ. σημειώσεις Μικροβιολογίας Ι)
- Παραμονή 5 min και τοποθέτηση των δίσκων των αντιβιοτικών με χρήση μεταλλικής λαβίδας που αποστειρώνεται κάθε φορά σε γυμνή φλόγα ανά 3 cm
- Επώαση στους 37° C για 18 24 ώρες
- Μέτρηση διαμέτρου της ζώνης αναστολής

Εικόνα: 10 Διάφοροι δίσκοι με αντιβιοτικά στη συσκευασία τους (σωληνάρια)









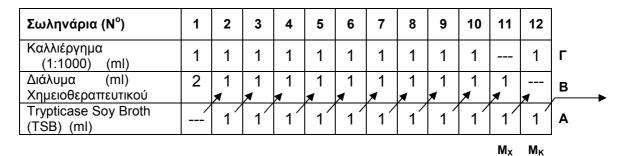
Εικόνα: 12 Μέτρηση της διαμέτρου της ζώνης αναστολής

# Β. Μέθοδος αραιώσεων σε σωληνάρια:

Η μέθοδος αυτή δεν αποτελεί καθημερινή πράξη στο διαγνωστικό εργαστήριο, αλλά χρησιμοποιείται για να προσδιορισθεί με ακρίβεια η ελάχιστη πυκνότητα του χημειοθεραπευτικού η οποία αναστέλλει ή σκοτώνει έναν μικροοργανισμό.

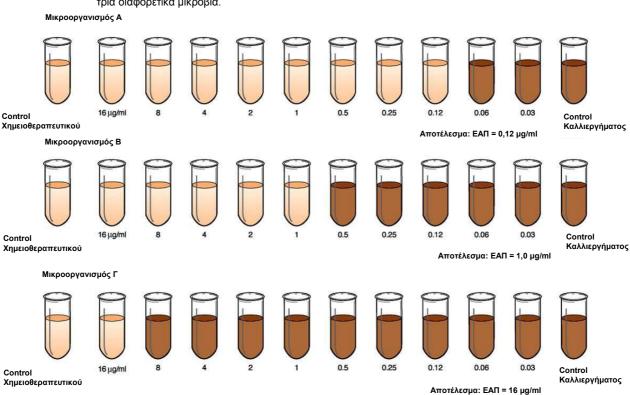
### Τεχνική:

- Αραίωση του εξεταστέου στελέχους σε Trypticase Soy Broth (TSB) και επώαση στους 37° C για 18 – 24 ώρες.
- Αραίωση του καλλιεργήματος αυτού 1:1000 σε TSB (10<sup>5</sup> 10<sup>6</sup> ζωντανά κύτταρα/ml)
- Τοποθετούμε σε στατώ 12 μικρά αποστειρωμένα σωληνάρια



**M**<sub>X</sub>=Μάρτυρας Χημειοθεραπευτικού **Μ**<sub>κ</sub>=Μάρτυρας Καλιεργήματος

Σχήμα 9 Σχηματική παράσταση ευαισθησίας στα αντιβιοτικά με τη μέθοδο των αραιώσεων σε σωληνάρια για τρία διαφορετικά μικρόβια.



ΕΑΠ = Ελάχιστη Ανασταλτική Ποσότητα (πρώτο σωληνάριο χωρίς θολερότητα), δηλαδή ελάχιστη ποσότητα αντιβιοτικού που αναστέλλει την ανάπτυξη του μικροοργανισμού.

- Επώαση στους 37° C για 18 24 ώρες
- Έλεγχος των σωληναρίων για θολερότητα
- Ανακαλλιέργεια από το σωληνάριο με την ελάχιστη ανασταλτική πυκνότητα (ΕΑΠ) πρώτο χωρίς θολερότητα) σε Trypticase Soy Agar
- Επώαση για 18 24 ώρες στους 37° C
- Δεν πρέπει να αναπτυχθούν αποικίες. Αν αναπτυχθούν εμβολιάζουμε από το προηγούμενο.

Η Μέθοδος αραιώσεων σε σωληνάρια μπορεί να είναι χρονοβόρα, πλεονεκτεί όμως σε σχέση με τη μέθοδο των δίσκων στο ότι μπορούμε να προσδιορίσουμε με μεγάλη ακρίβεια την ελάχιστη ποσότητα του αντιβιοτικού που μπορεί να καταπολεμήσει αποτελεσματικά το κάθε μικρόβιο.

Αυτό σημαίνει πως αποφεύγουμε την άσκοπη χρήση των αντιβιοτικών που οδηγεί στην ανάπτυξη ανθεκτικών στελεχών των μικροβίων. Επίσης ένα είδος μικροβίου μπορεί να μεταβάλλει την ευαισθησία του απέναντι σε κάποιο συγκεκριμένο αντιβιοτικό μετά από κάποιες φορές που το έχουμε χρησιμοποιήσει (μειωμένη ευαισθησία)

Τέλος, η χρήση της απολύτως απαραίτητης ελαχίστης ποσότητας, προφυλάσσει τον ασθενή από την τοξικότητα του χημειοθεραπευτικού τις πιθανές ανεπιθύμητες ενέργειες και την αλληλεπίδραση που μπορεί να έχει με άλλα φάρμακα, ιδιαίτερα όταν πρόκειται για βαριά νοσήματα και βεβαρημένη κατάσταση του ασθενούς.

### ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ

- Εμμανουηλίδου Αρσένη, Α., (1967). Μικροβιολογία Κλινική και Εργαστηριακή. Αθήνα: Μακρής, Ι., Α.Ε.
- Εμμανουηλίδου Αρσένη, Α., Καλλιέργειες Μικροβίων στη Διαγνωστική των Λοιμώξεων. Αθήνα: Λεοντιάδης.
- Καλκάνη Μπουσιάκου, Ε., (1996). Γενική Μικροβιολογία. Αθήνα: «ΕΛΛΗΝ»
- Jawetz, E., Melnick, J., Adelberg, E., (1985). Ιατρική Μικροβιολογία. Αθήνα: Παρισιάνος
- Bancroft, J., Stevens, A., (1977). Theory and Practice of Histological Techniques.
   London: Churchill Livingstone

Ν. Ιωνία 1 Νοεμβρίου 2013 Η συγγραφή αυτών των σημειώσεων έχει ιδιαίτερη συναισθηματική αξία για μένα. Τις αφιερώνω στους Μαθητές μου ως ενθύμιο από το εργαστήριο Με πολύ αγάπη.

