

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, πτύελα, 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 καλλιεργείων, 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

1. 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 (βαμβακοφόροι, 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 *αστεριωμένα*.

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 βαμβακοφόρο στελεό μπαίνουν συνήθως στο υλικό συντήρησης και μεταφοράς Stuart. Υπάρχουν ειδικά υλικά λήψης και συντήρησης αναερόβιων βακτηρίων, καθώς και βακτηρίων σε ατμόσφαιρα CO₂.

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 καλλιιεργειών

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 σπηρίζει 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 θεραπευτικά 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 θεραπευτικά υλικά, εμβολιάζουμε με τη μέθοδο των αραιώσεων, ώστε να λάβουμε μεμονωμένες αποικίες. Ο τρόπος αυτός εφαρμόζεται κυρίως στα κοινά (π.χ. θεραπευτικό άγαρ), στα εμπλουτισμένα (π.χ. αιματούχο άγαρ) και τα διαχωριστικά (π.χ. MacConkey άγαρ) θεραπευτικά υλικά. Στα εκλεκτικά θεραπευτικά 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 CO₂) 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 θεραπευτικά υλικά, και τις κατάλληλες συνθήκες επώασης.

IV. ΑΝΑΓΝΩΣΗ ΤΩΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ - ΑΝΑΖΗΤΗΣΗ ΥΠΟΠΤΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ

Μετά την επώαση αναζητούμε στην επιφάνεια των στερεών θεραπευτικών 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. περιγεγραμμένα, 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.

Ο
Ι
Ρ
Η
Τ
Σ
Α
Λ
Ε
Ρ

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. Επιάζουμε 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 αναπύχθηκαν.

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 διαπύση, 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 σωληνάκια. Αν είναι λίγο ή παχύρρευστο, το παίρνουμε με βαμβακοφόρο στείλεό, 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 αραιώση.

Επώαση: Επωάζονται σε θερμοκρασία 37° C, για 24 ώρες. Το ένα αιματούχο άγαρ σε συνθήκες αναερόβιες και το άλλο μαζί με το σοκολατόχρωμο άγαρ σε ατμόσφαιρα CO₂ 10%. Τα υπόλοιπα υλικά θα επωαστούν σε αερόβιες συνθήκες.

IV. ΑΝΑΓΝΩΣΗ-ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ-ΔΟΚΙΜΗ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑΣ- ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ-ΓΡΑΠΤΗ 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:

Καλλιέργεια πύου, ρινοφαρυγγικού εκκρίματος και πτυέλων

- 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 ηγκτάσης. 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*, Ναϊσέριες, 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 σκώσει το κεφάλι προς τα επάνω και να προφέρει το γράμμα Α. Πιέζουμε τη γλώσσα με γλωσσοπίεστρο και βυθίζουμε το βαμβακοφόρο στειλέο 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*)
- Sabouaud άγαρ (για Μύκητες)

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 Sabouaud 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 επώάζεται σε αναερόβιες συνθήκες και το σοκολατόχρωμο σε ατμόσφαιρα CO₂. 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 Α 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*

Ι. 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 στείλειό από το λάρυγγα ή, εάν είναι δύσκολο και αυτό, με βαμβakoφόρο στείλειό 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

Καλλιέργεια πύου, ρινοφαρυγγικού εκκρίματος και πτυέλων

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 επιστροφή γίνεται ομαλότερη, αν συμπίεσουμε 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.

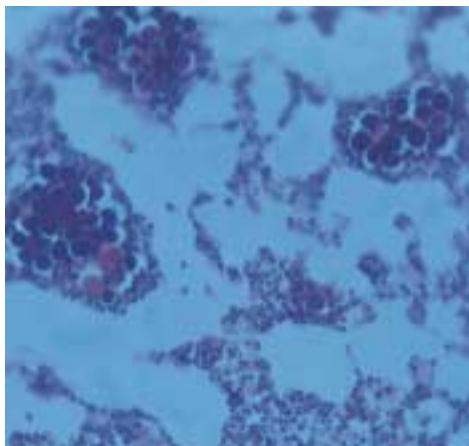
III. ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ

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 CO₂ 10%. Τα υπόλοιπα τρυβλία επωάζονται σε αερόβιες συνθήκες.

IV. ΑΝΑΓΝΩΣΗ - ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ - ΔΟΚΙΜΗ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑΣ - ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ-ΓΡΑΠΤΗ 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 μητροσκόπιου, 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 καλυπτρίδα 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 Γαλακτοβάκιλλοι (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 μυρωδιά ψαριού.

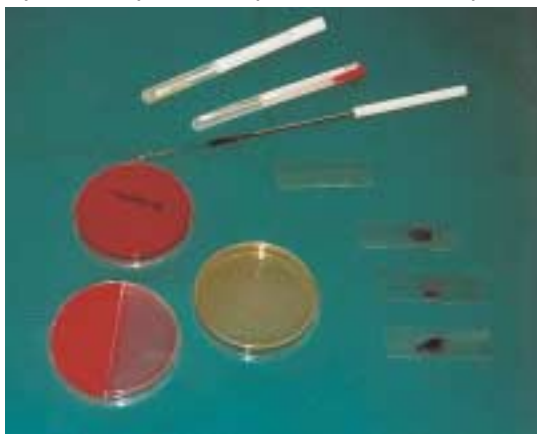
III. ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ

Θρεπτικά υλικά:

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

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

Επώαση: Επωάζουμε σε θερμοκρασία 37° C για 24 ώρες. Το ένα αιματούχο σε ατμόσφαιρα CO₂ 5-10%, το άλλο αιματούχο σε αναερόβιες συνθήκες και τα υπόλοιπα σε αερόβιες.

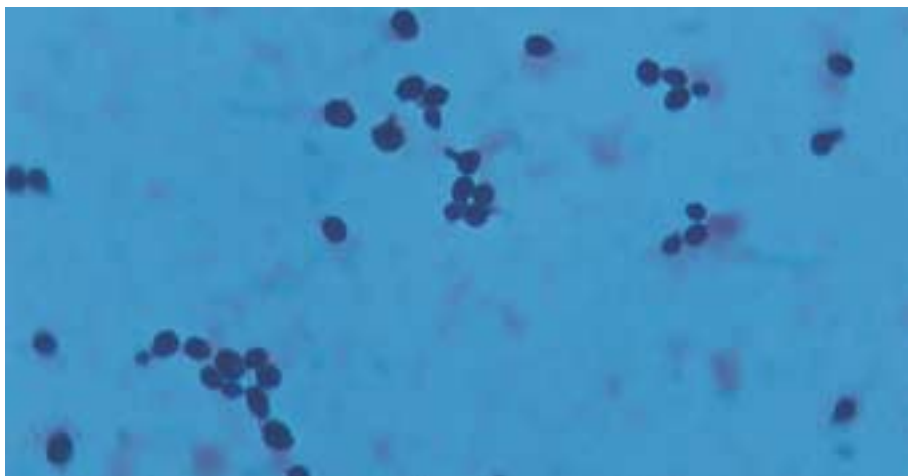


Εικόνα 3.1: Καλλιέργεια κολπικού εκκρίματος

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 Sabouraud 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 αδένα. 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 στειλεό, 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 στειλεό κυλώντας τον πάνω στην αντικειμενοφόρο πλάκα προς τη μια πλευρά, για να μην καταστρέψουμε τα πολυμορφοπύρρηνα 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
- Sabouraud άγαρ (για Μύκητες)

Σπορά: Στο σοκολατόχρωμο και το Sabouraud 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 CO₂ 3-5% και με παρουσία υδρατμών, για τρεις ημέρες. Το ένα αιματούχο σε αναερόβιες συνθήκες και τα υπόλοιπα τρυβλία αερόβια, για 24 ώρες. Το Sabouraud 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 ό μνηών έως ό ετών. Χαρακτηρίζεται από απότομο και έντονο πόνο των αυτιών (ωταλγία), βουπτό (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 ευσταχιανή 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 (Ασπεργίλλοι).

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 CO₂ (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 στειλεό 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 στειλεούς χρησιμοποιούμε, όταν το δείγμα είναι σε πολύ μικρή ποσότητα.

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

II. ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΚΗ ΕΞΕΤΑΣΗ ΑΜΕΣΩΝ ΠΑΡΑΣΚΕΥΑΣΜΑΤΩΝ

Από τον ένα στειλεό 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 κυτάρων (λευκά αιμοσφαίρια, επιθηλιακά κύτταρα κ.ά.) και το σημαντικότερο, θα αναγνωρίσουμε τα κυτταρικά έγκλειστα (που βρίσκονται στη χλαμυδιακή λοίμωξη).

III. ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ

Ο δεύτερος στειλεός 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 CO₂ 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 θεραπευτικά υλικά και ανακαλλιεργούμε το υπόλοιπο μέρος της ύποπτης αποικίας. Τα θεραπευτικά 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^ο 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 Νο 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 πιπέττα αποστειρωμένη ή με μια αυτόματη πιπέττα του 0,01ml ή με κρίκο γνωστής διαμέτρου μεταφέρουμε μια σταγόνα στην επιφάνεια του θρεπτικού υλικού. Με τον κρίκο ή με μια γυάλινη πιπέττα 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 Νο 2, καθώς και με τις βιοχημικές δοκιμασίες:

- *Escherichia coli*: Αποικίες κόκκινες, ινδόλη, MR (++)
- *Klebsiella*: Αποικίες κόκκινες, βλεννώδεις, 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. ΑΝΤΙΒΙΟΓΡΑΜΜΑ

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 νιτροφουραντοΐνη, 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 μικροβιαιμίες 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 άσπρες 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, ρπίνες (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 CO₂ 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 ταχύτατη ανίχνευση της ανάπτυξης βακτηρίων στους ζωμούς των αιμοκαλλιιεργειών. Τα πιο πολλά από αυτά στηρίζονται στη μέτρηση της παραγωγής CO₂ 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 πώμα τους.

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

III. ΑΝΑΓΝΩΣΗ

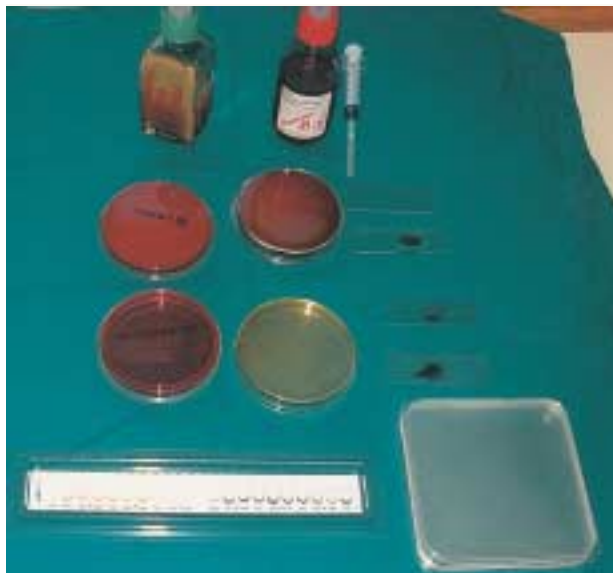
Την επόμενη ημέρα (δεύτερη), χωρίς να ανακινήσουμε τα φιαλίδια, ελέγχουμε αν υπάρχει θολερότητα, υμένιο στην επιφάνεια του ζωμού ή αν ο ζωμός έχει πήξει. Η θολερότητα σημαίνει ότι άρχισε ανάπτυξη κάποιου βακτηρίου, το υμένιο στην επιφάνεια του ζωμού σημαίνει ότι η καλλιέργεια επιμολύνθηκε από κάποιο 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 ENY 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 λογοχειδές, κατά ζεύγη, με έλυτρο που καλύπτει δύο κόκκους μαζί. Αποικίες μικρές με κεντρικό βαθούλωμα σαν πιατόκια. 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 Ναϊσσέριες, στις οποίες το συγκεκριμένο βακτήριο να μην έχει αναπτυχθεί στην καλλιέργεια του ENY.
- *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
περίνεο.
- *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.
- Επιάζουμε 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 λογοχειδείς 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 CO₂ 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 εξοιδήσεως του ελύτρου και βιοχημική ταυτοποίηση.
- *Streptococcus pneumoniae*: Διπλόκοκκοι λογχοειδείς, Gram θετικοί. Αποικίες μικρές με κεντρικό βαθούλωμα σαν πιτάκια. Πράσινη αιμόλυση στο αιματούχο άγαρ και ξάσπρισμα 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 ENY 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 ENY.

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 λεύκωμα 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 περίσφιγξη 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
- Chapman 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 ασκτικό 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 περιτονιτίδων, γι αυτό πρέπει να γίνεται αναερόβια καλλιέργεια σε κάθε δείγμα ασκτικού 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 ζωμό. 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 σπτικές ή άσπτες 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 αραιώση.

Επώαση: Τα τρυβλία επωάζονται σε θερμοκρασία 37° C, για 24 ώρες. Το σοκολατόχρωμο άγαρ σε ατμόσφαιρα CO₂ 10%, το ένα αιματούχο σε φιάλη αναερόβιας καλλιέργειας και τα υπόλοιπα σε αερόβιες συνθήκες.

IV. ΑΝΑΓΝΩΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΟΣ

Την επόμενη ημέρα γίνεται ανάγνωση των καλλιιεργειών. 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 καλλιιεργειών, 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*
- *Hemophilus 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 καλλιιεργειών, 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.

ΟΙ ΕΙΔΙΚΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ

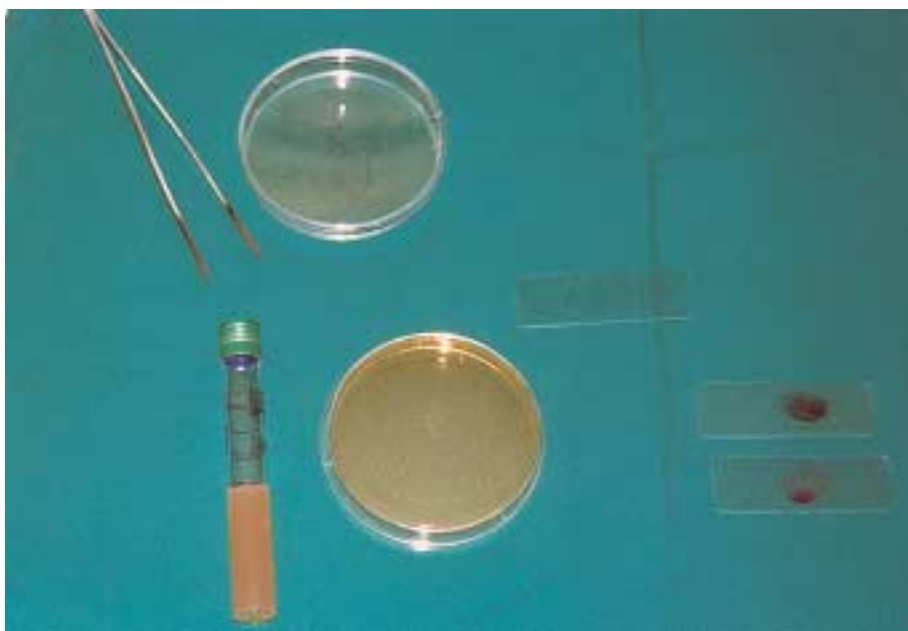
8.1. Γενικά για την καλλιέργεια υλικού δερματικών βλαβών

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, ξεσμάτων 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.

Α. ΔΕΡΜΑ

Η λήψη γίνεται με απόξεση από την περιοχή της βλάβης που συνορεύει με το υγιές δέρμα, αφού καθαρίσουμε την περιοχή αυτή με βαμβακοφόρο στείλει. 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 στείλει.



Εικόνα 8.2: Καλλιέργεια *Candida albicans* σε κοινό και χρωμογόνο Sabouraud άγαρ

Β. 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 πυτρίαση 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 ακτιδίνη, 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° C και η επώασή τους διαρκεί 2-3 ημέρες.

IV. ΑΝΑΓΝΩΣΗ - ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ

Η ανάγνωση των καλλιιεργειών 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° 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*, Κλεμπσιέλλες, 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 στείλεό, 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 **δρεπτικά 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 αραιώση. Τελευταίος εμβολιάζεται ο ζωμός του σελνίτη. Τα τρυβλία επωάζονται σε θερμοκρασία 37⁰ 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 αραιώσης.

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 Κλεμπσιέλλα. 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 καλλιιεργήθηκαν 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 παραμένει μετά την

επώαση 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. Επώάζονται 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: «Αναπύχθηκε *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 αναπύχθηκαν 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 κύστες 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 κύστες 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 Οξύουρους, 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 στείλεό, 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 φορμαλδεΰδη): 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 τροφοζώιτες και χρωματίζονται μαζί με τις κύστες, όπως με το Iugol. Αν στο παρασκεύασμα αυτό προσθέσουμε μια σταγόνα πωσίνης, το κυτταρόπλασμα των τροφοζωϊτών 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.

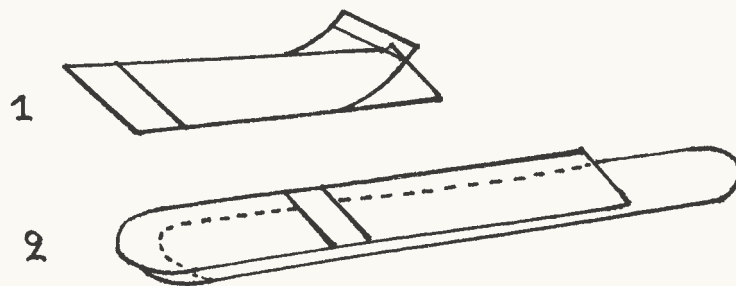
Ειδικές χρώσεις Αμοιβάδων και άλλων πρωτόζωων: Οι Αμοιβάδες των κοπράνων δε χρωματίζονται με τις χρώσεις που χρησιμοποιούνται συνήθως στο αίμα για το χρωματισμό των Πλασμωδίων και των Λεισμανιών (π.χ. Giemsa). Χρειάζονται ειδικές χρώσεις, όπως η χρώση σιδηρούχου αιματοξυλίνης, η τρίχρωμη χρώση (ειδική για την Τριχομονάδα) και η φθορίζουσα χρώση.

IV. ΜΕΘΟΔΟΙ ΕΜΠΛΟΥΤΙΣΜΟΥ ΤΩΝ ΚΟΠΡΑΝΩΝ ΓΙΑ ΩΑΡΙΑ ΚΑΙ ΚΥΣΤΕΙΣ ΠΑΡΑΣΙΤΩΝ

Επειδή ο αριθμός των ωαρίων των σκουληκικών 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. Διπλούμε 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 ΚΑΘΙΖΗΣΗΣ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΚΑΙ ΜΟΝΙΜΟΠΟΙΗΣΗ

- Παρασκευάζουμε εναιώρημα κοπράνων με νερό βρύσης και διηθούμε το εναιώρημα μέσα από βρεγμένη γάζα.
- Φυγοκεντρούμε σε κωνικό σωληνάριο μια ποσότητα του διηθήματος 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 επισιτίζουμε 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.

Υ. 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.
- Ανασπκώνουμε 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 βαμβακοφόρο στειλεό με βαζελίνη και τον βυθίζουμε σε ζεστή λιωμένη παραφίνη. Στη συνέχεια περιμένουμε λίγο να στεγνώσει.
- Με το στειλεό αυτό παίρνουμε το πρωκτικό επίχρισμα ανάμεσα

από τις πρωκτικές πτυχές και ταυτόχρονα λίγο ορθικό επίχρισμα βάζοντας το σπειρό μέσα στο ορθό, περίπου 1 cm. Στην παραφί-νη κολλούν τα ωάρια, τα επιθήλια και υπολείμματα κοπράνων.

- Βυθίζουμε το σπειρό 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 ασφαλείας 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 σπέρτα. 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 πώμα, 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.



Εικόνα 10.3: Συλλογή μολυσματικών απορριμάτων σε ειδικά κιβώτια



Εικόνα 10.4: Ψυγείο απορριμάτων

Όσον αφορά τους εργαζόμενους σε μικροβιολογικά εργαστήρια, οι βασικοί κανόνες προστασίας είναι:

- Να πλένουμε τα χέρια μας με αντισηπτικό διάλυμα, πριν φορέ-

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 121⁰ 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:

