

ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΕΙΣ

ΤΟ ΟΦΘΑΛΜΙΚΟ ΔΕΙΓΜΑ ΣΤΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΤΩΝ ΛΟΙΜΩΞΕΩΝ

ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΓΚΑΝΤΕΡΗΣ

Οι μικροοργανισμοί μπορούν να προσβάλουν οποιοδήποτε τμήμα του οφθαλμού, τα βλέφαρα, τον οφθαλμικό κόγχο, τους περικογχικούς ιστούς, το πρόσθιο τμήμα (επιπεφυκότα, κερατοειδή) και το οπίσθιο τμήμα του οφθαλμού (ενδοφθαλμίτιδα). Αν και συχνά είναι καλοήθειες, ορισμένες λοιμώξεις προσβάλλουν σημαντικά ανατομικά στοιχεία, δομές του οφθαλμού, με επακόλουθο επιπλοκές και καταστροφή της οπτικής λειτουργίας. Η σωστή λήψη και μεταφορά του οφθαλμικού δείγματος, καθώς και η επικοινωνία οφθαλμιάτρου και μικροβιολόγου είναι απαραίτητες προϋποθέσεις για την έγκαιρη και έγκυρη αναζήτηση των υπεύθυνων μικροοργανισμών που προκαλούν τις οφθαλμικές λοιμώξεις.

(Λέξεις κλειδιά: οφθαλμικές λοιμώξεις, οφθαλμικό δείγμα, εργαστηριακή διάγνωση).

Εισαγωγή

Πολλές οφθαλμικές λοιμώξεις εξελίσσονται γρήγορα και μπορεί να απειλήσουν την όραση του ασθενούς, γι' αυτό και πρέπει να αντιμετωπίζονται ως επείγουσες¹ οι εργαστηριακές εξετάσεις που θα οδηγήσουν στη διάγνωση και έγκαιρη έναρξη της θεραπευτικής αγωγής.

Η επικοινωνία και συνεργασία κλινικού μικροβιολόγου και οφθαλμιάτρου επιβάλλεται και διότι το οφθαλμικό δείγμα παρουσιάζει τις ακόλουθες ιδιαιτερότητες:

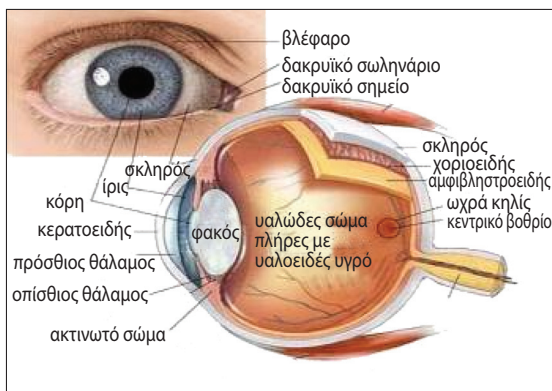
1. Είναι ελάχιστη η ποσότητα του δείγματος.
2. Η λήψη πρέπει να γίνει στο κρεβάτι του ασθενούς.
3. Πρέπει να γίνει άμεσος ενοφθαλμισμός στα κατάλληλα θρεπτικά υλικά.
4. Η μεταφορά των θρεπτικών υλικών να γίνεται αμέσως στο εργαστήριο.

Στην ανασκόπηση αυτή δίνουμε έμφαση στη σωστή λήψη και μεταφορά στο εργαστήριο του οφθαλμικού δείγματος, στην αιτιολογία, την κλινική παρουσίαση, τους παράγοντες κινδύνου και τις εργαστηριακές διαγνωστικές μεθόδους των λοιμώξεων του οφθαλμού.

Θεωρούμε χρήσιμο να παραθέσουμε στοιχεία της ανατομίας του οφθαλμού, για την κατανόηση της εντόπισης των οφθαλμικών λοιμώξεων και τη σωστή λήψη των οφθαλμικών δειγμάτων προς εξέταση (Εικόνα 1).

Οι οφθαλμικές λοιμώξεις διακρίνονται σε:

1. Λοιμώξεις των βλεφάρων
2. Του ρινοδακρυϊκού συστήματος
3. Του επιπεφυκότα
4. Του κερατοειδούς
5. Του οφθαλμικού βολβού (ενδοφθαλμίτιδα, ραγοειδίτιδα) με συχνά καταστροφικά για την όραση αποτελέσματα
6. Των μαλακών μορίων που περιβάλλουν τον οφθαλμό (περικογχικές και κογχικές)



Σχήμα 1. Στοιχεία ανατομίας του οφθαλμού. www.qualityoflife.org.

Γενικές αρχές λήψεως δειγμάτων

Η επικοινωνία και συνεργασία μικροβιολόγου – οφθαλμιάτρου είναι απαραίτητη διότι αρκετές οφθαλμικές λοιμώξεις είναι απειλητικές για την όραση του ασθενούς και απαιτούν αναγραφή της προέλευσης του δείγματος (Πίνακας 1). Σημαντικά στοιχεία για τη σωστή αξιολόγηση της εξέτασης του οφθαλμικού δείγματος είναι η πιθανή λοίμωξη καθώς και ο τρόπος λήψεως του δείγματος.

Η λήψη πρέπει να γίνεται πριν την αντιμικροβιακή αγωγή και την ενστάλαξη αναισθητικών.

Η σήμανση του είδους δείγματος και η αναγραφή των στοιχείων του ασθενούς είναι επιβε-

βλημένη. Το συνοδευτικό παραπεμπτικό πρέπει να περιλαμβάνει τα στοιχεία του ασθενούς, καθώς και του ιατρού που παραγγέλλει την καλλιέργεια, με τηλέφωνο επικοινωνίας, σύντομο ιστορικό (ανοσοκαταστολή, διαβήτη, αγγειοπάθειες, λήψη αντιβιοτικών, κλινική διάγνωση).

Τα κατάλληλα υλικά μεταφοράς είναι απαραίτητα για να επιβιώσουν τα απαιτητικά βακτήρια όπως ο γονόκοκκος και ο αιμόφιλος.

Η άμεση χρώση Gram παρασκευάσματος του οφθαλμικού δείγματος πρέπει να εκτελείται πάντα και να ενημερώνεται αμέσως ο υπεύθυνος για τον ασθενή οφθαλμίατρος γιατί προσφέρει πολύ σημαντική βοήθεια στην έγκαιρη εμπειρική θεραπεία.

Δείγματα από τις συχνότερες οφθαλμικές λοιμώξεις

α) Για τη διάγνωση της *επιπεφυκίτιδας* λαμβάνονται ξέσματα από τον επιπεφυκότα ή επίχρισμα με στυλεό Dacron και κατάλληλο υλικό μεταφοράς. Ο στυλεός διαβρέχεται με θειογλυκολικό ζωμό, περιστρέφεται στην περιοχή της λοίμωξης του επιπεφυκότα, ώστε να συλλεγεί αρκετό δείγμα (ο χρόνος ενοφθαλμισμού στα θρεπτικά υλικά δεν πρέπει να υπερβαίνει τις 3 ώρες).

β) Το δείγμα στη *δακρυοκυστίτιδα και λοίμωξη δακρυϊκών σωληναρίων* συλλέγεται με στυλεό ή με αναρρόφηση του εκκρίματος (μετά δακτυλική πίεση στην έσω πλευρά του βλεφάρου)³.

Πίνακας 1. Κατάταξη οφθαλμικών δειγμάτων² αναλόγως της προέλευσής των.

Δείγματα από περιοχές με φυσιολογική χλωρίδα	Δείγματα από περιοχές χωρίς χλωρίδα
Από βλέφαρα (επίχρισματα)	Δείγματα κερατοειδούς (ξέσματα και επίχρισματα με στυλεό)
Από επιπεφυκότα	Ενδοφθάλμια δείγματα
Εκκρίσεις του δακρυϊκού συστήματος	Φακοί
	Υδατοειδές υγρό
	Υαλοειδές υγρό
	Ίρις, αμφιβληστροειδής, σκληρός
	Δείγματα ληφθέντα χειρουργικώς (βιοψίες)
	Δείγματα μεταμόσχευσης
	Ιστοί
	Ξένα σώματα
	Δείγματα ληφθέντα με χρήση βελόνης
	Δείγματα περικογχικά και κογχικά

γ) Για τη διάγνωση της *κερατίτιδας* λαμβάνονται ξέσματα του έλκους του κερατοειδούς με αποστειρωμένη σπάτουλα Kimura.

δ) Κατάλληλο δείγμα για τη διάγνωση της *ενδοφθαλμίτιδας* είναι κυρίως το υαλοειδές υγρό (λαμβάνεται από τον οφθαλμίατρο με παρακέντηση του υαλώδους σώματος) (χρόνος ενδοφθαλμισμού ≤ 30 min) και κατά δεύτερο λόγο το υδατοειδές υγρό το οποίο λαμβάνεται με παρακέντηση του προσθίου θαλάμου του οφθαλμού.

ε) Σε περιπτώσεις *περικογχικής και κογχικής κυτταρίτιδας*, αν υπάρχει ανοικτό τραύμα προηγείται αντισηψία με οινόπνευμα 70%, βάμμα ιωδίου (που παραμένει για 1 min) και πάλι οινόπνευμα 70%. Εκτελείται αναρρόφηση και συλλογή του εκκρίματος ή βιοψία.

Σε κλειστό τραύμα: εκτελείται διάνοιξη και λήψη του υλικού με αναρρόφηση.

Σε όλες τις καλλιέργειες οφθαλμικών δειγμάτων επιβάλλεται η λήψη επιχρίσματος και του υγιούς επιπεφυκότα (ως καλλιέργεια ελέγχου). Η γνώση της φυσιολογικής χλωρίδας του επιπεφυκότα είναι απαραίτητη για τη σωστή αξιολόγηση των καλλιέργειών των οφθαλμικών δειγμάτων (Πίνακας 2).

Βλεφαρίτιδες

Η βλεφαρίτιδα είναι χρόνια φλεγμονώδης διεργασία του χείλους των βλεφάρων. Τα αίτια της βλεφαρίτιδας αναγράφονται στον Πίνακα 3.

Συνυπάρχουσες διαταραχές είναι: η σταφυλοκοκκική λοίμωξη, η σημηγατόρροια (seborrhea), η ροδόχρους ακμή (rosacea), ο ξηρός οφθαλμός, και οι ανωμαλίες των μείβομιανών αδένων (meibomian) και των λιπιδών εκκρίσεών τους. Μπορεί να αναπτυχθεί χαλάζιο. Ο ρόλος του *S. aureus* και CNS είναι αμφίβολος, επειδή μπορούν να καλλιεργηθούν από το χείλος των βλεφάρων υγιών ατόμων σε 10-35% και 90-95%, αντίστοιχα, και γιατί σε υψηλό ποσοστό παρατηρείται αποτυχία μετά την κατάλληλη αντιβιοτική θεραπεία⁴.

Η ροδόχρους ακμή (rosacea) συνδέεται με βλεφαρίτιδα. Τα βλέφαρα συχνά αποικίζονται από *S. aureus*, χωρίς να είναι σαφές γιατί ασθενείς με rosacea είναι περισσότερο ευπαθείς στον αποικισμό αυτό.

Πίνακας 2. Φυσιολογική χλωρίδα επιπεφυκότα.

Μικροοργανισμοί	Συχνότητα %
<i>Staphylococcus Co (-)</i>	75-90
<i>Corynebacterium spp</i>	20-75
<i>Propionibacterium acnes</i>	50-70
<i>Staphylococcus aureus</i>	10-30
<i>Streptococcus spp</i>	2-10
<i>Moraxella spp</i>	2-5
<i>Haemophilus influenzae</i>	2-5
Gram αρνητικά βακτηρίδια	0-5
Μύκητες	0-5

Λοιμώξεις του δακρυϊκού συστήματος

Το δακρυϊκό σύστημα (Εικόνα 2) αποτελείται από τα δακρυϊκά σωληνάκια (canaliculi), το δακρυϊκό ασκό ή σάκο και τους ρινοδακρυϊκούς πόρους (ducts) διαμέσου των οποίων τα δάκρυα ρέουν από τα μάτια στη ρινική κοιλότητα. Η φλεγμονή των πόρων (canalculitis) οφείλεται σε *A. israelii*, *A. odontolyticus*, *Fusobacterium spp* *Nocardia spp*, *Streptococci*.

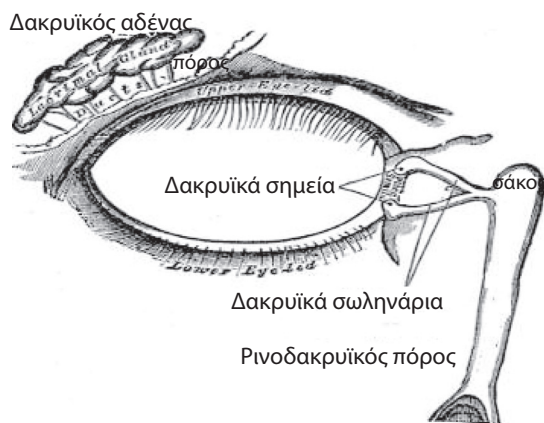
Διάγνωση: 1. Άμεση χρώση Gram παρασκευασμάτων από πυώδες δείγμα (αποβάλλεται μετά δακτυλική πίεση στην περιοχή των δακρυϊκών πόρων).

2. Καλλιέργεια σε θρεπτικά υλικά (αιματούχο, αιματούχο αναερόβιο, θειογλυκολικό ζυμό, Sabouraud agar)

Η διάγνωση όταν η λοίμωξη οφείλεται στον *Actinomyces israelii* επιβεβαιώνεται από τη μικροσκοπική ανεύρεση των κοκκίων μετά από χρώση Gram παρασκευασμάτων του εξιδρώματος.

Η δακρύρροια είναι το χαρακτηριστικό της λοίμωξης. Η εμπλεκόμενη περιοχή φαίνεται φυσιολογική εκτός από ένα διατεταμένο δακρυϊκό σημείο (punctum). Η δακτυλική πίεση πάνω από τους πόρους συχνά καταλήγει στην εμφάνιση κίτρινο-πράσινου εξιδρώματος στο οφθαλμικό σημείο (punctum).

Η **δακρυοκυστίτιδα** (λοίμωξη του δακρυϊκού ασκού) προκαλείται από στάση λόγω απόφραξης του ρινοδακρυϊκού πόρου. Τα αίτια είναι



Σχήμα 2. Ανατομία δακρυϊκού συστήματος. Gray's Anatomy 1923 Lacrimal gland.

ο *S. aureus*, *S. pneumoniae*, *S. pyogenes*, Gram (-) βακτηρίδια, *Neisseria gonorrhoeae* (σπάνια).

Διάγνωση: Χρώση Gram παρασκευασμάτων εξιδρώματος και καλλιέργεια σε αιματούχο άγαρ, σοκολατόχρωμο και θειογλυκολικό ζωμό.

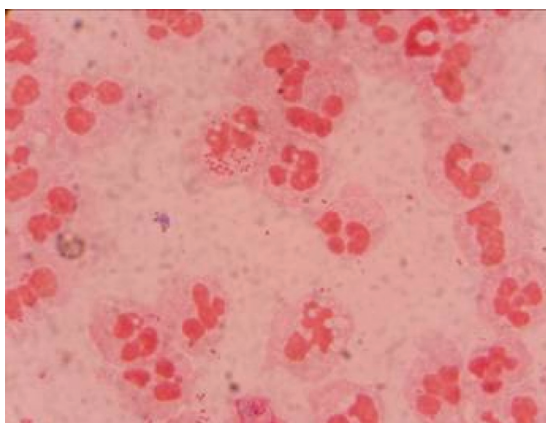
Τα συμπτώματα της οξείας λοίμωξης είναι τοπικός πόνος, οίδημα και ερύθημα. Στην οξεία μορφή τα βακτήρια εντοπίζονται στο τοίχωμα του ασκού. Στη χρόνια δακρυοκυτίτιδα τα βακτήρια, που είναι Gram (-) αρνητικά, εντοπίζονται περισσότερο στον αυλό παρά στο τοίχωμα του δακρυϊκού ασκού. Η περιοχή πάνω από τον ασκό μπορεί να είναι φυσιολογική, αλλά η δακτυλική πίεση μπορεί να προκαλέσει την εμφάνιση πύου στο δακρυϊκό σημείο (punctum).

Το «κριθαράκι» (hordeolum) παρατηρείται με 2 μορφές, εξωτερικό και εσωτερικό. Το εξωτερικό «κριθαράκι» είναι σταφυλοκοκκικά μικροαποστημάτια του αδένος του Zeiss και του τόξου των επιπολής σημηματογόνων αδένων που εκτείνεται κατά μήκος των βλεφαρίδων. Επειδή η μορφή αυτή ιάται αυτόματα από ρήξη των αποστημάτων μέσα σε λίγες μέρες από το σχηματισμό τους δεν χρειάζεται θεραπεία. Το εσωτερικό κριθαράκι, το οποίο καλείται και οξεία μείβομάνιτιδα, αποτελεί πιο σοβαρή περίπτωση, επειδή ο αδένας ευρίσκεται μέσα στον ταρσό και το απόστημα δεν παροχετεύεται αυτόματα, ο πόνος, το οίδημα και η υπεραιμία είναι εντονότερα⁵.

Βακτηριακή επιπεφυκίτιδα

Μπορεί να διαιεθεί στην υπεροξεία, οξεία ή χρόνια. Η υπεροξεία προκαλείται από *Neisseria* spp (*N. gonorrhoeae* και *N. meningitidis*) και χαρακτηρίζεται από πυώδες έκκριμα, υπεραιμία του επιπεφυκότα, οίδημα των βλεφάρων και οίδημα του επιπεφυκότα με αιμορραγίες. Συχνά, υπάρχουν πρωταίοι ψηλαφητοί λεμφαδένες. Λαμβάνεται υλικό με βαμβακοφόρο στυλεό από τον επιπεφυκότα και γίνεται χρώση Gram (Εικόνα 3) και καλλιέργεια για *N. gonorrhoeae*. Επειδή συχνά η γονοκοκκική λοίμωξη συνδέεται με χλαμυδιακή, ο ασθενής και ο σεξουαλικός σύντροφος θα πρέπει να λαμβάνουν παράλληλα θεραπευτική αγωγή με αντιβιοτικά από το στόμα για συνυπάρχουσα λοίμωξη του γεννητικού συστήματος από *Chlamydia*. Η οξεία επιπεφυκίτιδα γενικά προκαλείται από *S. aureus*, *S. pneumoniae* και *H. influenzae*. Ο ασθενής συνήθως παρουσιάζεται με ιστορικό μιας ή τεσσάρων εβδομάδων πυώδους εκκρίματος, υπεραιμίας του επιπεφυκότα και ήπιας ή μέτριας εκχύμωσης. Η χρόνια επιπεφυκίτιδα κυρίως προκαλείται από *Staphylococcus* spp, από *Moraxella* spp και συχνά από ευκαιριακά βακτήρια⁶ (Πίνακας 3).

Διάγνωση βακτηριακής επιπεφυκίτιδας: Ο οφθαλμίατρος λαμβάνει επίχρισμα από τον επιπεφυκότα με 2 στυλεούς (Dacron) και κατάλλη-



Εικόνα 3. Άμεση χρώση Gram επιχρίσματος επιπεφυκότα: Gram (-) διπλόκοκκοι ενδοκυττάριοι και εξοκυττάριοι.

λα υλικά μεταφοράς (παράλληλα γίνεται λήψη δείγματος και από τον υγιή επιπεφυκότα για σύγκριση)

Άμεση χρώση Gram και Giemsa επιχρίσματος

Καλλιεργητικά υλικά: (επώαση >3 ημέρες έως 5-7 ημέρες)

1. Αιματούχο άγαρ (O₂ 35°C)
2. Σοκολατόχρωμο άγαρ (CO₂ 5%)
3. Thayer Martin Agar (TMA)
4. Thioglycolate broth

Λοίμωξη από *Chlamydia*

Τα *Chlamydia trachomatis* προκαλούν τα κλινικά σύνδρομα: (α) του τραχώματος και (β) της επιπεφυκίτιδας των εγκλειστών.

Η **επιπεφυκίτιδα των ενηλίκων** από έγκλειστα (inclusion conjunctivitis) προκαλείται από τους ορότυπους D-J των *Chlamydia trachomatis*. Είναι σεξουαλικά μεταδιδόμενη νόσος και συνήθως συνδέεται με ουρηθρίτιδα ή τραχηλίτιδα από *Chlamydia* σε νεαρά άτομα.

Ένα σημαντικό ποσοστό ασθενών με χλαμυδιακή επιπεφυκίτιδα των εγκλειστών έχουν ασυμπτωματική γονοκοκκική λοίμωξη. Τα οφθαλμικά σημεία περιλαμβάνουν χρόνια αντίδραση

του επιπεφυκότα, η οποία είναι περισσότερο εμφανής στον επιπεφυκότα του κάτω βλεφάρου, και λιγοστό βλεννοπυώδες έκκριμα. Η εξέταση με τη σχισμοειδή λυχνία αποκαλύπτει σχηματισμό αγγείων στον ανώτερο κερατοειδή (pannus) και/ή γκρι-λευκές διηθήσεις στην περιφέρεια του κερατοειδούς. Πρωταίος λεμφαδένας είναι συχνά ψηλαφητός. Τα *Chlamydia* αναζητούνται με IFA, ELISA, κυτταροκαλλιέργεια, χρώση Giemsa⁷ (ενδοκυτταροπλασματικά έγκλειστα) PCR σε ξέσματα επιπεφυκότα ή επιχρίσματα.

Η **επιπεφυκίτιδα των νεογνών** καλείται *Ophthalmia neonatorum*. Είναι λοίμωξη που παρατηρείται τις πρώτες 28 ημέρες της ζωής, οφείλεται σε: *Chlamydia trachomatis* *Neisseria gonorrhoeae* και σε μια ποικιλία άλλων παθογόνων (*Haemophilus*, *S. pneumoniae*). Η πιο κοινή επιπεφυκίτιδα στα νεογνά οφείλεται στα *C. trachomatis*, και μεταδίδεται από επαφή με το μολυσμένο γεννητικό σύστημα της μητέρας. Η διάγνωση της χλαμυδιακής επιπεφυκίτιδας στα νεογνά διαπιστώνεται κλινικά από την παρουσία ενός υπερπυώδους εξιδρώματος τις πρώτες 3-10 ημέρες από τη γέννηση. Η γονοκοκκική επιπεφυκίτιδα παράγει επίσης ένα έντονα πυώδες εξίδρωμα την 2η-4η ημέρα από τη γέννηση. Τράχωμα προκαλείται από τους ορότυπους A-C. Η νόσος πα-

Πίνακας 3. Αίτια βλεφαρίτιδας - επιπεφυκίτιδας.

Βλεφαρίτιδα	Επιπεφυκίτιδα
<i>S. aureus</i>	<i>S. pneumoniae</i>
<i>Staphylococcus</i> Co (-) (CNS)	<i>H. influenzae</i>
<i>P. acnes</i>	<i>S. aureus</i>
Ακάρεα: <i>Demodex folliculorum</i> σπάνια	<i>Moraxella</i> spp
<i>Phthirus pubis</i> σπάνια	<i>C. trachomatis</i>
	<i>N. gonorrhoeae</i>
	<i>S. pyogenes</i>
	<i>Enterobacteriaceae</i>
	HSV, VZV, adenovirus
	Σπάνια αίτια:
	<i>P. rettgeri</i> , <i>A. israelii</i> <i>Peptostreptococcus</i> spp
	<i>Prevotella</i> spp, <i>Fusobacterium</i> spp
	<i>Propionibacterium</i> spp.
	Μύκητες: (<i>Aspergillus</i> spp, <i>Fusarium</i> spp. <i>C. albicans</i>)
	Παράσιτα: (<i>Toxocara canis</i> microfilariae, Microsporidia)

ρατηρείται σε χώρες με κακές συνθήκες υγιεινής. Το τράχωμα οδηγεί σε τύφλωση από προοδευτική επούλωση των βλεφάρων και των εξαρτημάτων.

Κερατίτιδες

Η λοίμωξη του κερατοειδούς σε υγιή άτομα είναι σπάνια λόγω της φυσικής αντίστασης του κερατοειδούς στη λοίμωξη. Προδιαθεσικοί παράγοντες που μπορεί να αλλάξουν τους μηχανισμούς άμυνας του οφθαλμού και να επιτρέψουν την εισβολή των βακτηρίων στον κερατοειδή περιλαμβάνουν: (α) εξωγενείς παράγοντες (φακούς επαφής, τραύμα), (β) δυσλειτουργία των οφθαλμικών εξαρτημάτων (έλλειψη δακρύων, ανωμαλίες της ανατομίας των βλεφάρων), (γ) συστηματικά νοσήματα (διαβήτης, νόσοι του κολλαγόνου) και (δ) ανοσοκατασταλτική θεραπεία. Ο πιο κοινός προδιαθεσικός παράγοντας, ο οποίος οδηγεί σε έλκος του κερατοειδούς, είναι η χρήση των φακών επαφής⁸. Η κερατίτιδα είναι συνήθως βακτηριακή αλλά μπορεί να προκαλείται και από ιούς, μύκητες και παράσιτα (Πίνακας 4).

Βακτηριακή κερατίτιδα

Είναι λοίμωξη απειλητική για την όραση. Χωρίς θεραπεία οδηγεί σε διάτρηση του κερατοειδούς. Ο μεγαλύτερος παράγοντας κινδύνου είναι οι φακοί επαφής ιδιαίτερα σε ασθενείς που φορούν μαλακούς φακούς επαφής όλη τη νύχτα ή συνεχώς για μερικές ημέρες⁹. Η κλινική

διάγνωση της βακτηριακής κερατίτιδας γίνεται με βάση τα συμπτώματα και τα σημεία τα οποία περιλαμβάνουν: οξεία έναρξη του πόνου, ελάττωση της όρασης, υπεραιμία του επιπεφυκότα, και φωτοφοβία. Ο ρυθμός προοδευτικής επιδείνωσης των συμπτωμάτων εξαρτάται από τη λοιμογόνο δύναμη του υπεύθυνου παθογόνου. Το υπότυπον (στιβάδα πολυμορφοπύρηνων στον πρόσθιο θάλαμο) είναι αρκετά συχνό.

Εργαστηριακή διάγνωση: Όλες οι περιπτώσεις βακτηριακής κερατίτιδας απαιτούν επαρκή απόξεση του κερατοειδούς (στη βάση και στο κύριο χείλος της διήθησης) για χρώσεις (άμεση χρώση Gram, Giemsa, Ziehl-Neelsen) (Εικόνες 4,5,6,7,9,10,11) και καλλιέργεια σε κατάλληλα θρεπτικά υλικά τα οποία επιστρώνονται παρά την κλίση του ασθενούς από τον οφθαλμίατρο σε 3-5 σειρές δίκην C (Εικόνες 8, 9) σε αιματούχο άγαρ, σοκολατόχρωμο, επώαση σε ατμόσφαιρα CO₂, αιματούχο αναερόβιο, θειογλυκολικό ζυμό, τα οποία επωάζονται 5-7 ημέρες καθώς και *Sabouraud agar* με χλωραμφενικόλη μέχρι και 4 εβδομάδες. Το υλικό Lowenstein επωάζεται επί 6 εβδομάδες.

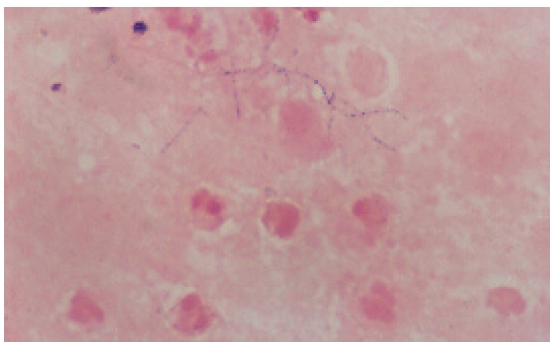
Παράλληλα πρέπει να γίνεται καλλιέργεια ελέγχου από επίχρισμα του υγιούς επιπεφυκότα.

Παθοφυσιολογία κερατίτιδας

Μετά τη βλάβη του επιθηλίου του κερατοειδούς τα παθογόνα εισέρχονται στον κερατοειδή και πολλαπλασιάζονται, ελευθερώνουν τοξίνες

Πίνακας 4. Αίτια κερατίτιδας.

Βακτήρια	Μύκητες	Ιοί
<i>P. aeruginosa</i> , (χρήστες φακών επαφής)	<i>C. albicans</i>	HSV
<i>S. aureus</i>	<i>Fusarium</i> spp (διδυμικός) ¹⁰	VZV
<i>S. pyogenes</i>	<i>Aspergillus</i> spp	Adenovirus
<i>S. viridans</i>	<i>Acremonium</i> spp (διδυμικός)	EBV
Staphylococcus Co (-)	<i>Paecilomyces</i> spp	
<i>S. pneumoniae</i>	<i>Cryptococcus neoformans</i>	
<i>Propionibacterium</i> spp	<i>Scedosporium</i> spp	
<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Curvularia</i> spp	
Άτυπα mycobacteria (LASIK)	Alternaria	
<i>Nocardia</i>	<i>Phialophora</i> (διδυμικός)	
Listeria		



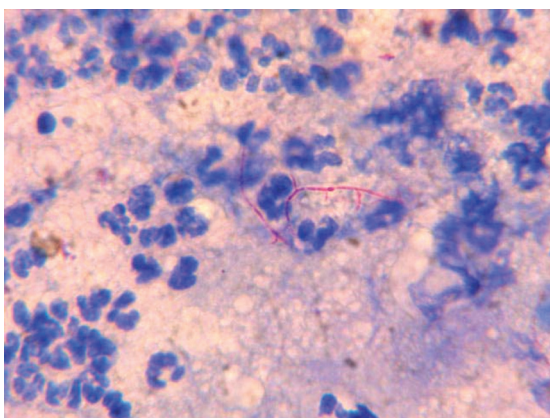
Εικόνα 4. *Nocardia* spp σε άμεσο επίχρισμα ξεσμάτων κερατοειδούς ασθενούς με έλκος (χρώση Gram $\times 1000$).

και ένζυμα (ελαστάση, πρωτεάση). Ακολουθεί σχηματισμός έλκους, οιδήματος, αποστήματος του στρώματος του κερατοειδούς, καταστροφή του κερατοειδούς και σχηματισμός υποπύου. Επίσης είναι δυνατόν να προκληθεί διάτρηση κερατοειδούς και δευτεροπαθής ενδοφθαλμίτιδα.

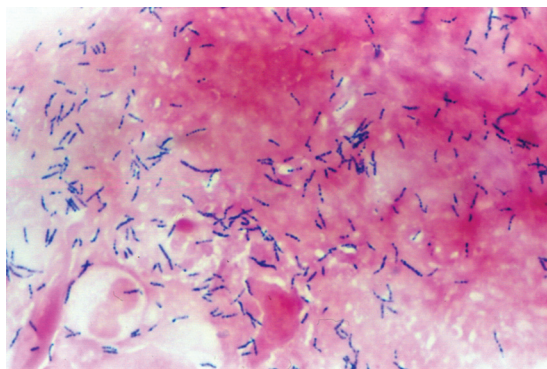
Παρασιτική κερατίτιδα

Κύριο αίτιο είναι η *Acanthamoeba* spp (Εικόνα 12α και 12β).

Παράγοντες κίνδυνου είναι οι φακοί επαφής και το τραύμα του κερατοειδούς. Η *Acanthamoeba* spp αναπτύσσεται κατά 94% σε χρήστες μαλακών φακών επαφής και μόνο κατά 6% σε ασθενείς χωρίς φακούς επαφής¹⁷.



Εικόνα 5. *Nocardia* spp σε άμεσο επίχρισμα ξεσμάτων κερατοειδούς ασθενούς με έλκος (τροποποιημένη χρώση Ziehl -Neelsen $\times 1000$).

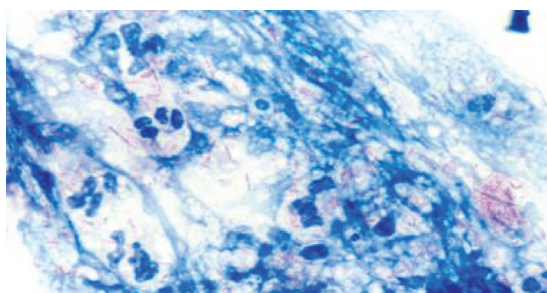


Εικόνα 6. *Mycobacterium chelonae* σε άμεσο επίχρισμα ξεσμάτων κερατοειδούς του ασθενούς της εικόνας μετά χρώση Gram ($\times 1000$).

Εμφανίζονται ψευδοδενδριτικές αλλοιώσεις του κερατοειδούς με διήθηση επιθηλίου, έντονος πόνος, σκληρίτιδα, σχηματισμός υποπύου και τελικά μπορεί να συμβεί διάτρηση του κερατοειδούς. Η μικροβιολογική διάγνωση της κερατίτιδας από *Acanthamoeba* γίνεται με άμεσο εμβολιασμό των ξεσμάτων κερατοειδούς ή υλικού βιοψίας από τον οφθαλμίατρο παρά την κλίνη του ασθενούς σε άγαρ χωρίς θρεπτικά συστατικά.

Στην επιφάνεια προστίθεται του υλικού εναιώρημα *Escherichia coli* (θολερότητα της κλίμακας Mc Farland 2-3), επώαζεται έως 10-14 ημέρες και μικροσκοπείται μετά 48 ώρες καθημερινά ($\times 100$ και $\times 400$). Το εναιώρημα *E. coli* αποτελεί θρεπτικό υλικό της *Acanthamoeba*.

Άλλα λιγότερο κατάλληλα δείγματα για διάγνωση της παρασιτικής κερατίτιδας είναι: οι φακοί επαφής και τα υγρά φακών επαφής.



Εικόνα 7. *Mycobacterium chelonae* σε άμεσο επίχρισμα ξεσμάτων κερατοειδούς ασθενούς με φυματιώδη κερατίτιδα μετά θεραπεία με laser για διόρθωση μυωπίας (χρώση Ziehl- Neelsen $\times 1000$).

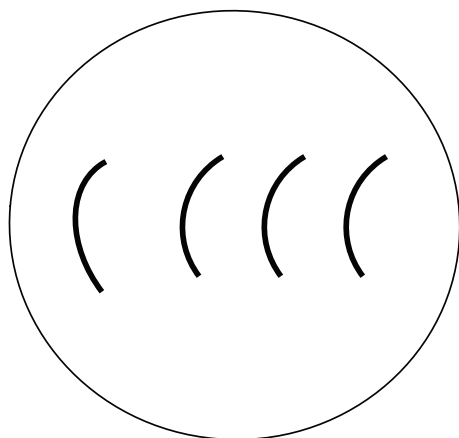


Εικόνα 8. Αποικίες *Mycobacterium chelonae* μετά ενοφθαλμισμό των ξεσμάτων του κερατοειδούς σε αιματούχο άγαρ δίκην C και επώαση 72 ωρών.

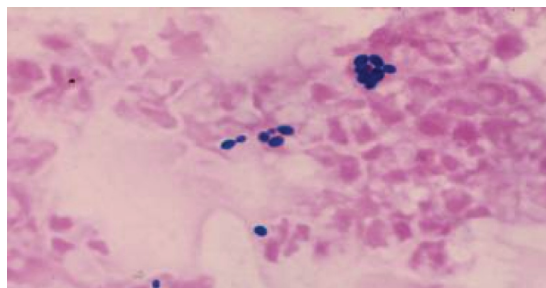
Οι χρώσεις Gram, Giemsa, και ο ανοσοφθορισμός των ξεσμάτων του κερατοειδούς προσφέρουν βοήθεια στη διάγνωση των κερατιτίδων.

Οξεία ιογενής κερατοεπιπεφυκίτις

Συχνά αίτια είναι οι Adenovirus (8,19,11,3), HSV, Enterovirus, Coxsackie, και σπάνια η Influenza, και οι ιοί της ερυθράς, ανεμοβλογιάς, παρωτίτιδας, λοιμώδους μονοπυρήνωσης.



Εικόνα 9. Σχηματική παράσταση ενοφθαλμισμού των ξεσμάτων της Εικ. 8, δίκην C (από τη λατινική ονομασία Cornea).



Εικόνα 10. Άμεσο παρασκεύασμα ξεσμάτων κερατοειδούς (*Candida* spp, χρώση Gram).

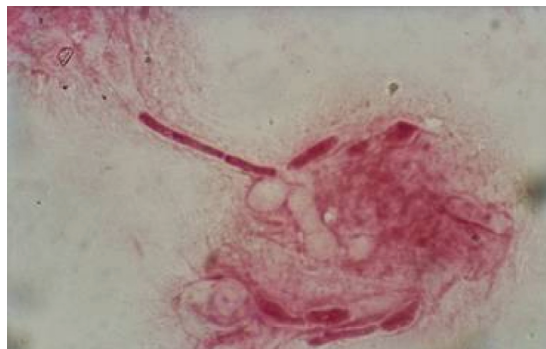
Μικροβιολογική διάγνωση γίνεται από τα ακόλουθα κλινικά δείγματα:

1. Ξέσματα ή επιχρίσματα επιπεφυκότα ή κερατοειδούς (με βαμβακοφόρο στυλέο με Dacron και υλικό μεταφοράς ειδικό για ιούς)

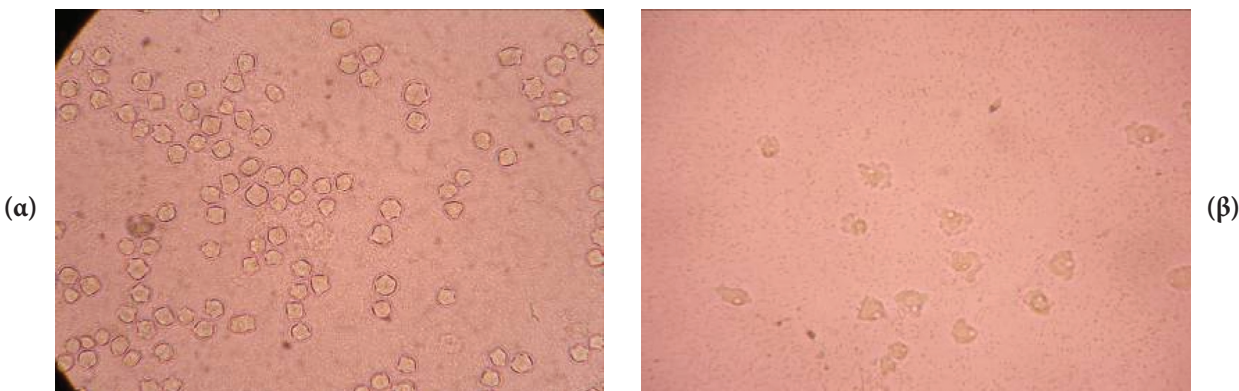
2. Στον ορό του ασθενούς γίνεται απομόνωση του ιού σε κυτταρικές σειρές (σε Κέντρα Αναφοράς). Ανίχνευση αντιγόνων του ιού με άμεσο ανοσοφθορισμό (DFA). Η ανίχνευση του DNA του ιού με PCR είναι η μέθοδος εκλογής¹¹ για τα οφθαλμικά δείγματα, γιατί απαιτεί απειροελάχιστες ποσότητες και μπορεί να θέσει πολύ γρήγορα τη διάγνωση. Η παρουσία των ειδικών αντισωμάτων ανιχνεύεται με ανοσοφθορισμό και EIA.

Ενδοφθαλμίτιδες

Η ενδοφθαλμίτιδα είναι φλεγμονή που οφείλεται στην είσοδο παθογόνων μικροοργανισμών στο οπίσθιο τμήμα του οφθαλμού. Απαραίτητο κριτήριο για τη διάγνωση ενδοφθαλμί-



Εικόνα 11. Άμεσο παρασκεύασμα ξεσμάτων κερατοειδούς: παρατηρούνται νηματοειδείς υφές μυκήτων (χρώση Gram × 1000).



Εικόνα 12α και Εικόνα 12β. Καλλιέργεια 5ης ημέρας *Acanthamoeba* σε μη θρεπτικό άγαρ. (α) Κύστεις. Διακρίνονται τα δύο τοιχώματα της κύστης, ένα εξωτερικό ρυτιδωμένο (εξωκύστη) και ένα εσωτερικό πολυγωνικό με αστεροειδή εμφάνιση (ενδοκύστη). (β) Τροφοζώιτες: ξεχωρίζει το συστελλόμενο κενοτόπιο του τροφοζώιτη, που ρυθμίζει το περιεχόμενο του κυττάρου σε νερό (νωπό παρασκεύασμα $\times 400$).

Οι Εικόνες 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 12α, 12β προέρχονται από το αρχείο του Μικροβιολογικού Εργαστηρίου του ΓΝΑ «Γ. Γεννηματάς»

τιδας είναι η συμμετοχή του υαλώδους σώματος. Παρά την επιθετική θεραπεία και τη χειρουργική επέμβαση (βιτρεκτομή) η ενδοφθαλμίτιδα καταλήγει γενικά σε μερική ή ολική απώλεια της όρασης συχνά μέσα σε λίγες ημέρες από τον ενδοφθαλμισμό του παθογόνου. Η ενδοφθαλμίτιδα ταξινομείται σε 2 τύπους: (α) εξωγενή και (β) ενδογενή. Η εξωγενής παρατηρείται συνήθως μετά χειρουργική επέμβαση στο μάτι (μετεγχειρητική), αλλά μπορεί να ακολουθήσει διεισδυτικό τραύμα (μετατραυματική). Η ενδογενής συμβαίνει με είσοδο του παθογόνου αιματογενώς, από απομεμακρυσμένη ανατομική θέση¹².

Η οξεία μετεγχειρητική (0,1-0,2%) συμβαίνει 1- 6 εβδομάδες (μετά επέμβαση).

Στο 90% των περιπτώσεων συμβαίνει μετά 1 εβδομάδα.

Συχνότερα αίτια είναι: *CoNS*, 70%, *S. aureus* 10%, *S. viridans*, *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, *Bacillus* sp, *P. aeruginosa*, *Proteus* sp, *Klebsiella* sp, *Serratia* sp., αναερόβια (σπανίως).

Ακολουθεί οποιοδήποτε τύπο οφθαλμικής επέμβασης. Συχνότερα όμως του «καταρράκτη» που είναι ο πιο κοινός τύπος επέμβασης.

Η χρόνια μετεγχειρητική ενδοφθαλμίτιδα είναι ήπια λοίμωξη, συμβαίνει 1 μήνα έως 1 χρόνο μετά την επέμβαση και τα αίτια είναι: *P. acnes*, *CoNS*, *Candida* spp.

Μετατραυματική εξωγενής ενδοφθαλμίτιδα

Διατιτράινοντα οφθαλμικά τραύματα συνοδεύονται από λοίμωξη σε υψηλότερο ποσοστό (3-17%)¹³ απ' ό,τι συμβαίνει μετά από επεμβάσεις. Τα αίτια που συνδέονται με μετατραυματική ενδοφθαλμίτιδα περιλαμβάνουν μεγαλύτερη ποικιλία μικροοργανισμών από εκείνα που προκαλούν μετεγχειρητική ενδοφθαλμίτιδα. Οι σταφυλόκοκκοι είναι το πρώτο αίτιο και ακολουθεί ο *Bacillus cereus*¹⁴. Άλλα αίτια είναι: *P. aeruginosa*, *Clostridia* spp, *Penicillium*, *Fusarium*, *Acromonium*, *Aspergillus*. Μερικές περιπτώσεις είναι πολυμικροβιακές.

Ενδογενής ενδοφθαλμίτιδα

Είναι σχετικά σπάνια, υπεύθυνη για το 2-8% όλων των περιπτώσεων ενδοφθαλμίτιδας. Ασθενείς που βρίσκονται σε υψηλό κίνδυνο είναι: (α) ανοσοκατεσταλμένοι (β) ασθενείς με μακρά παραμονή ενδοφλέβιων καθετήρων και (γ) χρήστες ναρκωτικών ουσιών. Τα συχνότερα αίτια είναι: *S. aureus*, *Bacillus cereus* και Gram-αρνητικοί μικροοργανισμοί (*E. coli*, *Neisseria meningitidis*, *Klebsiella* spp). *Bacillus* spp, είναι η κύρια αιτία της ενδογενούς ενδοφθαλμίτιδας σε χρήστες ενδοφλέβιων ναρκωτικών ουσιών¹⁵. Οι μικροοργανισμοί ενδοφθαλμίζονται από μολυσμένα σύνεργα

και διαλύματα των φαρμάκων. Το συχνότερο αίτιο σε όλες τις περιπτώσεις ενδογενούς ενδοφθαλμίτιδας είναι *Candida albicans*¹⁶. Αν και πολλοί οφθαλμικοί ιστοί συμμετέχουν στη βακτηριακή ενδοφθαλμίτιδα, η εμφάνιση του υαλώδους σώματος αποτελεί το κλειδί για τη διάγνωση. Ο πρόσθιος θάλαμος συχνά έχει 1-2 mm υπότυο.

Η λήψη του υαλώδους σώματος και υδατοειδούς υγρού, για καλλιέργεια και εξέταση άμεσου παρασκευάσματος, θα πρέπει να γίνεται πριν την έναρξη της θεραπευτικής αγωγής. Το υαλώδες σώμα πιο συχνά από το υδατοειδές υγρό οδηγεί στην απομόνωση του υπεύθυνου μικροοργανισμού. Όταν αναμένεται ενδογενής ενδοφθαλμίτιδα θα πρέπει να γίνονται παράλληλα και καλλιέργειες αίματος (Πίνακας 5).

Περικογχική κυτταρίτιδα

Παρουσιάζεται με λοιμώξεις των μαλακών ιστών μέσα και γύρω από τον κόγχο. Διαφοροποιείται με βάση την ανατομική θέση της λοίμωξης. Η οριοθέτηση που ξεχωρίζει την περικογχική από την κογχική κυτταρίτιδα είναι το κογχικό διάφραγμα. Λοιμώξεις προ του διαφράγματος θεωρούνται προδιαφραγματικές ή περικογχικές. Επειδή το κογχικό διάφραγμα είναι λεπτό και διάφανο, (περικογχικές) λοιμώξεις μπορούν να προκαλέσουν διάτρηση του διαφράγματος και να προ-

καλέσουν κογχική κυτταρίτιδα. Η ανάμιξη του κόγχου είναι μεγάλης σημασίας, επειδή μπορεί να έχει ως επιπλοκές μόνιμη απώλεια της όρασης, θρόμβωση, μηνιγγίτιδα και ακόμη το θάνατο.

Οι ασθενείς με περικογχική κυτταρίτιδα παρουσιάζονται με έντονο οίδημα και υπεραίμια των βλεφάρων και των υποδοριών ιστών, ενώ ο βολβός του οφθαλμού και ο κόγχος παραμένουν φυσιολογικοί.

Η κογχική κυτταρίτιδα συχνά συνδέεται με οξεία παραρρινοκολπίτιδα, μπορεί όμως να προκύψει από επέκταση της περικογχικής κυτταρίτιδας. Η κογχική κυτταρίτιδα τυπικά συνδέεται με υπεραίμια και οίδημα του επιπεφυκότα, περιορισμένη κινητικότητα του οφθαλμού, πρόπτωση του βολβού και οπτική νευροπάθεια, η οποία χαρακτηρίζεται από ελάττωση της λειτουργίας του οπτικού νεύρου (ελαττωμένη όραση). Οι ασθενείς συχνά έχουν πυρετό και λευκοκυττάρωση.

Αίτια: *Streptococcus pyogenes*, *S. aureus*, *S. pneumoniae*, *H. Influenzae* και Gram-αρνητικά βακτηρίδια. Πολυμικροβιακή λοίμωξη με αναερόβια (*Bacteroides* spp, *Peptostreptococcus* spp και άλλας).

Η **ραγοειδίτις** διακρίνεται σε:

Πρόσθια ραγοειδίτιδα (ιριδοκυκλίτιδα) η οποία κατά 90% είναι ιδιοπαθής ή αυτοάνοση (αγκυλωτική σπονδυλίτιδα HLA B-27, Reiter's) και κατά 10% είναι ιογενής (HSV, VZV), Syphilis, Lyme disease, Mycobacteria

Πίνακας 5. Κατάταξη, παθογόνα αίτια, εργαστηριακή διάγνωση ενδοφθαλμίτιδας.

Εξωγενής	Μικροβιακά αίτια	Ενδογενής
1. Οξεία μετεγχειρητική (συχνότητα 0,1-2%) (Χρονικό διάστημα 1-6 εβδομάδες)	<i>CONS</i> 70%, <i>S. aureus</i> , <i>S. viridans</i> , <i>S. pneumoniae</i> <i>H. influenzae</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>P. aeruginosa</i> <i>Proteus</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Serratia</i> , αναερόβια	1. Αιματογενής λοίμωξη (σπάνια) 2. Σε χρήστες ενδοφλέβιων ουσιών (συνήθως)
2. Χρόνια μετεγχειρητική (συχνότητα 0,1-2%) (Χρονικό διάστημα 1 μήνα - 1 χρόνο)	<i>P. acnes</i> , <i>CONS</i> , <i>Candida</i>	Μικροβιακά αίτια <i>Candida albicans</i> , <i>S. aureus</i> , <i>B. cereus</i> <i>E. coli</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Neisseria</i>
3. Μετατραυματική (συχνότητα 3-17%)	<i>Staphylococcus</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>P. aeruginosa</i> <i>Clostridia</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Fusarium</i>	Μικροβιολογική διάγνωση: 1. Αναρρόφηση με βελόνη, υαλώδους σώματος 2. Αιμοκαλλιέργεια

Οπίσθια: (χοριοαμφιβληστροειδίτιδα)

Αίτια: Ιοί, παράσιτα, μύκητες, βακτήρια

<i>Candida</i> spp	<i>Cryptococcus</i> spp	<i>T. gondii</i>
<i>Histoplasma</i>	<i>Aspergillus</i>	<i>P. carinii</i> (AIDS)
<i>Tr. pallidum</i>	<i>M. tuberculosis</i>	<i>Toxocara canis</i>
<i>Nocardia</i> spp		<i>Taenia solium</i> (<i>Cysticercosis</i>)

Κατάλληλα δείγματα για τη μικροβιολογική διάγνωση της ραγοειδίτιδας είναι το έκπλυμα βι-τρεκτομής, υλικό βιοψίας, ο ορός και το ENY

Μέθοδοι:

Μικροσκοπική εξέταση (Gram, Giemsa)

Καλλιέργεια: Σε αιματούχο, Sabouraud

Αιμοκαλλιέργειες

Ορολογικές σύφιλης (FTA Abs), Mantoux.

Έλεγχος αντισωμάτων IFA, Elisa, για HIV PCR

Ακτινογραφία θώρακα

Εξέταση ENY (κύτταρα, καλλιέργεια -έλεγχος αντιγόνων).

Διεύθυνση Επικοινωνίας:

Γεώργιος Γκαντέρης

Διευθυντής ΕΣΥ, Μικροβιολογικό Τμήμα

ΓΝΑ «Γ. Γεννηματάς», Αθήνα

Τηλ.: 210 7788185, e-mail: gganteris@gmail.com

Summary**Ocular specimen**

G. GANTERIS

Department of Microbiology "G. Gennimatas"

General hospital of Athens, Athens Greece

Applied Clinical Microbiology

Certain ocular infections may involve important structures of the eye, with serious complications and even destruction of visual functions. Ocular specimens are of extremely small quantity, rarely rejected and rarely able to be collected again. Therefore Laboratories must adapt protocols and policies accordingly. Ocular specimens should be collected only by Ophthalmologists and most of them should be inoculated directly in to growth media at bedside of the patients. Direct and frequent communication between Microbiologist and Ophthalmologist is essential. Telephone communication to the Ophthalmologist from positive reports of invasive specimens as soon as possible is considered necessary.

(Key words: ocular infections, specimen, laboratory diagnosis).

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. **Μαλάμου-Λαδά Ε.** Λοιμώξεις του οφθαλμού. Δελτ. Ελλ. Μικροβιολογικής Εταιρείας 2007, 52: 78-80
2. Gray DL, Gilligan HP, Fowler WC, Cumitech 13B – Laboratory Diagnosis of Ocular Infections, ASM, 2010, 1-38.
3. **Isenberg H.** Ocular cultures In Clinical Microbiology Procedures Manual, 2nd Edition ASM 2007, 03.10.1 - 03.10.7
4. **Raskin EM, Speaker MG, Laibson PR.** Blepharitis. Infect Dis Clin North Am 1992, 6: 777-787.
5. **Baum J.** Infections of the eye. Clin Infect Dis 1995, 21: 479-486.
6. **Kowalski RP, Harwick JC.** Incidence of Moraxella conjunctival infection. Am J Ophthalmol 1986, 101: 437-440.
7. **Kowalski RP, Uhrin M, Karenchak LM, Sweet RL, Gordon YJ.** Evaluation of the polymerase chain reaction test for detecting chlamydial DNA in adult 102: 1016-1019.
8. **Schein OD, Glynn RJ, Poggio EC, Seddon JM, Kenyon KR.** The relative risk of ulcerative keratitis among users of daily-wear and extended-wear soft contact lenses. A case-control study. Microbial Keratitis Study Group. N Engl J Med 1989, 321: 773-778.
9. **Poggio EC, Glynn RJ, Schein OD, Seddon JM, Shannon MJ, Scardino VA, Kenyon KR.** The incidence of ulcerative keratitis among users of daily-wear and extended-wear soft contact lenses. N Engl J Med 1989, 321: 779-783.
10. **Μυλωνά-Πετροπούλου Δ.** Μυκητιασικές λοιμώξεις του οφθαλμού, Δελτ Ελλ Μικροβιολογικής Εταιρείας 2007, 52: 91-100.
11. **Καραμπογιά-Καραφυλλίδη Π.** Ιογενείς λοιμώξεις του οφθαλμού. Δελτ. Ελλ. Μικροβιολογικής Εταιρείας 2007, 52: 121-127.
12. **Callegan MC, Engelbert M, Parke DW 2nd, Jett BD, Gilmore MS.** Bacterial endophthalmitis: Epidemiology therapeutics, and bacterium-host interactions. Clin Microbiol Rev 2002, 15: 111-124.
13. **Meredith TA.** Posttraumatic endophthalmitis. Arch Ophthalmol 1999, 117: 520-521.
14. **Schemmer GB, Driebe WT Jr.** Posttraumatic Bacillus cereus endophthalmitis. Arch Ophthalmol 1987, 105: 342-344.
15. **Cowan CL Jr, Madden WM, Hatem GF, Merritt JC.** Endogenous Bacillus cereus panophthalmitis. Ann Ophthalmol 1987, 19: 65-68.
16. **Romero CF, Rai MK, Lowder CY, Adal KA.** Endogenous endophthalmitis: Case report and brief review. Am Fam Physician 1999, 60: 510-514.
17. **Τζανέτου Κ.** Παρασιτικές λοιμώξεις του οφθαλμού. Δελτ. Ελλ. Μικροβιολογικής Εταιρείας 2007, 52: 101-120.

ΤΟ ΚΛΙΝΙΚΟ ΔΕΙΓΜΑ ΣΤΙΣ ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ ΤΟΥ ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΟΥ

ΕΥΑΓΓΕΛΙΑ ΠΕΤΡΙΔΟΥ

Στις λοιμώξεις του Ανώτερου Αναπνευστικού Συστήματος περιλαμβάνονται το κοινό κρυολόγημα, η φαρυγγίτιδα, επιγλωττίτιδα, η οξεία λαρυγγίτιδα, η οξεία λαρυγγοτραχειοβρογχίτιδα, η παραρρινοκολπίτιδα, η εξωτερική και μέση ωτίτιδα και η μαστοειδίτιδα. Τα αίτια είναι ιοί, βακτήρια και μύκητες. Για τη σωστή διάγνωση απαιτούνται ορθή επιλογή, λήψη, μεταφορά και εξέταση του κλινικού δείγματος. Στο άρθρο που ακολουθεί περιγράφεται το δείγμα και ο τρόπος λήψεως δειγμάτων στα οποία αναζητούνται παθογόνοι μικροοργανισμοί από φαρυγγικά και ρινοφαρυγγικά επίχρισματα, ρινοφαρυγγικά αναρροφήματα, ρινικά εκπλύματα, ωτικές εκκρίσεις, υγρό μέσου ωτός και υλικό από παρακέντηση παραρρινίων κόλπων. Εργαστηριακές εξετάσεις που εφαρμόζονται είναι η αναζήτηση αντιγόνων με ταχείες τεχνικές και ανασοφθορισμό, η ανίχνευση γενετικού υλικού με μοριακές τεχνικές και η καλλιέργεια. Η μέτρηση αντισωμάτων χρησιμεύει σε επιδημιολογικές μελέτες ή στη διάγνωση μεταλοιμωδών νοσημάτων.

(Λέξεις ευρετηρίου: εργαστηριακή διάγνωση, λήψη δείγματος, ανώτερο αναπνευστικό).

Εισαγωγή

Για την επιτυχή αιτιολογική διάγνωση των λοιμώξεων του Ανώτερου Αναπνευστικού Συστήματος (ΑΑΣ) απαιτείται ορθή επιλογή, λήψη, μεταφορά και εξέταση του κλινικού δείγματος, επιλογή της κατάλληλης εξέτασης και μεθοδολογίας, καθώς και σωστή αξιολόγηση του αποτελέσματος. Ως ΑΑΣ ορίζονται η ρινική και στοματική κοιλότητα, ο φάρυγγας, οι παραρρινίοι κόλποι και το ους. Οι λοιμώξεις που αφορούν τις περιοχές αυτές αναφέρονται στον Πίνακα 1. Υπεύθυνοι μικροοργανισμοί είναι στις περισσότερες περιπτώσεις ι-

οί, αλλά και βακτήρια και μύκητες. Στο άρθρο αυτό δεν θα γίνει αναφορά στην επιγλωττίτιδα, την οξεία λαρυγγίτιδα και τη λαρυγγοτραχειοβρογχίτιδα, γιατί αποτελούν καταστάσεις που απαιτούν επείγουσα αντιμετώπιση, η διάγνωσή τους βασίζεται στην κλινική εικόνα του ασθενούς και δεν υπάρχει περιθώριο εργαστηριακής προσέγγισης.

Το κλινικό δείγμα

Το δείγμα που εξετάζεται για τη διάγνωση λοίμωξης του ΑΑΣ μπορεί να είναι ρινικό και φαρυγγικό επίχρισμα, ρινοφαρυγγικό έκκριμα, ρινοφαρυγγικό έκπλυμα, ωτικό έκκριμα, υγρό μέσου ωτός, υγρό παραρρινίων κόλπων, καθώς και ορός για την αναζήτηση αντισωμάτων.

Πίνακας 1. Λοιμώξεις ανωτέρου αναπνευστικού συστήματος

-
- Κοινό κρυολόγημα
 - Φαρυγγίτιδα
 - Οξεία λαρυγγίτιδα
 - Επιγλωττίτιδα
 - Οξεία λαρυγγοτραχειοβρογχίτιδα (croup)
 - Εξωτερική - Μέση ωτίτις και Μαστοειδίτιδα
 - Παραρρινοκολπίτιδα
-

Το κλινικό δείγμα, για την ανίχνευση του παθογόνου, σύμφωνα με τις οδηγίες του CDC, πρέπει να λαμβάνεται 1-3 ημέρες από την έναρξη των συμπτωμάτων. Ο υπεύθυνος μικροοργανισμός δεν ανιχνεύεται μετά την 7η ημέρα της λοίμωξης, με εξαίρεση τους ανοσοκατεσταλμένους όπου η απέκκριση παρατείνεται. Οι στυλεοί που χρησιμοποιούνται για τη λήψη πρέπει να είναι συνθετικοί (dacron ή rayon). Πρέπει να αποφεύγονται οι ξύλινοι βαμβακοφόροι στυλεοί γιατί απορροφούν μέρος του δείγματος και μπορεί να σπάσουν και να τραυματίσουν τον ασθενή κατά τη λήψη. Επίσης πρέπει να αποφεύγονται οι στυλεοί αλγινικού ασβεστίου σε δείγματα που προορίζονται για PCR, καθώς περιέχουν ανασταλτικούς παράγοντες της πρωτεΐνωσης K, που χρησιμοποιείται στην εξαγωγή DNA. Τέλος, το δείγμα πρέπει να μεταφέρεται στο εργαστήριο το αργότερο μέσα σε 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου.

Ο ορός για την ανίχνευση των ειδικών αντισωμάτων IgM ή IgA που δηλώνουν πρόσφατη λοίμωξη πρέπει να λαμβάνεται την 4η με 7η ημέρα της νόσου. Διαφορετικά λαμβάνονται δύο δείγματα ορού, το πρώτο το ενωρίτερο δυνατόν από την έναρξη της νόσου και το δεύτερο δύο ως τέσσερις εβδομάδες μετά. Τα δείγματα εξετάζονται συγχρόνως και η απάντηση είναι θετική αν διαπιστωθεί ορομετατροπή της IgG ή τετραπλασιασμός του τίτλου των ολικών αντισωμάτων.

Για τη λήψη ρινικού επιχρίσματος εισάγουμε το στυλεό 1-2 εκ. παράλληλα με την υπερώα και περιστρέφουμε πιέζοντας το ρινικό βλεννογόνο.

Για φαρυγγικό επίχρισμα πιέζουμε τη γλώσσα με γλωσσοπίεστρο και ακουμπούμε το στυλεό στον οπίσθιο φάρυγγα, στις αμυγδαλές και τις φλεγμονώδεις περιοχές χωρίς να έρθει σε επαφή με τη γλώσσα, τα ούλα και τα δόντια. Για το ρινοφαρυγγικό έκκριμα εισάγουμε εύκαμπτο πολυεστερικό στυλεό, παράλληλα με την υπερώα, στον οπίσθιο ρινοφάρυγγα και περιστρέφουμε για 5 δευτερόλεπτα. Για το ρινοφαρυγγικό έκπλυμα, που λαμβάνεται από παιδιά <1 έτους, εισάγουμε πλαστικό καθετήρα στον οπίσθιο ρινοφάρυγγα, εγχέουμε 2-3 ml φυσιολογικό ορό και αναρροφούμε συλλέγοντας το έκπλυμα σε στείρο στεγανό δοχείο.

Το δείγμα μετά τη λήψη τοποθετείται στο κατάλληλο μέσο μεταφοράς. Τα υλικά μεταφοράς που χρησιμοποιούνται συχνότερα για τα βακτήρια είναι το Amies και το Stuart (Πίνακας 2). Η ύπαρξη στο Amies ανόργανου φωσφορικού Na, χλωριούχου Na, καθώς και άνθρακα (charcoal), ο οποίος εξουδετερώνει τοξίνες και ανασταλτικούς παράγοντες, καθιστά το Amies καταλληλότερο υλικό μεταφοράς, καθώς διατηρεί και τα πιο απαιτητικά βακτήρια, όπως τη Neisseria και την Bordetella. Τα μέσα μεταφοράς διασφαλίζουν την επιβίωση των βακτηρίων για τρία 24ωρα στους 4-22°C. Τα υλικά μεταφοράς για τους ιούς (Viral Transport Medium – VTM) περιέχουν ζωμό βοός με ιχνοστοιχεία, πρωτεΐνες και αντιβιοτικά, όπως γενταμυκίνη και αμφοτερικίνη B, που εξουδετερώνουν μικρόβια και μύκητες. Είναι κατάλληλα για ανίχνευση

Πίνακας 2. Υλικά μεταφοράς βακτηρίων

Amies Transport Medium Aerobic/anaerobic	Stuart Transport Medium
sodium hydrogen phosphate	sodium glycerophosphate
sodium chloride	sodium thioglycollate
potassium chloride	methylene blue
sodium thioglycollate	calcium chloride
calcium chloride	agar
agar	
± charcoal	

ιών με μοριακές τεχνικές καθώς και για διατήρηση του δείγματος έως τέσσερα 24ωρα στους 4°C αν πρόκειται να γίνει καλλιέργεια ιών. Αν απαιτείται φύλαξη για περισσότερο χρόνο το δείγμα διατηρείται στους -70°C.

Επειδή τα δείγματα του ανώτερου αναπνευστικού συχνά περιέχουν βλέννη, είναι απαραίτητο να προηγηθεί η απομάκρυνσή της. Στη μέθοδο ανίχνευσης αντιγόνου με ανοσοχρωματογραφία, η βλέννη εμποδίζει τη διάχυση και δυσχεραίνει την απορρόφηση του υλικού στη μεμβράνη ελέγχου. Όταν το αντιγόνο ανιχνεύεται με άμεσο ανοσοφθορισμό, η βλέννη εμποδίζει τη μοιμοποίηση του παρασκευάσματος και δίνει μη ειδικό φθορισμό. Η απομάκρυνση της βλέννης επιτυγχάνεται είτε με προσπάθεια διάσπασής της με επαναλαμβανόμενες αναρροφήσεις με πιπέτα και απόρριψη των αδιάλυτων τμημάτων της είτε με προσπάθεια ρευστοποίησής της με αποστειρωμένα μικρά γυάλινα σφαιρίδια και ισχυρή ανάδευση στο Vortex.

Εργαστηριακή διερεύνηση των ιογενών λοιμώξεων

Το μεγαλύτερο ποσοστό των λοιμώξεων του ανώτερου αναπνευστικού οφείλεται σε ιούς και η διάγνωση γίνεται συνήθως με κλινικά και επιδημιολογικά κριτήρια. Ωστόσο, η εργαστηριακή διερεύνηση των λοιμώξεων είναι απαραίτητη όταν η βαρύτητα της νόσου το επιβάλλει και ειδικά σε ομάδες όπως νεογνά, ανοσοκατεσταλμένοι και μεταμοσχευμένοι ασθενείς. Οι εξετάσεις που χρησιμοποιούνται είναι η καλλιέργεια, αναζήτηση αντιγόνων, αντισωμάτων, γονιδιώματος του ιού και πρωτεϊνών που εκφράζονται.

Απομόνωση του ιού με κυτταροκαλλιέργεια γίνεται μόνο σε εργαστήρια αναφοράς και έρευνας για τυποποίηση των ιών και παραγωγή αντιικών φαρμάκων και εμβολίων. Τα αντιγόνα ανιχνεύονται με άμεσο ανοσοφθορισμό ή με ταχείες μεθόδους ανοσοχρωματογραφίας. Παρά την κυμαινόμενη ευαισθησία οι ταχείες μέθοδοι αποτελούν πολύτιμο βοήθημα, τόσο σε νοσηλευόμενους, όσο και σε εξεταζόμενους στα εξωτερικά ι-

ατρεία, γιατί επί θετικού αποτελέσματος ο ασθενής απομονώνεται και δεν διασπείρει τον ιό.

Ο προσδιορισμός ειδικών αντισωμάτων στον ορό γίνεται με ανοσοενζυμική ELISA ή έμμεσο ανοσοφθορισμό. Μικρή είναι η συμβολή της εξέτασης αυτής στη διάγνωση της πρόσφατης λοίμωξης λόγω της ανόδου των IgA ή και IgM αντισωμάτων σε μετρήσιμα επίπεδα μετά την πρώτη εβδομάδα της νόσου. Η διαγνωστική της αξία ελαττώνεται επιπρόσθετα από τις διασταυρούμενες αντιδράσεις μεταξύ ιών της ίδιας οικογένειας, την παράταση παραμονής IgM έναντι ορισμένων ιών και την ελαττωμένη ανοσολογική απάντηση νεογνών και ανοσοκατεσταλμένων. Γι' αυτό η χρησιμότητα των ορολογικών εξετάσεων περιορίζεται στην επιβεβαίωση της κλινικής διάγνωσης, τη διάγνωση μεταλοιμωδών νοσημάτων και σε επιδημιολογικές μελέτες με τη μέτρηση IgG.

Οι εξετάσεις του ιικού γονιδιώματος με μοριακές τεχνικές όπως η κλασική, η multiplex και η Real Time PCR, διαθέτουν υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα, απαιτούν όμως ειδικό εξοπλισμό που δεν υπάρχει σε όλα τα διαγνωστικά εργαστήρια. Τελευταία κυκλοφορεί στην ελληνική αγορά ένα αυτοματοποιημένο σύστημα multiplex PCR (Idaho Technology, USA) με το οποίο ανιχνεύονται ταυτόχρονα 17 αναπνευστικοί ιοί (Influenza A, B και C, Parainfluenza 1, 2, 3, 4, 4a και 4b, RSV A και B, Rhino-, Adeno-, Echo-, Boca-, Corona- και Metapneumovirus A και B) και 4 παθογόνα βακτήρια (*Bordetella pertussis*, *Chlamydomphila pneumoniae*, *Legionella pneumophila* και *Mycoplasma pneumoniae*). Οι μέθοδοι γονιδιωματικής και πρωτεωμικής (Genomics - Proteomics) αποτελούν την πιο σύγχρονη διαγνωστική προσέγγιση που επιτρέπει τον ταυτόχρονο προσδιορισμό γονιδίων και πρωτεϊνών που εκφράζονται. Με τον τρόπο αυτό ταυτοποιούνται ταυτόχρονα πολλοί ιοί ή στελέχη ιών. Στην ελληνική αγορά κυκλοφορεί σύστημα τεχνολογίας μικροσυστοιχιών (DNA microarrays, GENOMICA) με το οποίο ανιχνεύονται συγχρόνως 17 αναπνευστικοί ιοί (Influenza A, B και C, Parainfluenza 1, 2, 3, 4, 4a και 4b, RSV A και

B, Rhino -, Adeno-, Echo-, Boca-, Corona- και Metarheumovirus A και B). Η διαδικασία είναι πλήρως αυτοματοποιημένη, τόσο στην εξαγωγή, όσο και την ανίχνευση του γενετικού υλικού, με μόνο μειονέκτημα το υψηλό κόστος.

Νοσήματα

Κοινό κρυολόγημα: Οφείλεται στους ιούς Rhino (40-50%), Influenzae (25-30%), Corona, Adeno, Parainfluenzae, RSV Metarheumovirus, Entero, και Boca. Η εργαστηριακή ταυτοποίηση του υπεύθυνου ιού δεν είναι απαραίτητη καθώς πρόκειται για ήπια, αυτοπεριοριζόμενη κατάσταση. Ορισμένες φορές, ωστόσο, πρέπει να διαφοροδιαγνωσθεί από την αλλεργική ρινίτιδα με τον έλεγχο ρινικού επιχρίσματος για ηωσινόφιλα, από τη στρεπτοκοκκική νόσο με το Strep test, από την καταρροϊκή φάση του κοκκύτη με την ανίχνευση αντιγόνου ή PCR για *Bordetella*.

Φαρυγγίτιδα: Οφείλεται συχνότερα σε ιούς (80%), αλλά και σε βακτήρια όπως οι β αιμολυτικοί Streptococci ομάδας A (15-30%) και ομάδας C (5-10%) (Πίνακας 3). Η κλινική εικόνα ποικίλλει από ήπια, αυτοπεριοριζόμενη ιογενή λοίμωξη έως σοβαρή και δυνητικά επικίνδυνη μικροβιακή λοίμωξη. Αν δεν υπάρχει ιδιαίτερος λόγος η αναζήτηση του παθογόνου περιορίζεται στον β-αιμολυτικό στρεπτόκοκκο.

Η φαρυγγίτιδα από β-αιμολυτικό *S. pyogenes* (GAS) είναι η συχνότερη φαρυγγίτιδα μικροβιακής αιτιολογίας και η σοβαρότερη λόγω των επιπλοκών, τόσο των άμεσων (περιαμυγδαλικό απόστημα, οξεία μέση ωτίτιδα, ιγμορίτιδα), όσο και των απώτερων (ρευματικός πυρετός, οξεία σπειραματονεφρίτιδα, οζώδες ερύθημα). Γι' αυτό είναι απαραίτητη η διαφοροδιάγνωση από την ιογενή φαρυγγίτιδα, καθώς πρέπει το αίτιο να ταυτοποιηθεί και να δοθεί η κατάλληλη αντιβίωση.

Η ανίχνευση του αντιγόνου του GAS γίνεται σε φαρυγγικό επίχρισμα με ανοσοχρωματογραφία (ευαισθησία 70-90% και ειδικότητα 99%). Επί αρνητικού αποτελέσματος και κυρίως στα παιδιά με τυπική κλινική εικόνα στρεπτοκοκκι-

Πίνακας 3. Αίτια φαρυγγίτιδας

Ιοί	Βακτήρια
Ρινοϊοί	<i>Στρεπτόκοκκος ομάδος Α</i>
Corona	<i>Στρεπτόκοκκος ομάδος C, G</i>
Αδενοϊοί	<i>Μικτά αναερόβια</i>
Απλού έρπητα HSV τύπου 1,2	<i>Fusobacterium necrophorum</i>
Παραϊνφλουέντζα	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>
Coxsackie A	<i>Corynebacterium diphtheriae</i>
Ebstein-Barr	<i>Arcanobacterium haemolyticus</i>
CMV	<i>Yersinia enterocolitidis</i>
HIV	<i>Yersinia pestis</i>
Γρίπης A, B	<i>Francisella tularensis</i>
	<i>Treponema pallidum</i>
Μυκόπλασμα	
Χλαμύδια	

κής αμυγδαλίτιδας, πρέπει να γίνεται καλλιέργεια. Καλλιέργεια επίσης γίνεται και για έλεγχο ευαισθησίας σε υποτροπιάζουσες λοιμώξεις, σε αλλεργία στην πενικιλίνη και αντοχή στις μακρολίδες (στην Ελλάδα 22-26%). Η καλλιέργεια των δειγμάτων γίνεται σε αιματούχο άγαρ, με δίσκο bacitracin 0,04 U και επώαση 48h στους 36°C σε αερόβιες συνθήκες και σε αιματούχο άγαρ αναεροβίως ή σε 5% CO₂ 48 h στους 36°C. Οι β-αιμολυτικές αποικίες με ευαισθησία ή όχι στη βακιτρακίνη και αρνητική καταλάση ελέγχονται με συγκόλληση Latex για τις κυριότερες ομάδες κατά Lancefield. Η παρουσία A αντιγόνου ταυτοποιεί το *S. pyogenes* κατά 98% και σπάνια απαιτείται η χρήση API Strip ή άλλου ταυτοποιητικού μέσου.

Διφθερίτιδα: Λοίμωξη, που λόγω του εμβολιασμού θεωρούσαμε ότι είχε εξαλειφθεί, επανεμφανίστηκε ωστόσο λόγω αλλαγής των κοινωνικών συνθηκών. Το υπεύθυνο κορυνοβακτηρίδιο αναζητείται σε φαρυγγικό ή ρινοφαρυγγικό δείγμα μετά από ανάσπαση της χαρακτηριστικής διφθέρας. Γίνεται χρώση κατά Gram και καλλιέργεια του δείγματος σε αιματούχο άγαρ, όπου το κορυνοβακτηρίδιο αναπτύσσεται βραδέως σε 24-48 ώρες, στους 35°C, σε ατμόσφαιρα CO₂ 5%.

Στο ειδικό υλικό Hoyle παράγονται μαύρες αποικίες λόγω του τελλουριούχου καλίου, οι οποίες ανακαλλιεργούνται στο υλικό Tinsdale. Από τα τοξινογόνα στελέχη προκύπτουν φαιοκάστανες αποικίες με τεφρόχρωμη καστανή άλω, λόγω του H₂S που παράγεται. Η ταυτοποίηση γίνεται με σύστημα API Coryne. Το υλικό Löffler χρησιμοποιείται για αποστολή των στελεχών στα κέντρα αναφοράς. Για την ανίχνευση της διφθεριδικής τοξίνης χρησιμοποιείται η κλασική ή τροποποιημένη Elek δοκιμή και η αναζήτηση των γονιδίων της τοξίνης με PCR.

Φαργγίτιδα από *Bordetella*: Το καλύτερο κλινικό δείγμα για την αναζήτηση της *Bordetella* είναι το ρινικό έκπλυμα. Επειδή όμως η λήψη του είναι εφικτή μόνο κατά τη βρεφική ηλικία, σε μεγαλύτερους ασθενείς εξετάζουμε οπισθορινικό επίχρισμα. Παλαιότερα ο ασθενής κατά τη διάρκεια παροξυσμού έβριχε έχοντας εμπρός του ανοιχτό τρυβλίο με θρεπτικό υλικό. Ο τρόπος αυτός δεν απεδείχθη καλύτερος από τη λήψη εκπλύματος ή επιχρίσματος τα οποία, μάλιστα, εκτός από καλλιέργεια μπορούν να εξεταστούν και με PCR.

Η άμεση ανίχνευση αντιγόνου με ανοσοφθορισμό (DFA) φθάνει σε ευαισθησία το 60%, υστερεί όμως σε ειδικότητα, γιατί παρατηρούνται διασταυρούμενες αντιδράσεις μεταξύ των ειδών αλλά και με άλλα βακτήρια που βρίσκονται στην περιοχή, όπως ο *Haemophilus*. Για το λόγο αυτό η χρησιμότητά του περιορίζεται σε εργαστήρια που δεν διαθέτουν άλλη διαγνωστική μέθοδο. Η καλλιέργεια έχει ευαισθησία που δεν ξεπερνά το 20%, αποτελεί όμως την πιο ειδική μέθοδο. Το κλινικό δείγμα εμβολιάζεται σε ειδικά θρεπτικά υλικά (Bordet – Gengou ή Regan – Lowe charcoal άγαρ) στα οποία μετά επώαση 5-7 ημερών αναπτύσσονται αποικίες που μοιάζουν με σταγόνες υδραργύρου. Οι ύποπτες αποικίες εξετάζονται με χρώση Gram, προσθήκη μονοκλωνικών φθορίζοντων αντισωμάτων για *B. pertussis* και *parapertussis* καθώς και με βιοχημικές δοκιμές (οξειδάση, καταλάση, παραγωγή H₂S κ.ά.). Οι μοριακές τεχνικές (κλασική και Real Time PCR) έχουν τη μεγαλύτερη ευαι-

σθησία η οποία εξαρτάται από τη χρονική φάση της νόσου. Στην παροξυσμική φάση φθάνει το 90%. Η ειδικότητα εξαρτάται από τις αλληλουχίες – στόχους που ανιχνεύονται. Είναι δυνατόν με στόχο που αναζητείται η *B. pertussis* να ανιχνεύεται και η *B. holmesii*. Η διάγνωση με προσδιορισμό IgG, IgA και IgM αντισωμάτων με ELISA εφαρμόζεται στα περισσότερα διαγνωστικά εργαστήρια. Επειδή όμως αντισώματα παράγονται σε μετρήσιμα επίπεδα μετά μερικές εβδομάδες από την έναρξη της λοίμωξης, η χρησιμότητά τους περιορίζεται σε περιπτώσεις ενηλίκων με παρατεταμένο βήχα. Η μέτρηση IgG χρησιμεύει στον έλεγχο της ανοσίας και στις περιπτώσεις αυτές η χρήση μόνο της τοξίνης (PT) ως αντιγόνου της ELISA καθιστά τη μέθοδο πιο ειδική.

Ωτίτις – Μαστοειδίτις: Τα αίτια της ωτίτιδας αναφέρονται στον Πίνακα 4. Συχνά πρόκειται για συνδυασμό ιογενούς και βακτηριακής λοίμωξης ο οποίος δυσκολεύει τη θεραπευτική αντιμετώπιση. Άλλος σοβαρός παράγων δυσκολίας είναι η ανάπτυξη βιομεμβράνης στη χρόνια ωτίτιδα. Η βιομεμβράνη ελαττώνει το ρυθμό ανάπτυξης των μικροβίων, εμποδίζει την προσπέλαση των αντιβιοτικών και αποτελεί μόνιμη εστία λοίμωξης με αποτέλεσμα την αύξηση της ανοχής in vivo, καθώς και τη δυσκολία ανάπτυ-

Πίνακας 4. Αίτια Ωτίτιδας - Μαστοειδίτιδας

• Ιοί	• Βακτήρια
RSV	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
Influenza	<i>Haemophilus influenzae</i>
Entero-	<i>Moraxella catarrhalis</i>
Corona-	<i>Streptococcus pyogenes</i>
Rhino-	

Συνδυασμός ιογενών και βακτηριακών λοιμώξεων

- Μυκόπλασμα *Pneumoniae*
- *Chlamydia trachomatis*
- Άτυπα μυκοβακτηρίδια
- Μύκητες
 - *Candida* spp
 - *Aspergillus* spp

ξης στα θρεπτικά υλικά. Σε αυτή την περίπτωση η αιτιολογική διάγνωση γίνεται σε υλικό βιοψίας με PCR ή με laser μικροσκόπηση σάρωσης (Confocal laser scanning microscopy – CLSM).

Η λήψη του δείγματος στην εξωτερική ωτίτιδα γίνεται με έντονη περιστροφή του στυλεού στον έξω ακουστικό πόρο και αφού έχει προηγηθεί καθαρισμός του από τυχόν ακαθαρσίες. Στη μέση ωτίτιδα και τη μαστοειδίτιδα, αν έχει γίνει ρήξη του τυμπάνου, το δείγμα λαμβάνεται με στυλεό με εύκαμπτο στέλεχος και αναζητούνται σε αυτό μόνο αερόβια βακτήρια, ενώ σε άθικτο τύμπανο με τυμπανοκέντηση σε συνθήκες χειρουργείου. Η εργαστηριακή διάγνωση περιλαμβάνει χρώση άμεσου παρασκευάσματος, καλλιέργεια σε θρεπτικά υλικά για αερόβια, αναερόβια βακτήρια και μύκητες και έλεγχο ευαισθησίας στα αντιβιοτικά. Επίσης ανίχνευση του παθολόγου μικροοργανισμού και των γονιδίων αντοχής με PCR.

Παραρρινοκολπίτιδες: Οφείλονται σε *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *S. pyogenes* και αναερόβια βακτήρια.

Το δείγμα για άμεση χρώση και καλλιέργεια δεν πρέπει να είναι ρινικό έκκριμα, το οποίο συνήθως φθάνει στο εργαστήριο, γιατί έχει αναμειχθεί με τη μικροβιακή χλωρίδα. Κατάλληλο για εξέταση είναι δείγμα παρακέντησης που γίνεται με ειδικό trocar, με τοπική αναισθησία, κάτω από την κάτω ρινική κόγχη και σε απόσταση περίπου 2 εκατοστά από την κεφαλή της. Επειδή η λήψη του δείγματος με αυτόν τον τρόπο είναι επίπονη και όχι πάντα επιτυχής, η διάγνωση βασίζεται στις κλινικές εκδηλώσεις και τον απεικονιστικό έλεγχο και η θεραπεία χορηγείται εμπειρικά.

Διεύθυνση Επικοινωνίας:

Ευαγγελία Πετρίδου

Βιοπαθολόγος, Επιμελ. Α', Μικροβιολογικού
Τμήματος, Νοσοκ. Παιδων «Η Αγία Σοφία»

Summary

Upper respiratory tract infections

EVANGELIA PETRIDOU

Department of Microbiology,
“Agia Sophia” Children’s Hospital-Athens
Applied Clinical Microbiology

Upper Respiratory Tract Infection (URTI) include Common Cold, Pharyngitis Acute Laryngitis, Acute Laryngotracheobronchitis (Croup), Sinusitis, Otitis Externa, Otitis Media and Mastoiditis. They may be caused by a variety of pathogens: virus, bacteria and fungi. Successful laboratory diagnosis requires appropriate selection, collection, transport and processing of the specimen. Throat and nasopharyngeal swab, nasopharyngeal aspirate, nasal wash, swab for the diagnosis of otitis externa and middle ear fluid for the diagnosis of otitis media are tested. These specimens must be transported to the laboratory as soon as possible by using special transport medium. Methods used are antigen detection, culture and PCR. The antibodies measurement is suitable for epidemiological studies as well as for the diagnosis of post infectious disorders.

(Key words: upper respiratory tract infection, specimen, laboratory procedures).

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. **Καλλέργη Κ.** Ταχεία διάγνωση των ιογενών λοιμώξεων του αναπνευστικού ΕΚΜΕΔ 1996, **1(4):** 137-149.
2. **Deplazes B, Garcia L, Shimizu R.** Specimen Collection, Transport and Processing: Parasitology in: P. Murray, E Garon, J. Jorgensen, ML Landry, M. Pfaller, Manual of Clinical Microbiology, 9th edition, ASM press, USA, 2007, 1995-2011.
3. **Thomson RB.** Specimen Collection, Transport and Processing: Bacteriology in: P Murray, E Garon, J Jorgensen, ML Landry, M Pfaller. Manual

- of Clinical Microbiology, 9th edition, ASM press, USA, 2007, 291-333.
4. **Sutton DA.** Specimen Collection, Transport and Processing: Mycology in: P. Murray, E Garon, J Jorgensen, ML Landry, M Pfaller. Manual of Clinical Microbiology, 9th edition, ASM press, USA, 2007, 1728-1735.
 5. **Forman MS, Valsamakis A.** Specimen Collection, Transport and Processing: Virology in: P Murray, E Garon, J Jorgensen, ML Landry, M Pfaller. Manual of Clinical Microbiology, 9th edition, ASM press, USA, 2007, 1284-1295.
 6. **Καλογεροπούλου Ε.** Η δημιουργία της βιομεμβράνης και ο ρόλος της στη μικροβιακή αντοχή ΕΚΜΕΔ 2008, **13(2)**: 79-85.
 7. CDC Guidelines for Upper Respiratory Tract Infections www.odc.gov/guidelines.html 30 june 2009.
 8. **Παπαπετρόπουλος Ν, Φελέκης Ν, Μουρκάς Δ, Παππάς Ζ.** Σύγχρονες απόψεις για τη χρόνια εκκριτική μέση ωτίτιδα στα παιδιά. ΩΡΛ Hellenic Otorhinolaryngology www.hellenic.orl.gr 3/11/2009.
 9. **Turner R, Caserta M, Flores A, Breese C, Klein J, Demuri G, Wald E.** Upper Respiratory Tract Infections In: Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and practice of Infections Disease 7th edition, Churchill Livingstone Elsevier, USA, 2010, 809-850.
 10. **Γιαννάκη – Ψινάκη Μ.** Σύγχρονη διαγνωστική προσέγγιση των ιώσεων ΕΚΜΕΔ, 2010, **15(2)**: 54-60.
 11. **Καλλέργη Κ.** Εργαστηριακή διερεύνηση ιογενών λοιμώξεων αναπνευστικού συστήματος ΕΚΜΕΔ, 2010, **15(2)**: 61-73.



ΤΟ ΝΕΟ ΔΙΟΙΚΗΤΙΚΟ ΣΥΜΒΟΥΛΙΟ

Κατά την τακτική συνέλευση των μελών της Εταιρείας Κλινικής Μικροβιολογίας την 14η Ιουνίου 2011 έγιναν αρχαιρεσίες για την εκλογή του Δ.Σ. της Εταιρείας.

Το νέο Δ.Σ. συγκροτήθηκε σε Σώμα την 20ή Ιουνίου και έχει ως ακολούθως:

Πρόεδρος:	Χρύσα Κούτσια-Καρούζου
Αντιπρόεδρος:	Μαρία Γιαννάκη - Ψινάκη
Γενική Γραμματέας:	Μαρία Κανελλοπούλου
Ταμίας:	Αθηνά Χαρισιάδου
Ειδική Γραμματέας:	Ελένη Αλεξάνδρου - Αθανασούλη
Τακτικά Μέλη:	Λουκία Ζέρβα, Δημήτρης Παπαβέντσης
Αναπλ. Μέλη:	Ελένη Πρίφτη-Παπαγιαννάκου, Μαρία Παπαδημητρίου, Σοφία Τσιπλάκου
Εξελεγκτική Επιτροπή:	Κατερίνα Χρυσάκη, Ευαγγελία Πετρίδου

ΤΟ ΕΓΚΕΦΑΛΟΝΩΤΙΑΙΟ ΥΓΡΟ (ΕΝΥ)

ΕΛΕΝΗ ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΥ-ΑΘΑΝΑΣΟΥΛΗ

Το εγκεφαλονωτιαίο υγρό (ΕΝΥ) αποτελεί ένα «πολύτιμο» δείγμα για την εργαστηριακή διάγνωση της μικροβιακής μηνιγγίτιδας. Λόγω της πολύ μεγάλης διαγνωστικής αξίας της μικροβιολογικής ανάλυσης του ΕΝΥ για την έγκαιρη και σωστή αντιμετώπιση του ασθενούς, όλες οι διαδικασίες από τη λήψη, τη συντήρηση και την αποστολή του δείγματος στο εργαστήριο μέχρι την αξιολόγηση του αποτελέσματος είναι καθοριστικής σημασίας και απαιτούν μεγάλη προσοχή. Στο άρθρο αυτό περιγράφονται εν συντομία οι διαδικασίες από τη λήψη του δείγματος μέχρι την αξιολόγηση του αποτελέσματος με στόχο τη συμβολή στη διαγνωστική προσέγγιση της μικροβιακής μηνιγγίτιδας.

(Λέξεις ευρετηρίου: εγκεφαλονωτιαίο υγρό, λήψη, αξιολόγηση εργαστηριακή διάγνωση, μηνιγγίτιδα).

Εισαγωγή – Ορισμός

Το ΕΝΥ είναι το κατ' εξοχήν δείγμα η ανάλυση του οποίου συμβάλλει στη διαγνωστική προσέγγιση και την εργαστηριακή επιβεβαίωση της μηνιγγίτιδας. Επιπλέον η ανάλυσή του συμβάλλει και στη διάγνωση άλλων λοιμώξεων του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος καθώς και άλλων νευρολογικών νοσημάτων.

Η μικροβιολογική εξέταση του εγκεφαλονωτιαίου υγρού και η απομόνωση του παθογόνου μικροοργανισμού ή η ανίχνευση του νουκλεϊνικού οξέος του αποτελεί μέχρι σήμερα το «Gold Standard» για την εργαστηριακή διάγνωση της μηνιγγίτιδας και επομένως, είναι εξέταση πολύ

μεγάλης διαγνωστικής αξίας για την έγκαιρη και σωστή αντιμετώπιση του ασθενή.

Μηνιγγίτιδα¹ είναι η φλεγμονή των μηνίγγων του εγκεφάλου που συνοδεύεται κλινικά από απότομη έναρξη πυρετού και ένα ή περισσότερα από τα ακόλουθα:

- αυχενική δυσκαμψία
- διαταραχή επιπέδου συνείδησης
- σημεία μηνιγγισμού
- πετεχειώδες ή αιμορραγικό εξάνθημα
- και σε παιδιά < 1 έτους από προπέτεια της πηγής

Τα παραπάνω συμπτώματα σε αρκετές περιπτώσεις δεν είναι τυπικά, ιδιαίτερα σε παιδιά και βρέφη όπου οι εκδηλώσεις είναι συχνά μη ειδικές. Στα νεογνά δεν είναι ασύνηθες να παρουσιάζεται με αβληχρά συμπτωματολογία.

Μικροβιολογικό Τμήμα Νοσ. Παιδων «Η Αγία Σοφία»,
Αθήνα.

ΕΝΥ: ένα «πολύτιμο δείγμα»

Το ΕΝΥ αποτελεί ένα «πολύτιμο δείγμα». Πλην του γεγονότος ότι η μηνιγγίτιδα είναι πολύ σοβαρή νόσος που μπορεί να εξελιχθεί πολύ γρήγορα και που συχνά, ιδιαίτερα αν καθυστερήσει η αντιμικροβιακή θεραπεία, καταλείπει σοβαρές επιπλοκές, είναι επίσης γεγονός ότι η επανάληψη της λήψης του δείγματος είναι εξαιρετικά δύσκολη. Σε μερικές περιπτώσεις η επανάληψη της λήψης του ΕΝΥ είναι αδύνατη, ιδιαίτερα σε ασθενείς μικρής ηλικίας. Για όλους αυτούς τους λόγους οι διαδικασίες λήψης, μεταφοράς, παραλαβής στο εργαστήριο και συντήρησης του ΕΝΥ είναι καθοριστικής σημασίας για το αποτέλεσμα της ανάλυσης και πρέπει να τηρούνται ευλαβικά.

Λήψη και μεταφορά του ΕΝΥ στο εργαστήριο

Ο τρόπος λήψεως του ΕΝΥ είναι η οσφυο-νωτιαία παρακέντηση (ΟΝΠ). Αυτή γίνεται από τον εξειδικευμένο κλινικό γιατρό, με εισαγωγή της ειδικής βελόνας στο μεσοσπονδύλιο διάστημα Ο3-Ο4 ή Ο4-Ο5, ή Ο5-Ι1 και αργή λήψη του ΕΝΥ σε 3-4 αποστειρωμένα σωληνάρια που κλείνουν ερμητικά με πώμα. Προς αποφυγή επιμολύνσεων του δείγματος είναι σημαντική η αντισηψία του δέρματος της περιοχής όπου θα γίνει η ΟΝΠ. Η ιδανική διαδικασία αντισηψίας περιλαμβάνει²:

- α. 70% ισοπροπυλική ή αιθυλική αλκοόλη
- β. βάμμα ιωδίου 1-2 % και αναμονή 1' ή 2' με *rovidone iodine* 10 %
- γ. παρακέντηση με αποστειρωμένα γάντια
- δ. μετά τη ΟΝΠ απομάκρυνση του ιωδίου με αλκοόλη.

Η λήψη του ΕΝΥ γίνεται κατά προτίμηση πριν χορηγηθεί αντιμικροβιακή θεραπεία, εφόσον βέβαια αυτό είναι δυνατόν. Σε υποψία μικροβιακής μηνιγγίτιδας σε καμία περίπτωση δεν καθυστερεί η χορήγηση αντιμικροβιακής αγωγής αν πρόκειται να καθυστερήσει η ΟΝΠ. Επίσης, δεν θα πρέπει να παραλείπεται και λήψη καλλιέργειας αίματος συγχρόνως με τη λήψη του Ε-

ΝΥ, η οποία συμβάλλει σημαντικά στην εργαστηριακή επιβεβαίωση της μηνιγγίτιδας.

Εάν το ΕΝΥ ληφθεί από εμφυτεύματα παροχέτευσης (shunts), προηγείται αντισηψία της περιοχής παρακέντησης με μεγάλη επιμέλεια, όπως ακριβώς στην ΟΝΠ, και ακολουθεί η λήψη του ΕΝΥ από τη βαλβίδα. Σημειώτεον, ότι στην περίπτωση αυτή η καλλιέργεια αποτελεί το βασικό σημείο αναφοράς διότι μπορεί να μην υπάρχουν αυξημένα κύτταρα και να υπάρχει λοίμωξη ή αντίθετα να έχουμε αυξημένο αριθμό κυττάρων λόγω στάσης και χωρίς λοίμωξη.

Τα σωληνάρια αριθμούνται διαδοχικά κατά τη σειρά λήψης και αποστέλλονται στο εργαστήριο χωρίς καθυστέρηση σε πλαστικό σακουλάκι μαζί με σχετικό παραπεμπτικό όπου αναγράφονται τα στοιχεία του ασθενούς, η ημερομηνία και η ώρα λήψης του δείγματος, η θέση λήψης (π.χ. ΟΝΠ, shunt), η φαρμακευτική αγωγή και ένα σύντομο ιστορικό του ασθενούς ή η πιθανή διάγνωση.

Παραλαβή και φύλαξη του ΕΝΥ

Κατά την άφιξη του ΕΝΥ στο εργαστήριο, είναι σημαντικό να αναγγέλλεται από το προσωπικό που το μεταφέρει, ώστε να μη χάνεται πολύτιμος χρόνος και να αρχίζει αμέσως η ανάλυση του.

Το δείγμα του ΕΝΥ πρέπει να εξεταστεί αμέσως κατά προτεραιότητα. Η εξέταση γίνεται σε θάλαμο βιολογικής ασφάλειας ή τουλάχιστον με χρήση προστατευτικής μάσκας και προσωπικών προφυλάξεων προς αποφυγή μόλυνσεων. Έως ότου ολοκληρωθεί η μικροβιολογική εξέταση το ΕΝΥ φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου. Ο εμβολιασμός της καλλιέργειας στα θρεπτικά υλικά το ιδανικό είναι να γίνει εντός 10' και το αργότερο σε 2ώρες. Επίσης, δείγμα 0,5-1 ml μη-φυγοκεντρημένου ΕΝΥ αποστέλλεται άμεσα στο Εθνικό Κέντρο Αναφοράς Μηνιγγίτιδας σε καλά πωματιζόμενο, αποστειρωμένο και ασφαλές σωληνάριο μεταφοράς. Αν το δείγμα είναι πολύ αιματηρό και υπάρχει κίνδυνος να πήξει, τοποθετείται σε σωληνάριο με EDTA. Σε περίπτωση που το δείγμα δεν μπορεί να αποστα-

λεί αμέσως (π.χ. σαββατοκύριακα, αργίες), φυλάσσεται στην κατάψυξη. Είναι χρήσιμο, μαζί με το ΕΝΥ να αποστέλλεται και δείγμα αίματος (EDTA). Τα δείγματα σε EDTA, αν δεν μπορούν να αποσταλούν άμεσα, φυλάσσονται στο ψυγείο (όχι στην κατάψυξη). Στο ψυγείο επίσης φυλάσσεται και δείγμα για άλλες εξετάσεις (π.χ. αντισώματα για ιούς).

Συνήθως, το 1ο σωληνάριο χρησιμοποιείται για βιοχημική εξέταση, επειδή πιθανόν να περιέχει μεγαλύτερο αριθμό ερυθροκυττάρων από ενδεχόμενη τρώση αγγείου και ακόμη διότι αυτή η πρώτη ποσότητα του ΕΝΥ είναι που έρχεται σε επαφή με εναπομείναντες μικροοργανισμούς του δέρματος ή με υπολείμματα αντισηπτικού. Για μικροβιολογική εξέταση, δηλαδή άμεσο μικροσκοπικό παρασκεύασμα και καλλιέργεια, χρησιμοποιείται το 2ο σωληνάριο. Από το 3ο σωληνάριο, όπου το ΕΝΥ είναι καθαρότερο, γίνεται η μέτρηση κυττάρων.

Στην πράξη, αρκετές φορές αποστέλλονται στο εργαστήριο δύο σωληνάκια, οπότε χρησιμοποιούμε το διαυγέστερο, ή αν είναι και τα δύο διαιρημένα, το πρώτο για μέτρηση κυττάρων και το άλλο για καλλιέργεια. Η βιοχημική εξέταση γίνεται από το υπερκείμενό τους. Σε σπάνιες περιπτώσεις, όπου αντιμετωπίζεται δυσκολία στην ΟΝΠ, πιθανόν να αποσταλεί στο εργαστήριο μόνο ένα σωληνάριο με μικρή ποσότητα ΕΝΥ. Τότε γίνεται συνεννόηση με την κλινική για την προτεραιότητα των εξετάσεων, αλλά η ορθή σειρά που συνήθως ακολουθείται είναι: μέτρηση κυττάρων και άμεσο παρασκεύασμα, γλυκόζη, καλλιέργεια, πρωτεΐνη³⁻⁵.

Εξέταση των φυσικών χαρακτηρισμών του ΕΝΥ

Μετά την παραλαβή και καταγραφή του δείγματος ΕΝΥ σημειώνουμε τον αριθμό των σωληναρίων καθώς και:

- την ώρα που παρελήφθη το δείγμα
- την ποσότητα του υγρού
- την παρουσία πήγματος και το μέγεθός του
- εάν το ΕΝΥ είναι αιμορραγικό σε όλα τα σωληνάκια ή όχι

Επίσης σημειώνουμε τους φυσικούς του χαρακτηρισμούς:

- α. Όψη. Φυσιολογικά το ΕΝΥ είναι διαυγές σαν από καθαρότατο νερό. Μη φυσιολογική όψη χαρακτηρίζεται ως: οπαλίζουσα ή θολερή.
- β. Χρώμα. Το φυσιολογικό ΕΝΥ είναι άχρωμο, ενώ το μη φυσιολογικό χρώμα χαρακτηρίζεται ανάλογα ως ροδόχρουν, αχνό κίτρινο, ξανθοχρωματικό σε ποικίλες διακυμάνσεις καφεοειδές ή αιμορραγικό. Στη μηνιγγίτιδα η ξανθοχρωμία οφείλεται αφενός στο πολύ λευκωμα και αφετέρου στη λύση των ερυθρών αιμοσφαιρίων της φλεγμονής. Επίσης, ως μια παθολογική μεταβολή των φυσικών χαρακτηρισμών αναφέρεται η ύπαρξη αραχνοειδούς πηγματος στην επιφάνεια, το οποίο αν παρατηρηθεί υποδηλώνει ενδεχομένως φυματιώδη μηνιγγίτιδα. Στον Πίνακα 1 φαίνεται η αιτιολογία των συνήθων μεταβολών των φυσικών χαρακτηρισμών ΕΝΥ⁶⁻⁸.

Γενική εξέταση του ΕΝΥ

Στο πλαίσιο της γενικής εξέτασης του ΕΝΥ, η ανάλυση του δείγματος αρχίζει πάντα με τη μέτρηση του αριθμού των κυττάρων. Φυσιολογικά τα λευκά αιμοσφαίρια/μλ στο ΕΝΥ είναι 0-30 στα νεογνά, 0-20 στα παιδιά και 0-10 στους ενήλικες, ενώ τα ερυθρά αιμοσφαίρια/μλ 0-10. Για τη μέτρηση των κυττάρων εξετάζεται αυτούσιο ΕΝΥ (αφυγοκέντητο). Αφού ανακινήσουμε ελαφρά το σωληνάριο, ώστε να γίνει ομοιογενής κατανομή των κυττάρων, τα μετρούμε σε καταμετρική πλάκα (π.χ. Neubauer ή Rosenthal). Στην πλάκα Neubauer το ένα μεγάλο τετράγωνο έχει χωρητικότητα 0,1 μλ. Επομένως, ο αριθμός των λευκοκυττάρων/μλ αντιστοιχεί με τον αριθμό τους σε 1 μεγάλο τετράγωνο × 10.

Στην περίπτωση αιμορραγικού δείγματος ΕΝΥ, η μέτρηση των κυττάρων απαιτεί κάποια ιδιαίτερη επιμέλεια, ούτως ώστε να έχουμε ακριβέστερα αποτελέσματα. Προηγείται επεξεργασία με οξεικό οξύ 30%, φροντίζοντας να υπολογίσουμε στον τελικό υπολογισμό των κυττάρων

Πίνακας 1. Αιτιολογία συνήθων μεταβολών φυσικών χαρακτήρων του ΕΝΥ⁸

Μεταβολή φυσικού χαρακτήρα	Αιτιολογία
Θολερότης	λευκοκύτταρα είναι >200/μl ερυθροκύτταρα >400/μl βακτήρια >10 ⁵ /μl σκιαγραφικές ουσίες
Ξανθοχρωμία	επισκληρίδιο λίπος κατά την ΟΝΠ λεύκωμα είναι >100 mg/dl τραυματική ΟΝΠ υπαραχνοειδής ή ενδοκρανιακή αιμορραγία ίκτερος, καρωτιναμία, μελάνωμα, rifampicin
Πήγμα ινικής Αραχνοειδές υμένιο στην επιφάνεια Παχύρρευστο	πρωτεΐνη είναι >150 mg/dl φυματιώδης μηνιγγίτις βαριά μηνιγγίτις (μεγάλος αριθμός βακτηρίων)

και την αραίωση του ΕΝΥ με το οξεικό οξύ. Βεβαίως, αν το ΕΝΥ είναι έντονα αιμορραγικό, θα πρέπει να προβούμε σε διόρθωση του αριθμού των λευκοκυττάρων με τον τύπο:

$$\text{λευκά αίματος} \times \text{ερυθρά ΕΝΥ}$$

$$\text{Πρόσθετα λευκά ΕΝΥ} = \frac{\text{λευκά αίματος} \times \text{ερυθρά ΕΝΥ}}{\text{ερυθρά αίματος}}$$

Κάποιες φορές χρειάζεται να διαφοροδιαγνώσουμε αν η παρουσία αίματος στο ΕΝΥ, οφείλεται σε τραυματική ΟΝΠ ή σε υπαραχνοειδή αιμορραγία. Τα στοιχεία που θα μας βοηθήσουν στη ΔΔ φαίνονται στον Πίνακα 2.

Καθορισμός τύπου κυττάρων. Φυσιολογικά τα λευκοκύτταρα στο ΕΝΥ είναι λεμφοκύτταρα ή μονοκύτταρα. Αν βρεθούν πολλά κύτταρα καθορίζουμε τον τύπο τους βάφοντάς τα απευθεί-

ας με έμβιο χρώση (toluidine ή methylene blue) ή σε περίπτωση που είναι αιμορραγικό με έμβιο χρώση + οξεικό οξύ. Επίσης, μπορούμε να επιστρέψουμε πλακάκι και να το βάψουμε με ξηρά αιματολογική χρώση (May Grünvald-Giemsa), αφού το μονιμοποιήσουμε με αιθανόλη. Αν ο αριθμός των λευκοκυττάρων/μl είναι μικρός, προηγείται κυτταροφυγοκέντρωση σε 1200 στρ 5-10' για να αυξηθεί η συγκέντρωσή τους.

Ο καθορισμός του λευκοκυτταρικού τύπου δεν είναι πάντα εύκολος, διότι τα κύτταρα καταστρέφονται, είτε από προηγηθείσα χημειοθεραπεία είτε από τη φυγοκέντρωση. Επίσης, επειδή το ΕΝΥ είναι υπότονο, η καθυστέρηση στην επεξεργασία του δείγματος, ευθύνεται για τη λύση των πολυμορφοπυρήνων με συνέπεια την αλλοίωση του αποτελέσματος. Αυτό αποτελεί έναν

Πίνακας 2. Διαφορική διάγνωση ΕΝΥ τραυματικής ΟΝΠ και υπαραχνοειδούς αιμορραγίας⁹

Στοιχεία	Τραυματικό αίμα	Υπαραχνοειδής αιμορραγία
Ξανθοχρωμία	Όχι	Ναι
Πήγμα	Πολύ πιθανό	Όχι
Όψη	Αιματηρό το 1ο δείγμα	Αιματηρά όλα τα δείγματα
Μικροσκοπική μορφή	Συνήθως όχι οδοντωτά	Οδοντωτά πάντα
Ανοσοδιάχυση (Fibrin Dimer)	Αρνητική	Θετική

Πίνακας 3. Μεταβολές λευκοκυττάρων και ο τύπος τους στο ΕΝΥ στις διάφορες μορφές μηνιγγίτιδας

	Λευκοκύτταρα	Λευκοκυτταρικός τύπος
Μικροβιακή μηνιγγίτις	>1000/μl	Πολυμορφοπύρρηνα >50%
Ιογενής ή άσηπτος	<500	Αρχικά πολυμορφοπύρρηνα και έπειτα λεμφοκύτταρα
Μηκυτιασική	Αυξημένα	Λεμφοκύτταρα
Φυματιώδης	10-1000	Αρχικά πολυμορφοπύρρηνα και έπειτα λεμφοκύτταρα

επιπλέον λόγο που επιβάλλει την άμεση ανάλυση του δείγματος δεδομένου ότι μετά από μία ώρα τα πολυμορφοπύρρηνα είναι δυνατόν να μειωθούν κατά 32% και μετά από 2 ώρες κατά 50%¹⁰. Οι συνήθεις μεταβολές των κυττάρων στο ΕΝΥ και ο τύπος τους στις διάφορες μορφές μηνιγγίτιδας φαίνονται στον Πίνακα 3.

Ωστόσο, ο αριθμός των λευκοκυττάρων και ο τύπος τους δεν αποτελούν αξιόπιστο δείκτη για τη διαφορική διάγνωση των διαφόρου αιτιολογίας μηνιγγιτίδων, διότι υπάρχουν μεγάλες ζώνες αλληλεπικάλυψης μεταξύ τους. Επίσης, πρέπει να έχουμε υπόψη μας ότι ο χαμηλός αριθμός λευκοκυττάρων δεν αποκλείει τη μικροβιακή μηνιγγίτιδα. Αυτό είναι σύνηθες στις μηνιγγίτιδες σε νεογνά, ιδιαίτερα στη μηνιγγίτιδα από λιστέρια, καθώς και στις μηνιγγιτιδοκοκκικές μηνιγγίτιδες όπου σε ποσοστό έως 10% δεν παρατηρείται αύξηση των λευκοκυττάρων¹¹.

Βιοχημική εξέταση του ΕΝΥ

Η βιοχημική εξέταση του ΕΝΥ γίνεται από το υπερκείμενο φυγοκεντρηθέντος δείγματος και περιλαμβάνει σε ρουτίνα τη μέτρηση της γλυκόζης και του λευκώματος. Άλλες βιοχημικές παράμετροι που μπορεί να βοηθήσουν είναι: τα χλωριούχα που μειώνονται σε φυματιώδη μηνιγγίτιδα, το γαλακτικό οξύ που συμβάλλει στη διαφορική διάγνωση μικροβιακής από ιογενή μηνιγγίτιδα αν ο ασθενής δεν έχει πάρει αντιβιοτικό και τέλος η γαλακτική δεϋδρογενάση, η αύξηση της οποίας αποτελεί έναν ευαίσθητο δείκτη διαφορικής διάγνωσης μικροβιακής από ιογενή μηνιγγίτιδα εφόσον το δείγμα δεν περιέχει ερυθρά.

Η **γλυκόζη** του ΕΝΥ φυσιολογικά είναι 50-60% της γλυκόζης αίματος, ενώ στα νεογνά και τα βρέφη είναι ίδια με του αίματος λόγω ανωριμότητας του εγκεφαλικού φραγμού. Λίγο πριν την ΟΝΠ συνιστάται να μετράται η γλυκόζη αίματος, ώστε να εκτιμηθεί σωστά η ανευρεθείσα τιμή της στο ΕΝΥ. Η μέθοδος μέτρησής της είναι της οξειδάσης της γλυκόζης. Όταν ο λόγος γλυκόζη ΕΝΥ/ γλυκόζη ορού είναι <0,4 η ευαισθησία και η ειδικότητά του ως δείκτη είναι αντίστοιχα 80% και 96%.

Η **ολική πρωτεΐνη** του ΕΝΥ στα νεογνά φυσιολογικά κυμαίνεται μεταξύ 15-170 mg/dl και στα παιδιά και στους ενήλικες 15-50 mg/dl. Μετρείται με μεθόδους είτε χρωματομετρικές, όπως της πυρογαλόλης, που αν και είναι υψηλότερου κόστους είναι πολύ ακριβείς και απαιτούν μικρή ποσότητα δείγματος ή με θολομετρικές, όπως του θειοσουλφοσαλικυλικού οξέος, οι οποίες απαιτούν μεγαλύτερο όγκο δείγματος και επίσης επηρεάζονται από διάφορα φάρμακα. Σε οξεία μικροβιακή μηνιγγίτιδα το λεύκωμα στο ΕΝΥ συνήθως είναι >150 mg/dl αλλά δεν αποκλείεται να είναι και μέσα στα φυσιολογικά πλαίσια. Αυτό συμβαίνει συνήθως στα αρχικά στάδια οξείας μικροβιακής μηνιγγίτιδας. Σε 10% των ασθενών με μικροβιακή μηνιγγίτιδα η συγκέντρωση του λευκώματος είναι φυσιολογική και το ποσοστό αυτό είναι 20% όταν η μηνιγγίτιδα είναι μηνιγγιτιδοκοκκικής αιτιολογίας¹¹. Η αύξηση του λευκώματος στο ΕΝΥ αν και συχνή στη μικροβιακή μηνιγγίτιδα σε σχέση με τη μείωση της γλυκόζης, έχει μικρότερη ειδικότητα ως δείκτης.

Οι μεταβολές των παραμέτρων του ΕΝΥ στις διαφόρου αιτιολογίας μηνιγγίτιδες φαίνονται στον Πίνακα 4.

Πίνακας 4. Διαφοροδιαγνωστική προσέγγιση μηνιγγίτιδας από ανάλυση ΕΝΥ

	Λευκά	Γλυκόζη	Λεύκωμα
Φυσιολογικά	<10 ή <30 (νεογνά) (70% ΛΕΜΦ)	Gl ΕΝΥ/Gl ορού: <0,6	20-50 mg/dl
Μικροβιακή μηνιγγίτις Άσηπτος μηνιγγίτις	(ΠΛΜ υπερτερούν) (αρχικά ΠΛΜ, αργότερα ΛΕΜΦ)	Gl ΕΝΥ/Gl ορού: <0,4 Φυσιολογική έως λίγο χαμηλή	Αυξημένο Φυσιολογικό ή ελαφρά αυξημένο
Φυματιώδης μηνιγγίτις	(αρχικά ΠΛΜ, αργότερα ΛΕΜΦ)	Χαμηλή (<50 mg/dl)	Αυξημένο (>100 mg/dl)

ΠΛΜ= πολυμορφοπύρηνα, ΛΕΜΦ=λεμφοκύτταρα, Gl=γλυκόζη

Μικροβιολογική εξέταση

Στη μικροβιολογική εξέταση του ΕΝΥ περιλαμβάνονται: η μικροσκοπική εξέταση (άμεσο), η καλλιέργεια καθώς και οι ταχείες μέθοδοι (αναζήτηση μικροβιακών αντιγόνων και μοριακές τεχνικές).

Μικροσκοπική εξέταση ΕΝΥ (άμεσο παρασκεύασμα)

Το άμεσο παρασκεύασμα πρέπει να γίνεται σε όλα τα δείγματα ΕΝΥ, διότι οι άλλες παράμετροι σε μικροβιακή μηνιγγίτιδα πιθανόν να είναι μέσα στα φυσιολογικά πλαίσια. Στην καθημερινότητα γίνεται παρασκεύασμα βαμμένο με χρώση κατά Gram και κατά περίπτωση γίνονται: Χρώση Ziehl – Nielsen για αναζήτηση μυκοβακτηριδίων, νωπό παρασκεύασμα με αρνητική χρώση (σινική μελάνη) για αναζήτηση κρυπτοκόκκων ή φθορίζουσα χρώση (auramine – Rhodamine ή acridine orange) η οποία έχει και μεγαλύτερη ευαισθησία. Τέλος, για αναζήτηση παρυσίτων γίνεται νωπό παρασκεύασμα χωρίς χρώση.

Η γενική ευαισθησία της χρώσης κατά Gram για τη διάγνωση της μηνιγγίτιδας κυμαίνεται από 20-90%, αλλά αν έχει προηγηθεί χορήγηση αντιβιοτικού η ευαισθησία της μειώνεται⁷. Εξαρτάται αφενός από τη συγκέντρωση των μικρο-

βίων στο ΕΝΥ (όταν το μικροβιακό φορτίο είναι $\leq 10^3$ η ευαισθησία είναι 25%, ενώ όταν είναι $\geq 10^5$, 97%) και αφετέρου από το μικρόβιο. Στον Πίνακα 5 φαίνεται η ευαισθησία του άμεσου ΕΝΥ με χρώση κατά Gram αναλόγως του μικροοργανισμού⁷.

Η τεχνική του άμεσου παρασκευάσματος ΕΝΥ για χρώση κατά Gram είναι η εξής: κυτταροφυγοκέντρωση 1200 στροφές 5-10'. Η κυτταροφυγοκέντρωση αυξάνει 100 φορές την ευαισθησία του άμεσου παρασκευάσματος σε σύγκριση με αφυγοκέντρητο ή φυγοκεντρημένο με τη συμβατική φυγόκεντρο δείγμα, δηλαδή εάν έχουμε 1 ml ΕΝΥ είναι σαν να είχαμε 100 ml¹². Ελλείψει κυτταροφυγοκέντρου μπορεί να γίνει φυγοκέντρωση (3500 στρ 20'). Στην περίπτωση αυτή είναι καλό να εφαρμόσουμε την τεχνική της «παχείας σταγόνας»⁴ δηλαδή να τοποθετήσου-

Πίνακας 5. Ευαισθησία άμεσου ΕΝΥ σε μηνιγγίτιδες με χρώση κατά Gram

Μηνιγγίτις	Ευαισθησία
Πνευμονιοκοκκική μηνιγγίτις	90%
Μηνιγγίτις από <i>H influenzae type b</i>	85%
Μηνιγγιτιδοκοκκική μηνιγγίτις	75%
Μηνιγγίτις από <i>L. monocytogenes</i>	50%
Μηνιγγίτις από Gram (-) βακτηρίδια	30-50%
Μυκητιασική μηνιγγίτις	20-70%

με μια σταγόνα σε πλακάκι καθαρό, χωρίς άπλωμα. Όταν στεγνώσει να τοποθετήσουμε στο ίδιο σημείο και 2η σταγόνα κ.ο.κ. Η ιδιαίτερη προσωπική μας φροντίδα τέλος θα συμβάλει ώστε να πετύχουμε ένα καλό και αξιόπιστο άμεσο παρασκεύασμα (επιμελής ανασύσταση του ιζήματος –στην περίπτωση που δεν έχουμε κυτταροφυγόκεντρο–, χρησιμοποίηση καθαρής αντικειμενοφόρου πλάκας, αποφυγή μονιμοποίησης στη φλόγα της λυχνίας Bunsen αλλά με μεθανόλη, φυσικό στέγνωμα στον αέρα). Επίσης, αν το δείγμα περιέχει πήγμα ινικής, πρέπει να γίνει άμεσο παρασκεύασμα και από αυτό, αφού προηγηθεί ομογενοποίησή του⁴. Η μικροσκοπική εξέταση του ΕΝΥ συχνά παρουσιάζει αρκετές δυσκολίες και απαιτεί εμπειρία, υπομονή και αφιέρωση αρκετού χρόνου μικροσκόπησης του παρασκευάσματος. Σε θετικό αποτέλεσμα δίνεται αμέσως το αποτέλεσμα στην κλινική με περιγραφικούς όρους π.χ. Gram θετικός διπλόκοκκος ή Gram αρνητικό κοκκοβακτηρίδιο με πολυμορφισμό κ.λπ.

Καλλιέργεια ΕΝΥ

Η γενική ευαισθησία⁷ της καλλιέργειας ΕΝΥ είναι 75-85% και η ειδικότητα: 100%. Αν έχει προηγηθεί χορήγηση αντιβιοτικού, η ευαισθησία της μειώνεται <50%.

Το δείγμα δεν χρειάζεται φυγοκέντρηση αν ο όγκος του είναι $\leq 0,5$ ml αλλά εμβολιασμό όλου του δείγματος², ενώ εάν ο όγκος του είναι $>0,5$ ml συνιστάται να γίνεται συμπύκνωση σε όγκο 0,5 ml, κατόπιν φυγοκέντρησης στις 3500 στρ για 20'. Στην περίπτωση που το δείγμα είναι ελάχιστο, ρίχνουμε 0,5 ml ζωμό μέσα στο σωληνάριο, ανακατεύουμε και μετά εμβολιάζουμε τα τρυβλία². Βελτίωση της ευαισθησίας της καλλιέργειας πετυχαίνουμε με την ιδιαίτερη φροντίδα του δείγματος (επιμελής ανασύσταση μετά τη φυγοκέντρηση με προσεκτική αποκόλληση από τα τοιχώματα με αποστειρωμένη πιπέτα υπό άσηπτες συνθήκες). Εμβολιάζουμε σε σοκολατόχρωμο και αιματούχο άγαρ από 1-2 σταγόνες. Για να εξουδετερωθεί η δράση αντιβιοτικών, που ενδεχομένως έχει λάβει ο ασθενής και που θα αναστείλουν την

ανάπτυξη των μικροβίων, αφήνουμε τις σταγόνες να στεγνώσουν, και μετά τις απλώνουμε. Τα τρυβλία επωάζονται για 4-7 ημέρες στους 35°-37°C σε ατμόσφαιρα 5% CO₂. Εάν υπάρχει πήγμα ινικής, αφού προηγηθεί ομογενοποίησή του, πρέπει να περιλαμβάνεται στο inoculum, τουλάχιστον στο σοκολατόχρωμο άγαρ⁴.

Κατά περίπτωση πιθανόν να χρειαστεί να εμβολιάσουμε θρεπτικό ζωμό, όπως όταν είναι ελάχιστο το δείγμα ή όταν προέρχεται από εμφύτευμα παροχέτευσης κοιλιών^{2,4} (shunt), οπότε τότε εμβολιάζουμε 1 ml ΕΝΥ. Προτιμητέος είναι ο ΒΗΙΒ ή ο ΤSB. Επίσης κατά περίπτωση εμβολιάζουμε ζωμό Sabouraud.

Σε θετική καλλιέργεια ΕΝΥ ακολουθεί ταυτοποίηση με τις συμβατικές μεθόδους του εργαστηρίου. Ακολουθεί καθορισμός οροτύπου ή οροομάδος για *S. pneumoniae*, *H. influenzae* και *N. meningitis* ή αποστολή στα ανάλογα κέντρα για την ορολογική τυποποίηση, καθώς και αντιβιογράμματα ανάλογα με το είδος του μικροβίου που θα αναπτυχθεί.

Αξιολόγηση καλλιέργειας και απάντηση

Η αξιολόγηση αποτελεί την πιο σημαντική φάση της καλλιέργειας και χρειάζεται προσοχή. Αξιολογούμε τους μικροοργανισμούς που αναπτύσσονται ανάλογα με τον τρόπο λήψης του δείγματος καθώς και το ιστορικό. Συνήθως τα είδη που απομονώνονται σε δείγματα κατόπιν ΟΝΠ σε οξεία νόσο είναι τυπικά μηνιγγιτιδογόνα μικρόβια αν και σε ορισμένες σπάνιες περιπτώσεις δεν είναι τα αναμενόμενα για την ηλικία ή τους προδιαθεσικούς παράγοντες του ασθενούς. Στον Πίνακα 6 βλέπουμε τα συνήθη μικροβιακά αίτια οξείας μηνιγγίτιδας της κοινότητας κατά ηλικία.

Για την αξιολόγηση στην περίπτωση ΕΝΥ από εμφύτευμα παροχέτευσης (shunt) είναι αναγκαία οπωσδήποτε η επικοινωνία με τον κλινικό ιατρό και δεν θα πρέπει να ξεχνάμε ότι οι coagulase αρνητικοί *staphylococci*, τα *Corynebacterium* spp καθώς και τα *Propionobacterium* spp μολονότι δεν αποτελούν αίτια μηνιγγίτιδας της κοινότητας, αν

Πίνακας 6. Συνήθη μικροβιακά αίτια οξείας μηνιγγίτιδας της κοινότητας κατά ηλικία²

Ηλικία	Μικροοργανισμοί
Νεογνά	<i>E. coli</i> , <i>S. agalactiae</i> , <i>L. monocytogenes</i>
<2 μηνών	<i>S. agalactiae</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>E. coli</i>
<10 ετών	<i>H. influenzae</i> , <i>S. pneumoniae</i> , <i>N. meningitis</i>
Νέοι ενήλικες	<i>N. meningitis</i>
Ενήλικες	<i>S. pneumoniae</i> , <i>N. meningitis</i>
Υπερήλικες	<i>S. pneumoniae</i> , Gram(-) βακτηρ, <i>L. monocytogenes</i>

απομονωθούν από ασθενείς με shunt αξιολογούνται ως κύρια παθογόνα. Στον Πίνακα 7 έχουμε τα αναμενόμενα μικρόβια που απομονώνονται σε καλλιέργεια ΕΝΥ από shunt¹³.

Τόσο η προκαταρκτική όσο και η τελική ενημέρωση της κλινικής αποτελούν πολύ σημαντικό έργο που πρέπει να γίνεται άμεσα και υπεύθυνα. Την απάντηση για το άμεσο παρασκεύασμα και τα στοιχεία της γενικής ΕΝΥ, έχουμε την υποχρέωση να την δώσουμε αμέσως τηλεφωνικά ή ηλεκτρονικά, εφόσον υπάρχει τέτοια δυνατότητα. Η προκαταρκτική αυτή απάντηση ανήκει στις ονομαζόμενες «τιμές πανικού» και το ιδανικό είναι να δοθεί εντός μιας ώρας⁴. Μέσα στις 4-5 επόμενες ημέρες από τη λήψη του δείγματος θα σταλεί γραπτώς η ολοκλη-

ρωμένη απάντηση γενικής και καλλιέργειας, περιλαμβανομένου του αντιβιογράμματος.

Ανίχνευση μικροβιακών αντιγόνων (Ag)

Από τα τέλη της δεκαετίας του '70 έγιναν εμπορικά διαθέσιμες οι μέθοδοι ανίχνευσης μικροβιακών Ag στο ΕΝΥ (επισυγκόλληση σταφυλοκόκκου και latex) οι οποίες είχαν αξιολογηθεί από πολλούς ερευνητές^{14,15} να έχουν μεγαλύτερη ευαισθησία για τον *H. influenzae type b* (85-88,3%) και μικρότερη για την *N. meningitidis* (61,7-67%). Σε νεότερες μελέτες η ευαισθησία τους βρέθηκε μικρότερη^{16,17}.

Σε περιπτώσεις μηνιγγίτιδας με αρνητικό άμεσο παρασκεύασμα και αρνητική καλλιέργεια εκτιμήθηκε ότι μπορεί να προσφέρουν βοήθεια σε 5-9 % των περιπτώσεων^{7,17}. Μετά τη δραματική μείωση των περιστατικών μηνιγγίτιδας από *H. influenzae type b* ως αποτέλεσμα του εμβολιασμού και λόγω του υψηλού κόστους τους, σήμερα δεν συνιστάται η ανίχνευση μικροβιακών αντιγόνων να γίνεται σε ρουτίνα παρά σε ορισμένες περιπτώσεις, όπως σε ανοσοκατεσταλμένους ή σε ασθενείς που έχει γίνει προηγουμένως χορήγηση αντιβιοτικών ή σε αυξημένο αριθμό λευκών και αρνητική Gram^{4,7}.

Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase chain reaction) (PCR)

Η ανάπτυξη της μεθοδολογίας της PCR έχει κάνει διαθέσιμη σήμερα την ταυτόχρονη α-

Πίνακας 7. Μικρόβια που απομονώνονται από καλλιέργεια ΕΝΥ από shunt

- Κοαγκουλάση (-) σταφυλόκοκκοι (CNS)
- *S. aureus*
- Εντεροβακτηριακά
- Κορνοβακτηρίδια (κυρίως JK)
- *Propionobacterium acnes*
- Εντερόκοκκοι
- *H. influenzae*
- *N. meningitidis*
- Ψευδομονάδες
- Στρεπτόκοκκοι
- Μύκητες
- Μυκοβακτηρίδια
- Αναερόβια

Πίνακας 8. Αξιολόγηση άμεσου χρωματισμένου παρασκευάσματος (Gram), καλλιέργειας και PCR (για *N. meningitis*, και *S. pneumoniae*)¹⁸

	Test	Ευαισθησία (%)	Ειδικότητα (%)	ΑΠΑ (%)	ΘΠΑ (%)
<i>N. meningitis</i> n=23	PCR	87	96	94	91
	άμεσο	27	100	74	100
	Καλλιέργεια	17	100	71	100
<i>S. pneumoniae</i> n=14	PCR	100	100	100	100
	άμεσο	62	100	92	100
	Καλλιέργεια	36	100	86	100

ΑΠΑ= αρνητική προγνωστική αξία, ΘΠΑ= θετική προγνωστική αξία

νίχνευση στο δείγμα των τεσσάρων κύριων μηνιγγιτιδογόνων μικροβίων: *N. meningitis*, *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, *Listeria* (Multiplex PCR). Η ανίχνευση του βακτηριακού DNA είναι δυνατή και μετά από χορήγηση αντιβιοτικών (μέχρι και 3 δόσεις), καθώς και στις περιπτώσεις όπου αντενδείκνυται να γίνει ΟΝΠ λόγω πολύ βαριάς κατάστασης του ασθενούς ή πιθανής αιμορραγίας, οπότε γίνεται από το αίμα. Σήμερα θεωρείται η μέθοδος εκλογής για μικρόβια που είναι δύσκολο να καλλιεργηθούν και πιθανόν σε ορισμένες περιπτώσεις να αποτελούν αίτιο μηνιγγίτιδας π.χ. *Borrelia*, *Ehrlichia*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycoplasma*.

Στον Πίνακα 8 φαίνεται η αξιολόγηση άμεσου χρωματισμένου παρασκευάσματος (Gram), καλλιέργειας και real-time PCR (για *N. meningitis*, και *S. pneumoniae*) σε 37 ασθενείς με επιβεβαιωμένη διάγνωση μηνιγγίτιδας από μια μελέτη σε νοσοκομείο του Βελγίου¹⁶. Σε άλλες μελέτες ή η ευαισθησία της ανευρέθη ακόμα πιο υψηλή ή και 100%. Η αξιολόγηση της Multiplex PCR στη χώ-

ρα μας από το Εθνικό Κέντρο Αναφοράς Μηνιγγίτιδας¹⁹ (ΕΚΑΜ) φαίνεται στον Πίνακα 9 και στον Πίνακα 10 η αξιολόγηση της ταυτόχρονης ανίχνευσης *H. influenzae*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* και *Streptococcus spp.*, μέθοδος που μπορεί να χρησιμοποιηθεί και σε άλλα βιολογικά υγρά²⁰. Η εφαρμογή των μοριακών τεχνικών έχει συμβάλει πολύ στη μελέτη της επιδημιολογίας των μηνιγγιτιδών και η PCR σήμερα αποτελεί μια πολύτιμη μέθοδο υψηλής ευαισθησίας και ειδικότητας που εξασφαλίζει γρήγορα αποτελέσματα. Η υψηλή αρνητική αξία της μεθόδου προσφέρει σημαντική βοήθεια στον κλινικό γιατρό να αποκλείσει τη μικροβιακή μηνιγγίτιδα ώστε να μη χορηγηθεί ή να μη συνεχιστεί άσκοπα στον ασθενή η χορήγηση αντιβιοτικού.

Αναζήτηση άλλων μικροοργανισμών στο ΕΝΥ

Αν ζητούνται καλλιέργειες για πολλά είδη μικροοργανισμών χρειάζεται μεγαλύτερος όγκος δείγματος για να επιτύχουμε τις καλλιέρ-

Πίνακας 9. Αξιολόγηση της μεθόδου Multiplex PCR σε 425 κλινικά δείγματα¹⁹ (ΕΚΑΜ)

Μικροοργανισμός	Ευαισθησία (%)	ΑΠΑ (%)	ΘΠΑ (%)
<i>N. meningitis</i>	93,9	99,1	100
<i>S. pneumoniae</i>	92,3	99,1	100
<i>H. influenzae</i>	88,0	100	100

Πίνακας 10. Αξιολόγηση της μεθόδου Multiplex PCR (EKAM)²⁰

Μικροοργανισμός	Ευαισθησία (%)	ΑΠΑ (%)	ΘΠΑ (%)
<i>H. influenzae</i>	94,3	98,21	100
<i>P. aeruginosa</i>	100	98,1	100
<i>S. aureus</i>	100	98,1	100
<i>Streptococcus spp</i>	100	98,1	100

ΑΠΑ=αρνητική προγνωστική αξία, ΘΠΑ=θετική προγνωστική αξία

γίες αυτές με τη μέγιστη δυνατή ευαισθησία. Καλλιέργειες για μύκητες και για *M. tuberculosis* σπανίως ζητούνται σε οξεία μηνιγγίτιδα. Ως ελάχιστος όγκος για κάθε μία από τις καλλιέργειες αυτές θεωρούνται τα 2 ml⁴. Ωστόσο, σε μελέτη επί όγκου δείγματος 10ml, η ευαισθησία της καλλιέργειας για *M. tuberculosis* έχει υπολογιστεί 30% ενώ η ευαισθησία του άμεσου χρωματισμένου παρασκευάσματος κατά Ziehl – Nielsen 10-25%². Η μέθοδος που συνιστάται για τη διάγνωση φυματιώδους μηνιγγίτιδας είναι η PCR, της οποίας η ευαισθησία εκτιμάται ως 100%.

Όσον αφορά τις μυκητιασικές μηνιγγίτιδες, για την περίπτωση του *Cryptococcus neoformans* η ευαισθησία του άμεσου παρασκευάσματος με υδατικό διάλυμα σινικής μελάνης υπολογίζεται 50%, ενώ πολύ καλύτερη μέθοδος διάγνωσης είναι η ανίχνευση του κρυπτοκοκκικού Ag που όταν γίνεται στο αίμα η ευαισθησία έχει εκτιμηθεί ως 100% και στο ENY ως 98%². Με διαδοχικές αραιώσεις γίνεται και ποσοτική εκτίμηση που είναι χρήσιμη για την παρακολούθηση της πορείας της νόσου. Για την περίπτωση μηνιγγίτιδας από *Coccidioides immitis* η ευαισθησία της καλλιέργειας έχει υπολογιστεί 30%, γι' αυτό διαγνωστικώς συνιστώνται οι ορολογικές μέθοδοι ανίχνευσης αντισωμάτων στον ορό που έχουν ευαισθησία 100%². Για την εργαστηριακή διάγνωση μηνιγγίτιδας από το *Histoplasma capsulatum*, η οποία όπως και η μηνιγγίτιδα από τον *Coccidioides immitis* εμφανίζεται σε ορισμένες γεωγραφικές περιοχές, συνιστάται καλλιέργεια αίματος ή μυελού των οστών².

Ταυτοποίηση υγρού ως ENY

Σε περιπτώσεις ωτόρροιας ή ρινόρροιας επί συγγενών ανατομικών ανωμαλιών (π.χ. ηθμοειδοκήλη) καθώς και επί κακώσεων των οστών του κρανίου μπορεί να ζητηθεί από το εργαστήριο η ταυτοποίηση του υγρού ως ENY. Η διαφορική διάγνωση ENY – ρινικού εκκρίματος βασίζεται στον προσδιορισμό του καλίου που στο ENY είναι σταθερά χαμηλό (3 mEq/l) ενώ στο ρινικό 17 meq) και στον προσδιορισμό της γλυκόζης (ENY: 49-75 mg/dl, ρινικό: έως 10 mg/dl)⁶. Η αξιοπιστία της διαφορικής διάγνωσης βάσει αυτών των δύο παραμέτρων είναι καλή αν το υγρό δεν είναι αιμορραγικό. Μέθοδος πολύ υψηλής ευαισθησίας για τη διαφορική διάγνωση είναι η ανίχνευση της B2 τρανσφερίνης με ηλεκτροφορητική μέθοδο, η οποία ανιχνεύεται μόνο στο ENY²¹.

Διεύθυνση Επικοινωνίας:

Ελένη Αλεξάνδρου-Αθανασούλη
 Βιοπαθολόγος, Κλινικός Μικροβιολόγος
 Διευθύντρια Μικροβιολογικού Τμήματος
 Νοσ. Παίδων «Η Αγία Σοφία»

Summary

CSF is a “precious” medical specimen

ELENI ALEXANDROU-ATHANASOULI

Department of Clinical Microbiology
 “Agia Sophia” Children’s Hospital-Athens
 Applied Clinical Microbiology

The laboratory examination of cerebrospinal fluid is of great significance in the early diagnosis of acute bacterial meningitis. This review is a brief presentation of the entire procedure of the investigation of CSF, from the lumbar puncture throughout the common laboratory procedure and the evaluation for the diagnostic approach of bacterial meningitis.

(Key words: CSF collection, transport and processing).

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Εγχειρίδιο ορισμών κρούσματος για υποχρεωτική δήλωση νοσημάτων κατά την πιλοτική εφαρμογή. Σχέδιο 2. Κέντρο Ελέγχου Ειδικών Λοιμώξεων. Αθήνα, 2003.
2. **Isenberg HD.** Clinical Microbiology Procedures Handbook 2th ed. American Society for Microbiology. Washington DC, 2004.
3. **Gray LD, Fedorko DP.** Laboratory Diagnosis of Bacterial Meningitis. Clin Microbiol Rev 1992, 5: 130-145.
4. BSOP 27, National Standard Methods. Investigation of Cerebrospinal fluid. Health Protection Agency, London 2009.
5. Specimen Collection and Handling in: Murrey PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RC. Manual of Clinical Microbiology. American Society for Microbiology. Washington DC, 9th ed 2007.
6. **Wallach J.** Central and Peripheral Nervous System Disorders p. 263-274 In: Interpretation of Diagnostic Tests. 7th ed. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia, USA 2000.
7. **Tunkel AR, Scheld WM.** Acute meningitis in: Mandel, Douglas and Bennett's. Principles and Practice of Infectious Disease. 7th ed, p. 1183-1214. Churchill & Livingstone Inc, New York, USA 2010.
8. **Ελένη Αλεξάνδρου-Αθανασούλη.** Εργαστηριακή διάγνωση μικροβιακής μηνιγγίτιδας. Εφαρμ Κλιν Μικροβ Εργ Διαγν 2008, Περ Β' 13 (3): 142-153.
9. **Αρσένη Α.** Εγκεφαλονωτιαίο υγρό από: Γενικές εξετάσεις και καλλιέργειες, Εξετάσεις των Υγρών του Σώματος. 2η Εκδ. Ζήτα, Αθήνα 2000.
10. **Steele RW, Marmer DJ, O'Brien MD, Tyson ST, Steele CR.** Leucocyte survival in cerebrospinal fluid. J Clin Microbiol 1986, 23: 965-966.
11. **Coll MT, Uriz MS, Pineda V, Fontals D, Bella F, Nava JM et al.** Meningococcal meningitis with "normal" cerebrospinal fluid. J Infec 1994, 29: 289-294.
12. **Shanholtzer CJ, Scaper PJ, Peterson LR.** Concentrated Gram stain smears prepared with cytospin Centriguge. J Clin Microb 1982, 16: 1052-1056.
13. BSOP 22, National Standard Methods. Investigation of Cerebrospinal fluid Shunts. Health Protection Agency, London 2009.
14. **Thirumoorth MC, Dajani AS.** Comparison of staphylococcal coagulation, latex agglutination and counterimmunoelectrophoresis for bacterial antigens detection. J Clin Microbio 1979, 9: 28-32.
15. **Tilton RC, Dias F, Ryan RW.** Comparative evaluation of three commercial products and counterimmunoelectrophoresis for the detection of antigens in cerebrospinal fluid. J Clin Microbiol, 1984, 20: 231-234.
16. **Perkins MD, Mirett S, Reller LB.** Rapid bacterial antigen detection is not clinically useful. J Clin Microbiol, 1995, 33: 1486-1491.
17. **Hussein AS, Safran SD.** Acute bacterial meningitis in adults. A 12-year review. Medicine, 2000, 79: 360-368.
18. **Van Gastel E, Bruynseels P, Vestrepen W.** Evaluation of a real-time polymerase chain reaction assay for the diagnosis of pneumococcal and meningococcal meningitis in a tertiary care hospital. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2007, 26: 651-653.
19. **Tzanakaki G, Tsopanomichalou M, Kesanopoulos K, Matzourani R, Sioumalas M, Tabaki, Kremastinou J.** Simultaneous single - tube PCR assay for the detection *N. meningitis*, *H. influenzae type b* and *S. pneumoniae*. Clin Microbiol Infect, 2005, 11: 386-390.
20. **Xirogianni A, Tzanakaki G, Karagianni E, Markoulatos P, Kourea-Kremastinou J.** Development of a single tube PCR assay for the simultaneous detection of Haemophilus influenzae, Pseudomonas aeruginosa Staphylococcus aureus and Streptococcus spp. Diagn Microbiol Infect Dis 2009, 63: 121-126.
21. **Normansell DE, Stacy EK, Booker CF, Butler TZ.** Detection of beta 2 -trasferrin in otorrhea and rhinorrhea in a routine clinical Laboratory setting. Clin Diagn Lab Immunol, 1994, 1: 68-70.

ΤΟ ΔΕΙΓΜΑ ΤΩΝ ΟΥΡΩΝ ΣΤΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΤΗΣ ΟΥΡΟΛΟΙΜΩΞΗΣ

ΕΥΑΓΓΕΛΙΑ ΛΕΜΠΕΣΗ

Στο άρθρο που ακολουθεί υπογραμμίζεται η σημασία του σωστού δείγματος ούρων, στη διάγνωση των ουρολοιμώξεων. Αναφέρονται τα κλινικά στοιχεία και η εργαστηριακή διερεύνηση που ακολουθεί. Επίσης τα μικροβιακά αίτια και η αξιολόγηση των εξετάσεων σε ασθενείς διαφόρων ηλικιών (νεογνών-βρεφών, παιδιών, ενηλίκων).

(Λέξεις ευρετηρίου: δείγμα ούρων, εργαστηριακή εξέταση, αξιολόγηση αποτελεσμάτων, ουρολοιμώξη).

Εισαγωγή

Φυσιολογικά το ουροποιητικό σύστημα είναι στείρο μικροβίων, με εξαίρεση το έξω στόμιο της ουρήθρας. Τα ούρα αποτελούν καλό θρεπτικό υλικό για τον πολλαπλασιασμό των μικροβίων. Όμως η αυξημένη συγκέντρωση ουρίας και οργανικών οξέων, η υπερωσμωτικότητα και το όξινο pH αποτελούν ανασταλτικούς παράγοντες στην ανάπτυξη των μικροβίων, οι οποίοι μαζί με μηχανικούς παράγοντες, όπως είναι η συνεχής ροή των ούρων, και μαζί με τις αντιμικροβιακές ιδιότητες των ουροεπιθηλίων συμβάλλουν στη διατήρηση της στειρότητας του συστήματος. Στη διαδικασία αυτή συμμετέχουν και διάφοροι αναστολείς της προσκόλλησης των βακτηρίων, όπως: η Tamm-Horsfall πρωτεΐνη, βλεννοπολυ-

σακχαρίτες, η SIgA (εκκριτική ανοσοσφαιρίνη IgA) και η λακτοφερρίνη.

Βακτηριουρία συμβαίνει όταν τα βακτήρια καταφέρουν να εισέλθουν και να παραμείνουν στο στείρο ουροποιητικό σύστημα, ακολουθώντας μια από τις παρακάτω οδούς:

1. **Ανιούσα:** Σχεδόν όλες οι ουρολοιμώξεις είναι ανιούσες. Τα βακτήρια προέρχονται από την εντερική χλωρίδα, αποικίζουν το περίνεο και εισέρχονται στην κύστη μέσω της ουρήθρας. Σε ορισμένες περιπτώσεις αυτά ανέρχονται προς το νεφρό μέσω των ουρητήρων και προκαλούν πυελονεφρίτιδα.

2. **Αιματογενής:** Η λοίμωξη μπορεί να προκληθεί αιματογενώς σε σπάνιες περιπτώσεις που αφορούν παιδιά ανοσοκατεσταλμένα ή νεογνά, τα οποία δεν έχουν αναπτύξει ακόμη ώριμο ανοσοποιητικό σύστημα. Τα υπεύθυνα μικρόβια συνήθως είναι *S. aureus*, *Candida spp*, και σπανιότερα *M. tuberculosis*.

3. **Λεμφική:** Δεν έχει σημαντικό μέρος, μπορεί να συμβεί σε εξαιρετικά σπάνιες καταστάσεις, όπως σοβαρή λοίμωξη του εντέρου ή οπισθοπεριτοναϊκά αποστήματα.

4. **Κατ' επέκταση:** Άμεση επέκταση μπορεί να συμβεί μόνο όταν υπάρχει επικοινωνία μεταξύ εντέρου ή κόλπου και ουροποιητικού συστήματος.

Ως **βακτηριουρία** ορίζεται η παρουσία βακτηρίων στα ούρα λόγω αποικισμού ή λοίμωξης του ουροποιητικού συστήματος, εφόσον έχει αποκλειστεί η πιθανότητα επιμόλυνσης του δείγματος. Ο όρος «σημαντική βακτηριουρία» έχει κλινική υπόσταση και χρησιμοποιείται για να περιγράψει τον αριθμό των βακτηρίων σε δείγμα ούρων που ελήφθη με υπερηβική παρακέντηση, καθετηριασμό ή μέσο ρεύμα και ο οποίος αριθμός ξεπερνάει εκείνον που μπορεί να οφείλεται σε επιμόλυνση από το δέρμα, την ουρήθρα, την ακροποσθία ή τον κόλπο, αντίστοιχα. Γι' αυτό αντιπροσωπεύει συνήθως επεισόδιο ουρολοίμωξης. Στη δεκαετία του 1950 ως σημαντική βακτηριουρία ορίστηκε το όριο των $\geq 10^5$ CFU/ml με μελέτες που έγιναν από τον Kass και συν. (1956). Αργότερα στη δεκαετία του 1980 ακολουθήσαν σχετικές μελέτες των Stamm και συν. (1980, 1982) που διαπίστωσαν την κλινική σημασία της «low count bacteriuria» ($> 10^2 - 10^4$ CFU/ml) στις συμπτωματικές νέες γυναίκες. Αυτές συμπληρώθηκαν με τις μελέτες του Kunin και συν. το 1993 και έτσι αναθεωρήθηκε το όριο των $\geq 10^5$ CFU/ml. Σήμερα θεωρούμε ότι η εκτίμηση της σημαντικής βακτηριουρίας εξαρτάται από:

- Τα κλινικά σημεία και συμπτώματα του ασθενούς
- Τη μέθοδο συλλογής των ούρων και
- Το είδος του απομονωθέντος βακτηρίου

Η διαπίστωση σημαντικής βακτηριουρίας δεν αρκεί για τη διάγνωση της ουρολοίμωξης, διότι ως ουρολοίμωξη ορίζεται η φλεγμονώδης απάντηση του ουροεπιθηλίου στην είσοδο του μικροοργανισμού, με συνέπεια την πρόκληση πυουρίας.

Μικροβιακά αίτια

Στην ουρολοίμωξη συχνότερα εμπλέκονται οι παρακάτω μικροοργανισμοί:

- Gram αρνητικά βακτηρίδια (τα πλέον σημαντικά ουροπαθογόνα)

Escherichia coli (75-90%), *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter* spp, *Citrobacter* spp

- Gram θετικοί κόκκοι

Enterococcus spp, *Staphylococcus saprophyticus*, *Streptococcus* Group B, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus bovis*, *Aerococcus* spp

- *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*

Σπανιότερα εμπλέκονται οι ακόλουθοι μικροοργανισμοί:

- Gram αρνητικοί κόκκοι: *Neisseria gonorrhoeae*
- Αναερόβιοι μικροοργανισμοί
- Ιοί: αδενοϊοί (τύποι 11 και 21) και BK (οξεία αιμορραγική κυστίτιδα)
- *Ureoplasma urealyticum*, *Mycoplasma hominis*, *Gardnerella vaginalis*
- *Corynebacterium urealyticum* (πρώην *Corynebacterium* group D2)
- *Haemophilus influenzae*, *Haemophilus parainfluenzae*
- *M. tuberculosis*

Η κατανομή των μικροοργανισμών μεταβάλλεται ανάλογα με τον τύπο της λοίμωξης (ενδο-νοσοκομειακή / εξωνοσοκομειακή) και το υποκείμενο νόσημα (διαβήτης, νευρογενής κύστη κ.ά.).

Διάγνωση

Η διάγνωση της ουρολοίμωξης βασίζεται στην:

1. Κλινική εκτίμηση (ιστορικό και φυσική εξέταση) και την
2. Εργαστηριακή διερεύνηση
 - Γενική ούρων και
 - Καλλιέργεια ούρων

Στη γενική ούρων ενδιαφέρον παρουσιάζουν τρία κυρίως στοιχεία (λευκοκυτταρική εστερά-

ση, αναγωγή των νιτρικών, μικροσκοπική εξέταση), με τα οποία θα διαπιστωθεί η πυουρία και βακτηριουρία και θα τεθεί γρήγορα η αρχική διάγνωση της ουρολοίμωξης. Για τη γενική ούρων προτιμώνται τα πρώτα πρωινά ούρα μέσου ρεύματος, τα οποία πρέπει να εξετάζονται μέσα σε 1-2 ώρες.

Η **πυουρία** ελέγχεται με τις παρακάτω μεθόδους:

1. **Λευκοκυτταρική εστεράση (LE)**, ένζυμο που παράγεται κυρίως από τα ουδετερόφιλα, αλλά και από τα μονοκύτταρα, ηωσινόφιλα και βασεόφιλα. Ανιχνεύεται αξιόπιστα με τις ταχυδιαγνωστικές αντιδραστήριες ταινίες με ευαισθησία 74-96% και ειδικότητα 94-98%. Μπορεί να είναι ψευδώς αρνητική σε οριακά επίπεδα (5-10 WBCs/ο.π. 400x), σε υψηλά επίπεδα αλβουμίνης (>300 mg/dl), γλυκόζης (>3 g/dl) και σε παρουσία αντιβιοτικών (αμινογλυκοσίδες, κεφαλοσπορίνες, ιμιπενέμη και τετρακυκλίνες). Σπάνια μπορεί να είναι ψευδώς θετική, όταν υπάρχουν στο δείγμα πολλά ηωσινόφιλα ή τριχομονάδες (παράγουν εστεράση) ή διάφορες χρωστικές (νιτροφουραντοΐνη, παντζάρια).

2. **Μικροσκόπηση του ιζήματος των ούρων**, με την οποία εκτός από τα λευκοκύτταρα (WBCs) θα εξετασθούν και άλλα έμμορφα στοιχεία (ερυθροκύτταρα, κύλινδροι), τα οποία θα βοηθήσουν στην εκτίμηση της ουρολοίμωξης. Ως πυουρία ορίζεται η παρουσία >10 WBCs/ο.π. 400x (ευαισθησία 37% και ειδικότητα 90%).

3. **Μικροσκόπηση αφυγοκέντρησης ούρων**. Η μέθοδος προτιμάται για την εκτίμηση της πυουρίας στα βρέφη και τα μικρά παιδιά <2 χρόνων, από τα οποία είναι δύσκολο να παρασκευαστεί ένα αξιόπιστο ίζημα, λόγω χαμηλού ειδικού βάρους και μικρής ποσότητας ούρων. Ως πυουρία ορίζεται αριθμός WBCs >10/μl (ευαισθησία 75-96% και ειδικότητα 94-98%), ενώ ακόμη καλύτερος δείκτης στη διάγνωση της ουρολοίμωξης θεωρείται αριθμός WBCs >10²/μl. Στο εμπόριο διατίθενται οι κατάλληλες ογκομετρικές πλάκες για την αρίθμηση των πυοσφαιρίων σε αφυγοκέντρηση ούρα.

Η **πυουρία ως μοναδικό εύρημα δεν αποτελεί αξιόπιστο δείκτη λοίμωξης**. Διότι πυου-

ρία μπορεί να συμβεί ως αποτέλεσμα φλεγμονής ή άλλων καταστάσεων, (λιθίαση, νεοπλάσματα κύστης, αντίδραση σε φάρμακα, π.χ. κυκλοφωσφάμιδη, χρήση μόνιμου ουροκαθετήρα, λοίμωξη γεννητικού συστήματος, σπειραματονεφρίτιδα / διάμεση νεφρίτιδα). Αλλά και ουρολοίμωξη - χωρίς πυουρία μπορεί να συμβεί σε ουδετεροπενικούς ασθενείς ή σε ουρολοίμωξη από *Proteus* spp, λόγω λύσης των λευκοκυττάρων (αλκαλικό pH).

Η **βακτηριουρία** ελέγχεται με τις παρακάτω μεθόδους:

1. **Ανίχνευση των νιτρωδών (NR)**, τα οποία παράγονται από την αναγωγή των νιτρικών με τη συμμετοχή μιας αναγωγάσης που παράγεται από τα Gram αρνητικά βακτήρια. Χαρακτηρίζεται από υψηλή ειδικότητα (90-100%). Η ευαισθησία κυμαίνεται από 16-82% και αυξάνεται όταν η βακτηριουρία είναι σημαντική ($\geq 10^5$ cfu/ml). Μπορεί να είναι ψευδώς αρνητική όταν το εν λόγω μικρόβιο δεν παράγει NR, σε δίαιτα πτωχή σε λαχανικά, ταχεία κένωση της κύστης (<4h), στάση των ούρων (λόγω μετατροπής των νιτρωδών σε άζωτο), αυξημένο ουροχολινογόνο ή ασκορβικό οξύ (≥ 25 mg/dl). Πιο σπάνια μπορεί να είναι ψευδώς θετική, αν καθυστερήσει η εξέταση του δείγματος (>1h) ή σε παρουσία χρωστικών (phenazopyridine, παντζάρια). LE και NR θετικά: Ευαισθησία 79-95%, Ειδικότητα 82-98%.

2. **Μικροσκόπηση του ιζήματος**

3. **Χρώση Gram σε αφυγοκέντρητα ούρα μέσου ρεύματος**. Απλή, οικονομική και πολύτιμη, παρότι δεν συνηθίζεται στην καθημερινή πρακτική στη χώρα μας λόγω φόρτου εργασίας.

4. **Καλλιέργεια ούρων**

Παρασκευή και αξιολόγηση του ιζήματος

Για την παρασκευή του ιζήματος πρέπει να εφαρμόζεται σταθερό πρωτόκολλο σε κάθε εργαστήριο. Ένα σύνηθες πρωτόκολλο περιλαμβάνει τα παρακάτω:

1. Σωστή ανακίνηση των ούρων

2. Φυγοκέντρηση 10 ml ούρων για 5 min σε 2000 rpm (450 g)

3. Απόρριψη του υπερκείμενου με πιπέτα αφήνοντας 0,5 ml ούρων, και εναιώρηση του ιζήματος (συμπύκνωση 20/1)

4. Τοποθέτηση μιας σταγόνας από το ίζημα σε αντικειμενοφόρο πλάκα και κάλυψη με καλυπτρίδα (22×22mm)

5. Μικροσκόπηση πρώτα με 100× και μετά με 400x τουλάχιστον 20 ο.π.

6. Σύγκριση των ευρημάτων της μικροσκόπησης με εκείνα της ταινίας (LE, NR, Hb)

7. Περιγραφή του αποτελέσματος με τον ίδιο πάντα τρόπο

Παρασκευή και αξιολόγηση της χρώσης κατά Gram

Η χρώση κατά Gram αφυγοκέντρησης ούρων είναι πολύτιμη, απλή και οικονομική εξέταση. Παρ' όλα αυτά τα περισσότερα εργαστήρια δεν την περιλαμβάνουν στην καθημερινή πρακτική. Η τεχνική της έχει ως ακολούθως:

1. Σωστή ανακίνηση των ούρων
2. Μεταφορά 1 σταγόνας ή 10 μl αφυγοκέντρησης ούρων σε αντικειμενοφόρο πλάκα χρησιμοποιώντας αποστειρωμένη πιπέτα Pasteur
3. Στέγνωμα της σταγόνας στον αέρα, χωρίς να την απλώσουμε
4. Μονιμοποίηση του παρασκευάσματος σε θερμαντική πλάκα (60°C)
5. Χρώση κατά Gram με τη γνωστή διαδικασία
6. Εξέταση ≥ 20 ο.π. με καταδυτικό φακό (1000×)

7. Περιγραφή της μορφολογίας του βακτηρίου και αναφορά του αποτελέσματος. Το αποτέλεσμα χαρακτηρίζεται ως **θετικό** ($\geq 10^5$ CFU/ml), όταν παρατηρείται ≥ 1 βακτήριο/ο.π. (Εναισθησία / Ειδικότητα >90%). Η παρουσία πολλών πλακωδών επιθηλίων και μικροβίων διαφορετικής μορφολογίας υποδηλώνει επιμόλυνση και ζητείται νέο δείγμα. Η σημασία της είναι επίσης μεγάλη στην άσηπτη πτυορία.

Καλλιέργεια ούρων

Κανένα στοιχείο της γενικής ούρων δεν έχει την εναισθησία και την ειδικότητα της καλλιέρ-

γειας ούρων, η οποία ως μέθοδος αναφοράς είναι απαραίτητη για την τεκμηρίωση της διάγνωσης και τη σωστή αντιμικροβιακή αγωγή, η οποία θα βασιστεί στο αντιβιογράμμα.

Η αξιοπιστία της καλλιέργειας εξαρτάται από την ποιότητα και τη σωστή επεξεργασία του δείγματος. Το **κατάλληλο δείγμα** είναι ο πρώτος μας στόχος. Κατάλληλο είναι εκείνο το δείγμα που προσεγγίζει σε ποιότητα τα ούρα της κύστης.

Προτιμώνται τα πρώτα πρωινά ούρα ή ούρα που έχουν μείνει στην κύστη τουλάχιστον 4h. Αποφεύγεται η χορήγηση υγρών, με σκοπό την πρόκληση ούρησης. Εξασφαλίζεται άμεση μεταφορά των ούρων στο εργαστήριο και επεξεργασία του δείγματος μέσα σε 10-30min. Το δείγμα μπορεί να συντηρηθεί στο ψυγείο (4°C) για 24h ή με προσθήκη συντηρητικού (βορικό οξύ – ελάχιστη ποσότητα ούρων >3 ml) για 24h-48h.

Το κατάλληλο δείγμα πρέπει να συνοδεύεται και από το **σωστό παραπεμπτικό**. Και για τα δύο το εργαστήριο δίνει γραπτές οδηγίες και εκπαιδεύει το νοσηλευτικό προσωπικό. Στο παραπεμπτικό πρέπει να περιλαμβάνονται τα παρακάτω στοιχεία:

- Ονοματεπώνυμο
- Φύλο
- Ηλικία
- Μέθοδος συλλογής των ούρων
- Χρόνος συλλογής
- Κλινικές πληροφορίες
- Λήψη αντιβιοτικών και υγρών

Οι **μέθοδοι συλλογής** έχουν στόχο να προστατεύσουν το δείγμα από τη μόλυνση των ούρων με τη χλωρίδα της περιοχής. Μικρόβια της ουρήθρας, του κόλπου, του περινέου και του προστάτη μπορεί εύκολα να επιμολύνουν το δείγμα. Κατά σειρά αξιοπιστίας είναι οι ακόλουθες:

1. **Υπερηβική παρακέντηση (ΥΗ)**, η οποία θεωρείται «μέθοδος αναφοράς», είναι όμως επεμβατική. Εφαρμόζεται σχεδόν αποκλειστικά σε νεογνά και βρέφη (<12 μην.) νοσηλεύόμενα στο νοσοκομείο ή όταν ζητείται καλλιέργεια ούρων για αναερόβια μικρόβια. Προηγείται ενυδάτωση του αρρώστου προ μισής ώρας και σχολα-

στική αντισηψία του δέρματος (αλκοολικό διάλυμα 70%).

2. **Άμεσος «in-out» καθετηριασμός**, είναι πολύ χρήσιμος στα βρέφη (<2 χρ.) και εφαρμόζεται εναλλακτικά της ΥΗ. Χαρακτηρίζεται από υψηλή ευαισθησία (95%) και ειδικότητα (99%), όταν η ανάπτυξη είναι >10³ CFU/ml, είναι όμως και αυτή μέθοδος επεμβατική. Γίνεται υπό άσηπτες συνθήκες μετά από επιμελή καθαρισμό της ουρήθρας (απορρίπτονται τα πρώτα ml ούρων). Δεν γίνεται όταν υπάρχει φίμωση και απαγορεύεται στις εγκύους, διότι υπάρχει ένας μικρός κίνδυνος πρόκλησης ουρολοίμωξης (5%) από μικρόβια που τυχόν θα εισέλθουν κατά τον καθετηριασμό στην κύστη.

3. **Λήψη ούρων μέσω ρεύματος (clean-catch)**, είναι και το πλέον σύνηθες δείγμα. Όταν τα ούρα ληφθούν κατάλληλα, αποτελεί ένα αξιόπιστο δείγμα με υψηλή ευαισθησία (89%) και ειδικότητα (95%). Στις γυναίκες προηγείται επιμελής καθαρισμός της περιουρηθρικής περιοχής και του περινέου με σαπούνι και νερό (2-3 γάζες από μπροστά προς τα πίσω και ξέπλυμα με νερό), απομακρύνονται τα μεγάλα χείλη και αρχίζει η ούρηση (απορρίπτονται τα πρώτα ml ούρων). Στους άνδρες αποκαλύπτεται η βάλανος και πλένεται σχολαστικά μαζί με την ουρήθρα. Δίνονται γραπτές οδηγίες ή και προφορική επεξήγηση.

4. **Αυτοκόλλητο σακουλάκι**, εφαρμόζεται σε μικρά παιδιά (<2 χρ.), χαρακτηρίζεται από υψηλή ευαισθησία (100%), αλλά χαμηλή ειδικότητα (14-84%). Η υψηλή αρνητική διαγνωστική αξία βοηθάει στον αποκλεισμό της ουρολοίμωξης, ενώ η χαμηλή θετική διαγνωστική αξία βελτιώνεται όταν υπάρχει θετική γενική ούρων και θετική συμπτωματολογία. Αν το παιδί δεν ουρήσει εντός 30 λεπτών, τοποθετούμε νέο σακουλάκι μετά από καλό πλύσιμο.

Σε ασθενείς με **μόνιμο καθετήρα** (Foley) η λήψη των ούρων γίνεται με άσηπτη τεχνική από το ειδικό σημείο ή με παρακέντηση του καθετήρα σε απόσταση 5 cm από την ουρήθρα, μετά από κλείσιμο του αυλού με λαβίδα, αφού προηγηθεί καθαρισμός με αιθυλική αλκοόλη 70%. Συνι-

στάται καλλιέργεια ούρων μόνο σε συμπτωματικούς ασθενείς. Όταν ο καθετήρας είναι >7-14 ημ. συνιστάται η λήψη της καλλιέργειας μετά από αλλαγή του καθετήρα. Σε ασυμπτωματικούς ασθενείς δεν έχει καμιά αξία η καλλιέργεια ούρων, με εξαίρεση τις εγκύους και τους προεγχειρητικούς ουρολογικούς ασθενείς. Καλλιέργεια ούρων συνιστάται μόνο επί πυρετού.

Δείγματα μη αποδεκτά για καλλιέργεια ούρων

- Ούρα 24ώρου
- Άκρα ουροκαθετήρων
- Ούρα από ουροσυλλέκτη ασθενούς με μόνιμο καθετήρα
- Ούρα από ουροσυλλέκτη με διαρροή
- Ούρα >2h, χωρίς ψύξη ή συντηρητικό

Τα τρία πρώτα απορρίπτονται «ασυζητητί», ενώ στις άλλες περιπτώσεις ειδοποιείται το αντίστοιχο νοσηλευτικό τμήμα και ζητείται νέο δείγμα. Μέχρι να εξασφαλιστεί το νέο δείγμα, δεν απορρίπτεται το παλιό. Όταν στο δείγμα δεν αναγράφεται η μέθοδος και ο χρόνος συλλογής, επικοινωνούμε με την κλινική για αναζήτηση πληροφοριών.

Στα ούρα εφαρμόζεται η **ποσοτική καλλιέργεια**, που έχει σκοπό να προσδιορίσει τον αριθμό των μικροβίων / ml ούρων (CFU/ml) και να διακρίνει τη λοίμωξη από την επιμόλυνση. Δεν υπάρχει ενιαίο πρωτόκολλο καλλιέργειας των ούρων για όλα τα εργαστήρια. Σήμερα επιπλέον υπάρχουν αυτόματα συστήματα ενοφθαλμισμού του δείγματος για μεγάλα εργαστήρια, αλλά και εμπορικά συστήματα ουροκαλλιέργειας χρήσιμα για μικρά και απομακρυσμένα εργαστήρια, απλά στη χρήση με υψηλή ευαισθησία (87-100%) και ειδικότητα (92-98%), όταν η ανάπτυξη είναι μονομικροβιακή >10⁵ CFU/ml. Τα αυτόματα συστήματα ουροκαλλιέργειας που τελευταία χρησιμοποιούνται σε ορισμένα νοσοκομεία υπόσχονται αξιόπιστη απάντηση σε 45 λεπτά-3 ώρες, έλεγχο ευαισθησίας σε 3ώρες και εξουδετέρωση των αντιμικροβιακών ουσιών.

Η **κλασική μέθοδος** εξακολουθεί να είναι η μέθοδος αναφοράς. Σύμφωνα με αυτή ακολου-

θούμε την παρακάτω **διαδικασία**, η οποία γίνεται σε θάλαμο βιολογικής ασφάλειας τάξης II:

- Ανακινούμε καλά το δείγμα
- Βυθίζουμε κάθετα στην επιφάνεια το βαθμονομημένο κρίκο (1 ή 10 μl) ή την πιπέτα
- Ενοφθαλμίζουμε σε αιματούχο άγαρ (δίκην ελάτου) και MacConkey
- Επωάζουμε σε 35°C για 24-48ώρες

Ενοφθάμισμα 10 μl προτείνεται στην κυστίτιδα εφήβων και νεαρών γυναικών, σε μεταμοσχευμένους / ουρολογικούς ασθενείς, σε έλεγχο μυκητουρίας και όταν το δείγμα έχει ληφθεί με επεμβατική μέθοδο.

Ακολουθεί έλεγχος του καλλιέργηματος μετά από 18 ώρες (μονομικροβιακό/ πολυμικροβιακό), μέτρηση των αποικιών ανά είδος μικροβίου και πολλαπλασιασμός $\times 1000$ (1 μl) ή $\times 100$ (10 μl), ανάλογα με το μέγεθος του ενοφθαλμίσματος. Το αποτέλεσμα εκφράζεται σε cfu/ml. Παράταση της επώασης σε 48-72ώρες γίνεται σε έλεγχο μυκητουρίας και όταν το δείγμα έχει ληφθεί με επεμβατική μέθοδο.

Η διαδικασία συνεχίζεται με την ταυτοποίηση μόνο των αξιολογούμενων μικροβίων και τον έλεγχο της ευαισθησίας στα αντιβιοτικά ακολουθώντας μια προτυποποιημένη μέθοδο (CLSI ή EUCAST). Το άμεσο αντιβιογράμμα γενικά δεν συνιστάται, είναι όμως χρήσιμο σε «επείγουσες» περιπτώσεις. Παρέχει αξιόπιστα αποτελέσματα (>95%), μόνο εφόσον η λοίμωξη είναι μονομικροβιακή σε ανάπτυξη $\geq 10^5$ CFU/ml. Συνιστάται επανάληψη με προτυποποιημένη μέθοδο.

Η καλλιέργεια ούρων μπορεί να είναι **ψευδώς αρνητική** σε:

- Λήψη αντιβιοτικών
- Παρουσία αντισηπτικού στα ούρα
- Αυξημένη διούρηση
- Ολική απόφραξη κάτω από τη λοίμωξη
- Λοίμωξη από αναερόβια και άλλα «απαιτητικά» βακτήρια
- Φυματίωση νεφρού - *M. tuberculosis*

Η **φυματίωση** συνοδεύεται από τη λεγόμενη «άσηπτη πυουρία». Η διάγνωση μπορεί να γίνει με:

- Χρώση φθορίζουσα ή Ziehl-Neelsen
- Καλλιέργεια: κρίνεται ως απαραίτητη και είναι

θετική (στο 90% των περιπτώσεων). Απαιτούνται ούρα μέσου ρεύματος πρώτα πρωινά (>40 ml) από 3 διαδοχικές ημέρες (συντήρηση σε 4°C) - Ειδική επεξεργασία του δείγματος - Φυγοκέντρηση σε 3000 rpm για 15min - Καλλιέργεια του ιζήματος σε ειδικά θρεπτικά υλικά (Lowenstein - Jensen) και σε αυτοματοποιημένα συστήματα. Όλοι οι χειρισμοί σε θάλαμο βιολογικής ασφάλειας.

- Μοριακές τεχνικές - PCR

Αξιολόγηση της ουροκαλλιέργειας

Δεν υπάρχουν απόλυτα διαγνωστικά κριτήρια για την ουρολοίμωξη. Η καλύτερη ερμηνεία της καλλιέργειας εξασφαλίζεται με τη συνεργασία εργαστηριακού και κλινικού γιατρού. Με βάση τα όσα προτείνονται από έγκυρες επιστημονικές εταιρείες η αξιολόγηση γίνεται σύμφωνα με τα παρακάτω κριτήρια:

1. Ανάπτυξη ενός είδους μικροβίου (αφορά το 95% των περιπτώσεων)

- $\geq 10^5$ CFU/ml: κλινικά σημαντική
- 10^4 - 10^5 CFU/ml: συνεκτιμώνται κλινικές πληροφορίες και είδος μικροβίου. Ανάπτυξη $\geq 10^4$ CFU/ml μπορεί να είναι κλινικά σημαντική σε Gram (+) βακτήρια, μύκητες και άλλα απαιτητικά, τα οποία σπάνια φθάνουν σε ανάπτυξη $>10^5$ CFU/ml.

- $<10^4$ CFU/ml: συχνά οφείλεται σε χλωρίδα περιοχής, με εξαίρεση το οξύ ουρηθρικό σύνδρομο (νεαρές γυναίκες).

- Γενικά πρέπει να εξετάζεται το ενδεχόμενο αντιμικροβιακής αγωγής σε οιοδήποτε ασθενή με συμπτώματα ουρολοίμωξης και ανάπτυξη ενός ουροπαθογόνου μικροβίου, ακόμη και σε επίπεδα 10^3 CFU/ml.

2. Ανάπτυξη 2 ουροπαθογόνων $>10^5$ CFU/ml: θεωρείται κλινικά σημαντική σχεδόν μόνο σε ουρολογικούς ασθενείς και αφορά μόνο το 5% των περιπτώσεων.

3. Ανάπτυξη 2 ή περισσότερων μικροβίων (1 ουροπαθογόνο $\geq 10^5$ CFU/ml και τα άλλα $\leq 10^4$ CFU/ml): μπορεί να αξιολογηθεί το πρώτο επί θετικής συμπτωματολογίας.

4. Ανάπτυξη 2 ή περισσότερων μικροβίων: συνήθως οφείλεται σε επιμόλυνση.

5. Πολυμικροβιακή βακτηριουρία ανιχνεύεται σε ασθενείς με νευρογενή κύστη και μόνιμο ουροκαθετήρα, συχνά χωρίς λοίμωξη.

Νεαρές γυναίκες

- Ανάπτυξη ουροπαθογόνου $\geq 10^5$ CFU/ml συμβαίνει μόνο στο 50% των συμπτωματικών γυναικών με συχνοουρία - δυσουρία - επιτακτική ούρηση (κλασική κυστίτιδα).

- Ανάπτυξη $< 10^5$ CFU/ml συμβαίνει στο 40% αυτών (οξύ ουρηθρικό σύνδρομο), από τις οποίες το 18% έχει λοίμωξη του κατώτερου ουροποιητικού (low count bacteriuria 10^2 - 10^4 CFU/ml), το 8% έχει χλαμυδιακή λοίμωξη, ενώ στο υπόλοιπο 14% δεν ανευρίσκεται καμιά αιτία.

Η κολπίτιδα και ο έρπης των γεννητικών οργάνων μπορεί επίσης να ευθύνονται για δυσουρικά ενοχλήματα σε ένα ποσοστό 10%.

Άνδρες

- Ανάπτυξη $\geq 10^3$ cfu/ml και ένα είδος μικροβίου σε συμπτωματικό ασθενή: η λοίμωξη είναι πιθανή. Συχνά απομονώνεται *Proteus mirabilis*.

- Όταν η καλλιέργεια είναι αρνητική για κοινά ουροπαθογόνα, ακολουθεί έλεγχος για «σεξουαλικά μεταδιδόμενα μικρόβια»

Ασθενείς με ουροκαθετήρα

Δεν υπάρχουν σαφή κριτήρια αποικισμού / λοίμωξης. Η συχνότητα βακτηριουρίας είναι 3%-6% ανά ημέρα σε μόνιμο καθετηριασμό και 1%-3% ανά ημέρα σε διαλείποντα καθετηριασμό, με αποτέλεσμα βακτηριουρία 100% μετά από ένα μήνα. Γι' αυτό καλλιέργεια ούρων συνιστάται ΜΟΝΟ σε συμπτωματικούς ασθενείς. Η ασυμπτωματική βακτηριουρία ελέγχεται μόνο σε ουρολογικούς προεγχειρητικούς ασθενείς. Όταν ο καθετήρας είναι >7 -14 ημέρες συνιστάται αλλαγή πριν τη λήψη της καλλιέργειας. Μονο-

μικροβιακή ανάπτυξη παρατηρείται συνήθως σε καθετηριασμό βραχείας διάρκειας (<30 ημ.), ενώ σε καθετηριασμό μακράς διάρκειας (>30 ημ.) παρατηρείται σχεδόν πάντοτε πολυμικροβιακή.

Σύμφωνα με την Αμερικανική Εταιρεία Λοιμώξεων (IDSA, 2010) ανάπτυξη $\geq 10^3$ cfu/ml ενός ή περισσότερων μικροβίων, μπορεί να είναι κλινικά σημαντική. Γι' αυτό η Αμερικανική Εταιρεία Μικροβιολογίας προτείνει ταυτοποίηση και αντιβιογράμμα σε ανάπτυξη $\geq 10^4$ CFU/ml ενός ή δύο μικροβίων (Cumitech 2C, 2009).

Ουρολοίμωξη από *Candida spp*

Αφορά νοσοκομειακούς ασθενείς και σχετίζεται με προδιαθεσικούς παράγοντες (προηγούμενη λήψη αντιβιοτικών, χρήση ουροκαθετήρα, σακχαρώδης διαβήτης, ανωμαλίες ουροποιητικού συστήματος, προηγούμενη νοσηλεία σε νοσοκομείο >7 ημ., κακοήθεια - ανοσοκαταστολή). Αφαίρεση του καθετήρα ή διακοπή των αντιβιοτικών συχνά οδηγεί σε ίαση. Συνήθως είναι ασυμπτωματική και δεν απαιτείται θεραπεία. Εξαιρούνται ασθενείς ανοσοκατεσταλμένοι / μεταμοσχευμένοι / ουδετεροπενικοί, ουρολογικοί προεγχειρητικοί και νεογνά μικρού βάρους γέννησης (vlbw).

Η κλινική της σημασία είναι προβληματική. Μπορεί να οφείλεται σε επιμόλυνση από το γεννητικό σύστημα, αποικισμό του καθετήρα, λοίμωξη της κύστης, ανιούσα ή αιματογενή λοίμωξη του νεφρού. Στα νεογνά η καντιντουρία είναι σημαντική και συνήθως υποδηλώνει αιματογενή διασπορά στους νεφρούς.

Δεν έχουν καθοριστεί όρια ανάπτυξης στην καλλιέργεια ούρων για τη διάκριση μεταξύ επιμόλυνσης ή αποικισμού και λοίμωξης. Ανάπτυξη 10^4 CFU/ml θεωρείται κλινικά σημαντική. Αλλά, οποιαδήποτε ανάπτυξη απαιτεί επανέλεγχο στις «ευαίσθητες» ομάδες ασθενών.

Βρέφη και μικρά παιδιά

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχει η ουρολοίμωξη στα βρέφη και τα μικρά παιδιά <2 χρόνων, για-

τί η συμπτωματολογία της λοίμωξης είναι άτυπη, ο κίνδυνος νεφρικής βλάβης είναι μεγάλος λόγω συγγενών ανατομικών και λειτουργικών ανωμαλιών, η ουροσήψη είναι συχνή επιπλοκή (4-31,0%) και η λήψη της καλλιέργειας γίνεται συχνά με επεμβατική μέθοδο. Η ερμηνεία του αποτελέσματος σχετίζεται με τον τρόπο λήψης και περιγράφεται αναλυτικά στον Πίνακα (Hellenstein S, et al *Ped Infect Dis J* 1982; 1: 271).

Πιο απλά διατυπώνονται τα κριτήρια αξιολόγησης στα παιδιά από την Ευρωπαϊκή Εταιρεία Ουρολογίας:

1. Υπερβική λήψη: οιαδήποτε ανάπτυξη ουροπαθολογίου
2. Λήψη με καθετηριασμό της κύστης: $\geq 10^3$ - 5×10^4 CFU/ml
3. Μέσου ρεύματος ούρα
 - $\geq 10^4$ CFU/ml σε συμπτωματικούς ασθενείς
 - $\geq 10^5$ CFU/ml σε ασυμπτωματικούς ασθενείς
4. Λήψη με σακουλάκι: $\geq 10^5$ CFU/ml (>85% ψευδώς θετικά)

Το εργαστήριο είναι πολύτιμος σύμβουλος στη διάγνωση της ουρολοίμωξης. Όμως η ερ-

γαστηριακή προσέγγιση είναι αδύνατη χωρίς το σωστό δείγμα, τη σωστή επεξεργασία και την κλινική πληροφορία. Απαραίτητη η συνεργασία κλινικού και εργαστηριακού γιατρού, αφού απόλυτα διαγνωστικά κριτήρια δεν υπάρχουν.

Διεύθυνση επικοινωνίας:

Ευαγγελία Λεμπέση

Γ. Κονδύλη 32

174 55 Άλιμος

213 2009324, 210 9849014

e-mail: elebessi@gmail.com

Summary

Urine specimen and laboratory diagnosis of u.t. infection

EVAGELIA LEMPESI

Department of Medical Microbiology Children's Hospital "A. and P. Kyriakou" - Athens
Applied Clinical Microbiology

Πίνακας. Κριτήρια αξιολόγησης της καλλιέργειας ούρων στα παιδιά

Τρόπος λήψης των ούρων	Ανάπτυξη ενός είδους μικροβίου (CFU/ml)	Πιθανότητα λοίμωξης (%)
Υπερβική παρακέντηση	Gram(-) βακτηρίδιο οιοσδήποτε αριθμός	99
	Gram(+) κόκκος >μερικές χιλιάδες	99
Καθετηριασμός ουρήθρας	$>10^5$	95
	10^4 - 10^5	Πιθανή λοίμωξη
	10^3 - 10^4	Υποπτη - Επανάληψη
	$<10^3$	Μη πιθανή λοίμωξη
Μέσου ρεύματος (αγόρι)	$>10^4$	Πιθανή λοίμωξη
Μέσου ρεύματος (κορίτσι)	3 δείγματα $\geq 10^5$	95
	2 δείγματα $\geq 10^5$	90
	1 δείγμα $\geq 10^5$	80
	5×10^4 - 10^5	Υποπτη - Επανάληψη
	10^4 - 5×10^4	Συμπτωματική: Υποπτη - Επανάληψη
	10^4 - 5×10^4	Ασυμπτωματική: Μη πιθανή
	$<10^4$	Μη πιθανή λοίμωξη

In this article the importance of collection, transporting and culturing urine specimens for etiological diagnosing U.T. infections is reviewed. In addition guidelines for the interpretation of the culture's result in several age-group patients are presented.

(Key words: urine, collection, transport, processing, laboratory diagnosis, U.T. infection).

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Principles and Practice of Infectious Diseases (2010), Mandell GL, Douglas, and Bennett's, 7th ed.
2. Clinical Microbiology Procedures Handbook (2004), HD Isenberg, 2nd ed.
3. Laboratory Diagnosis of Urinary Tract Infections, CUMITECH 2C (2009).
4. Manual of Clinical Microbiology (2007), Murray et al, ASM, 9th ed.
5. Health Protection Agency, National Standard Method, BSOP40, 2009.
6. Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology (2006), 6th ed.
7. Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods (2001), JB Henry, 20th ed.
8. Adult and Pediatric Urology (2002).
9. Diagnosis, Prevention, and Treatment of Catheter-Associated Urinary Tract Infection in Adults: 2009 International Clinical Practice Guidelines from the Infectious Diseases Society of America, Clin Infect Dis 2010, **50**: 625-663.
10. Guideline for Prevention of Catheter-associated Urinary Tract Infections 2009 – HICPAC / CDC
11. Nelson Textbook of Pediatrics (2004), 17th ed.
12. Textbook of Pediatric and Infectious Diseases (2004), 5th ed.



ΣΩΣΤΕΣ ΑΠΑΝΤΗΣΕΙΣ ΣΤΙΣ ΕΡΩΤΗΣΕΙΣ ΤΟΥ ΠΡΟΗΓΟΥΜΕΝΟΥ ΤΕΥΧΟΥΣ

- Ερώτηση 1η: Δ. Και στις τρεις ειδικές περιπτώσεις που περιλαμβάνονται στην ερώτηση.
- Ερώτηση 2η: Γ. Το καλύτερο δείγμα για διερεύνηση παραρρινοκολπίτιδας είναι υλικό από παρακέντηση.
- Ερώτηση 3η: Γ. Το συχνότερο μικροβιακό αίτιο κερατοειδίτιδας σε χρήστες φακών επαφής είναι η Ψευδομονάδα.
- Ερώτηση 4η: Γ. Σε ασθενείς με γονόρροια το τραχηλικό επίχρισμα είναι θετικό στο 50% των περιπτώσεων.

ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΓΕΝΝΗΤΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ

ΣΤΑΥΡΟΥΛΑ ΜΠΑΚΑ

Τα δείγματα του γεννητικού συστήματος αποστέλλονται στο μικροβιολογικό εργαστήριο για την απομόνωση παθογόνων μικροοργανισμών που σχετίζονται με διάφορες κλινικές οντότητες. Οι λοιμώξεις του γεννητικού συστήματος ευθύνονται για αυξημένη νοσηρότητα κυρίως κατά την αναπαραγωγική ηλικία. Κάποιες από αυτές, εάν δεν θεραπευτούν, είναι δυνατόν να προκαλέσουν σοβαρότατες επιπλοκές στη γυναίκα, όπως υπογονιμότητα, εξωμήτριο κύηση, καρκίνο του τραχήλου της μήτρας, αποβολή και γέννηση χαμηλού βάρους νεογνών. Η ακριβής διάγνωση των λοιμώξεων του γεννητικού συστήματος, τόσο στον άνδρα όσο κυρίως στη γυναίκα, βασίζεται στο διαχωρισμό των παθογόνων μικροοργανισμών από τη φυσιολογική χλωρίδα. Ωστόσο, πολλές λοιμώξεις προκύπτουν από τα μικρόβια της φυσιολογικής χλωρίδας. Σε κάποιες περιπτώσεις, είναι εξίσου σημαντικό να εντοπίσουμε τη φορεία, ανεξάρτητα από τα συμπτώματα του ασθενούς, καθώς κάποιοι μικροοργανισμοί έχουν ενοχοποιηθεί σε βαριές λοιμώξεις του νεογνού. Πολλές φορές είναι δύσκολο να ληφθούν κατάλληλα δείγματα, ειδικά στις γυναίκες, και παραλαμβάνονται δείγματα είτε ακατάλληλα, είτε ανεπαρκή. Η κατάλληλη λήψη ενός δείγματος του γεννητικού συστήματος είναι σημαντική για την εξασφάλιση άριστων αποτελεσμάτων. Στην ανασκόπηση αυτή περιγράφονται και αναλύονται: ο τρόπος λήψης των δειγμάτων, οι μέθοδοι διάγνωσης των λοιμώξεων του γεννητικού συστήματος και η αξιολόγηση των αποτελεσμάτων τους.

(Λέξεις ευρετηρίου: δείγματα γεννητικού συστήματος, κολπίτιδα, τραχηλίτιδα, ουρηθρίτιδα, ενδομητρίκα σπειράματα, προστατίτιδα, σπέρμα).

Εισαγωγή

Τα δείγματα του γεννητικού συστήματος αποστέλλονται στο μικροβιολογικό εργαστήριο, για την απομόνωση παθογόνων μικροοργανισμών που σχετίζονται κατά κύριο λόγο με κολπίτιδες, τραχηλίτιδες και ουρηθρίτιδες στη γυναίκα και ουρηθρίτιδες και προστατίτιδες στον άν-

δρα. Δείγματα επίσης στέλνονται κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης, για την απομόνωση παθογόνων που σχετίζονται με λοιμώξεις του νεογνού. Λιγότερο συχνά λαμβάνονται δείγματα από παιδιά και εμμηνοπαυσιακές γυναίκες^{1,2}.

Το γεννητικό σύστημα του υγιούς άνδρα είναι στείρο μικροβίων, με εξαίρεση τα εξωτερικά γεννητικά όργανα και το πρώτο τμήμα της πρόσθιας ουρήθρας. Στη γυναίκα, φυσιολογική χλωρίδα (ΦΧ) συναντάμε στην ουρήθρα, η οποία αποικίζεται σε όλο της το μήκος, στον κόλπο και

στο κατώτερο τμήμα του τραχήλου της μήτρας, χωρίς να προκαλεί νόσο. Η ΦΧ του γεννητικού συστήματος της γυναίκας είναι σημαντική για τη διαγνωστική προσέγγιση των λοιμώξεων, καθώς τα μέλη της μπορεί να αποτελέσουν σημαντικά αίτια αυτών των λοιμώξεων, ή να αλληλεπιδράσουν συνεργικά ή ανταγωνιστικά με εξωγενείς παράγοντες³.

Στην υγιή, μη έγκυο γυναίκα της αναπαραγωγικής ηλικίας, η ΦΧ του κόλπου αποτελείται από αερόβια και αναερόβια μικρόβια σε διαφορετικές συγκεντρώσεις⁴. Ανάλογα με την ηλικία, την υγιεινή του σώματος και τις σεξουαλικές πρακτικές, είναι δυνατό να υπάρξουν σημαντικές διακυμάνσεις στη φυσιολογική χλωρίδα καθώς και στα παθογόνα που απομονώνονται από τα δείγματα του γεννητικού συστήματος.

Για την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων, το παραπεμπτικό, εκτός από τα στοιχεία του ασθενή και το είδος του δείγματος που αποστέλλεται, θα πρέπει να περιλαμβάνει απαραίτητως την ηλικία και επιπλέον στις γυναίκες, πληροφορίες για την έμμηνου ρύση και για εγκυμοσύνη, όταν υπάρχει. Τέλος, ο κλινικός θα πρέπει να αναφέρει την πιθανή διάγνωση ή/και τα κλινικά συμπτώματα, καθώς και τα πιθανά παθογόνα που αναζητούνται¹.

I. Κολπίτιδες

Οι κολπίτιδες αποτελούν ένα πολύ συχνό κλινικό σύνδρομο και προκαλούνται από διάφορους μικροοργανισμούς.

Κατά την αναπαραγωγική ηλικία οι σημαντικότερες κολπίτιδες^{1,5}, σε φθίνουσα σειρά συχνότητας, είναι οι εξής:

1. Μη ειδική (*Bacterial vaginosis*): χαρακτηρίζεται από σημαντική αύξηση της *Gardnerella vaginalis*, των αναερόβιων βακτηρίων (*Prevotella*, *Bacteroides*, *Mobiluncus*, *Peptostreptococcus*) και του *Mycoplasma hominis*, ενώ παράλληλα παρατηρείται μείωση των γαλακτοβακίλλων.

2. Μυκητιασική: προκαλείται κυρίως από τη *Candida albicans* αλλά και από *non albicans* είδη.

3. Τριχομοναδική: οφείλεται στο πρωτόζωο *Trichomonas vaginalis*.

Άλλα αίτια κολπίτιδων που αναφέρονται λιγότερο συχνά είναι: *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, εντεροβακτηριακά, *Haemophilus influenzae* και *Neisseria gonorrhoeae*. Εξαιρετικό ενδιαφέρον κατά τη διάρκεια της κύησης, λόγω πιθανής μετάδοσης στο νεογνό, παρουσιάζουν ο *Streptococcus agalactiae* και η *Listeria monocytogenes*.

Κατά την προεφηβική ηλικία η φλεγμονή του κόλπου συνοδεύεται από συμμετοχή του αιδοίου και ονομάζεται αιδοιοκολπίτιδα. Τα συχνότερα αίτια⁵⁻⁶ είναι: *S. pyogenes*, *S. aureus*, *H. influenzae*, *Enterococcus*, *Shigella*, *Salmonella*, αλλά και ο *Enterobius vermicularis*, την παρουσία του οποίου θα πρέπει να την υποψιαστούμε όταν τα συμπτώματα είναι πιο έντονα κατά τη διάρκεια της νύχτας. Σπανιότερα οι αιδοιοκολπίτιδες οφείλονται σε είδη *Candida*, *G. vaginalis*, αναερόβια και μυκοπλάσματα. Σε περίπτωση απομόνωσης *N. gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis* ή *T. vaginalis* θα πρέπει να εξεταστεί με μεγάλη προσοχή η πιθανότητα σεξουαλικής κακοποίησης.

Στη μετεμμηνοπαυσιακή ηλικία συναντάμε κυρίως τη μυκητιασική και τη μη ειδική κολπίτιδα, ενώ συχνά απομονώνονται και άλλοι μικροοργανισμοί, όπως: *C. trachomatis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Proteus* και εντερόκοκκοι^{5,7}.

Λήψη του κολπικού δείγματος

Για τη λήψη του κολπικού δείγματος τοποθετείται κολποδιαστολέας χωρίς λιπαντική ουσία και λαμβάνεται έκκριμα από τον οπίσθιο θόλο⁸. Ο πρώτος στυλεός τοποθετείται σε 0,5 ml φυσιολογικό ορό και ο δεύτερος σε υλικό μεταφοράς. Επίσης, επιστρώνονται αμέσως δύο πλακάκια για χρώσεις. Για την αναζήτηση μυκοπλασμάτων η λήψη του κολπικού δείγματος είναι απαραίτητο να γίνει με πλαστικό στυλεό, ο οποίος τοποθετείται σε υλικό μεταφοράς και συντήρησης (1 ml Hanks), όπου μπορεί να διατηρηθεί για 48 ώρες στους 2-8°C, αφήνοντας το στυλεό μέσα στο σωληνάριο^{4,9}.

Η χρησιμοποίηση των κολπικών δειγμάτων μετά από αυτολήψη για την απομόνωση του *C.*

trachomatis ξεκίνησε από το 1996 στο Magee – Women's Hospital, University of Pittsburg, με πολύ καλά αποτελέσματα¹⁰. Από τότε πολλές μελέτες στη βιβλιογραφία υποστηρίζουν τη λήψη κολπικού δείγματος, καθώς συνδυάζει προσμίξεις από ουρήθρα και τράχηλο όπου εντοπίζεται το *C. trachomatis*¹¹. Λεπτομέρειες για τη μεταφορά και συντήρηση των δειγμάτων που προορίζονται για τον έλεγχο των χλαμυδίων αναφέρονται στο τραχηλικό δείγμα.

Μέτρηση του pH του κόλπου

Μετά τη λήψη του κολπικού δείγματος είναι απαραίτητη η μέτρηση του pH του κόλπου, η οποία επιτυγχάνεται με ειδικές pHμετρικές ταινίες ή/και συσκευές που κυκλοφορούν στο εμπόριο.

Άμεσο νωπό παρασκεύασμα

Χρησιμοποιούμε φυσιολογικό ορό και παρατηρούμε κάτω από το μικροσκόπιο ($\times 400$), σε λιγότερο από 30 λεπτά από τη λήψη, αναζητώντας την παρουσία πυοσφαιρίων, clue cells (επιθηλιακά κύτταρα επικαλυμμένα με μικροοργανισμούς), *Trichomonas vaginalis*, με τη χαρακτηριστική κίνηση, και μυκήτων. Για την καλύτερη παρατήρηση των μυκήτων προσθέτουμε διάλυμα KOH 10%, που έχει την ιδιότητα να καταστρέφει όλα τα κύτταρα εκτός από τους μύκητες, και μικροσκοπούμε μετά από 2 λεπτά.

Άμεσο Gram παρασκεύασμα

Κατά τη μικροσκοπική εξέταση (με τον καταδυτικό φακό – $\times 1000$) του παρασκευάσματος, μετά από Gram χρώση, είναι δυνατόν να παρατηρηθούν πολυμορφοπύρρηνα, μύκητες, γαλακτοβακίλλοι, διφθεροειδή, κ.ά. Εξαιρετικό ενδιαφέρον κατά τη διάρκεια της κύησης, λόγω πιθανής μετάδοσης στο νεογνό, έχει η ανεύρεση Gram-θετικών κόκκων σε στρεπτούς, ή Gram-θετικών βακτηριδίων, όταν ταυτοποιηθούν ως *S. agalactiae* ή *Listeria monocytogenes*, αντίστοιχα.

Μη ειδική κολπίτιδα (Bacterial vaginosis)

Για τη μικροβιολογική διάγνωση της μη ειδικής κολπίτιδας δεν συνιστάται η καλλιέργεια του κολπικού δείγματος. Η διάγνωση βασίζεται στην εφαρμογή τριών διαφορετικών κριτηρίων: Κριτήρια Amsel, Κριτήρια Nugent και Κριτήρια Ison/Hay⁵.

Σύμφωνα με τα Κριτήρια Amsel χρειάζονται 3 από τα ακόλουθα 4:

- λεπτό, γκριζόασπρο έκκριμα
- pH του κόλπου $>4,5$
- οσμή «ψαρίλας» στο κολπικό έκκριμα μετά από προσθήκη διαλύματος KOH 10% λόγω της παραγωγής πτητικών αμινών (Whiff test).
- παρουσία «clue cells» σε νωπό παρασκεύασμα ($\times 400$).

Τα Κριτήρια Nugent και Ison/Hay εφαρμόζονται σε παρασκευάσματα κολπικού εκκρίματος χρωματισμένα κατά Gram όπου, με καταδυτικό φακό ($\times 1000$), καταγράφεται η παρουσία των γαλακτοβακίλλων, *Gardnerella*, *Prevotella* και *Mobiluncus*. Για τα Κριτήρια Nugent (Πίνακας 1), σύμφωνα με τον αριθμό των γαλακτοβακίλλων, *Gardnerella*, *Prevotella* και *Mobiluncus* ανά οπτικό πεδίο, και αθροίζοντας τον αντίστοιχο βαθμό σε κάθε στήλη (αριθμός γαλακτοβακίλλων + αριθμός *Gardnerella* και *Prevotella* + αριθμός *Mobiluncus*), καταλήγουμε σε μία τελική βαθμολογία σύμφωνα με την οποία γίνεται η αξιολόγηση του αποτελέσματος και η οποία έχει ως εξής:

- 0-3: φυσιολογικό
- 4-6: ενδιάμεσο: πιθανή μη-ειδική κολπίτιδα, απαραίτητο να αξιολογηθεί με κλινικά στοιχεία
- > 6 : παθολογικό: μη-ειδική κολπίτιδα.

Σύμφωνα με τα Κριτήρια Ison/Hay, τα παρασκευάσματα ταξινομούνται ως εξής:

- Grade I: φυσιολογικό (επικράτηση των γαλακτοβακίλλων)
- Grade II: ενδιάμεσο (μικτή ανάπτυξη γαλακτοβακίλλων με άλλα είδη μικροβίων όπου είναι απαραίτητη η αξιολόγηση σύμφωνα με τα κλινικά στοιχεία ή/και επανάληψη)

Πίνακας 1. Κριτήρια Nugent

Αριθμός γαλακτοβακίλλων	Βαθμός	Αριθμός Gardnerella + Prevotella	Βαθμός	Αριθμός Mobiluncus	Βαθμός
>30	0	>30	4	>30	4
5-30	1	0	3	5-30	3
2-4	2	5-30	2	2-4	2
1-2	3	2-4	1	1-2	1
0	4	1-2	0	0	0

– Grade III: παθολογικό, μη ειδική κοιλίτιδα (απουσία ή ελάχιστοι γαλακτοβάκιλλοι μαζί με αυξημένο αριθμό *G. vaginalis* και άλλων ειδών μικροβίων)

Τριχομοναδική κοιλίτιδα

Η μικροβιολογική διάγνωση της τριχομοναδικής κοιλίτιδας βασίζεται αρχικά στη μικροσκοπική εξέταση νωπού παρασκευάσματος των κοιλικών εκκρίσεων σε φυσιολογικό ορό, όπου παρατηρείται η χαρακτηριστική κίνηση του πρωτοζώου. Η εξέταση θα πρέπει να πραγματοποιηθεί μέσα σε 30 λεπτά από τη λήψη του δείγματος καθώς, μετά από αυτό το διάστημα, η κινητικότητα ενδέχεται να εξαφανιστεί. Το pH του κόλπου³ είναι ≥ 5 .

Η καλλιέργεια της *T. vaginalis* σε υγρά θρεπτικά υλικά αποτελεί μέθοδο «gold standard» καθώς χαρακτηρίζεται από μεγαλύτερη ευαισθησία συγκριτικά με τη μικροσκοπική εξέταση, είναι όμως δαπανηρή και χρονοβόρα. Συνήθως χρησιμοποιείται το υγρό θρεπτικό υλικό Diamond, το οποίο επώάζεται σε κεκλιμένη θέση 45°, στους 37° C, αεροβίως, για τουλάχιστον 4 ημέρες. Οι τριχομονάδες παρατηρούνται με ανάστροφο μικροσκόπιο αντίθετης φάσης, κοντά στα τοιχώματα του σωληναρίου ή σε νωπό παρασκεύασμα ($\times 400$) κατευθείαν από το υγρό θρεπτικό υλικό^{3,4}.

Μυκητιασική κοιλίτιδα

Η μικροβιολογική διάγνωση της μυκητιασικής κοιλίτιδας βασίζεται στη μικροσκοπική εξέ-

ταση νωπού ή χρωματισμένου Gram παρασκευάσματος και στην καλλιέργεια. Το κοιλικό έκκριμα (που συνήθως έχει pH <4,5) αναμειγνύεται με σταγόνα φυσιολογικού ορού ή διαλύματος ΚΟΗ 10%, το οποίο διευκολύνει τη μικροσκοπική παρατήρηση ($\times 400$) των βλαστομυκήτων και των ψευδοϋφών. Το κοιλικό δείγμα ενοφθαλμίζεται σε Sabouraud Dextrose agar εμπλουτισμένο με γενταμικίνη και χλωραμφαινικόλη, και επώάζεται στους 30°C για 7 ημέρες, αεροβίως^{3,4}.

Καλλιέργεια

Για την καλλιέργεια του κοιλικού δείγματος χρησιμοποιούνται συνήθως απλά θρεπτικά υλικά: αιματούχο άγαρ, MacConkey agar, Chocolate agar, Thayer-Martin και Sabouraud Dextrose agar. Κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης, η καλλιέργεια του κοιλικού εκκρίματος είναι εξαιρετικά σημαντική για την απομόνωση του *S. agalactiae*, για τον οποίο είναι απαραίτητος ο έλεγχος για φορεία (κόλπο και ορθό) στις 35-37 εβδομάδες κύησης, και *Listeria monocytogenes*. Και τα δύο παθογόνα αναπτύσσονται σε αιματούχο άγαρ μετά από επώαση στους 35°C για 24-48 ώρες⁵.

Μυκοπλάσματα

Συνήθως στο κοιλικό έκκριμα αναζητούνται τα εξής μυκοπλάσματα: *Ureaplasma urealyticum*, *M. hominis*, *M. genitalium* και *M. fermentans*. Η καλλιέργεια του κοιλικού δείγματος για την α-

πομόνωση των μυκοπλασμάτων έχει πολύ καλά αποτελέσματα στα κατάλληλα υλικά. Το *U. urealyticum* αναπτύσσεται εύκολα σε ζυμό ουρίας, μετά από επώαση σε αερόβιες συνθήκες, για τουλάχιστον 2 ημέρες, στους 37°C. Το *M. hominis* αναπτύσσεται σε DNA-PPLO άγαρ ενώ σε θρεπτικό υλικό A7, μετά από επώαση για 2 έως 5 ημέρες στους 37°C και 5-10% CO₂, αναπτύσσονται χαρακτηριστικές αποικίες: μικρές και μαύρες για το *U. urealyticum* και «σαν αυγά μάτια» για το *M. hominis*. Επιπλέον, για την ανίχνευση των μυκοπλασμάτων, υπάρχουν και έτοιμα συστήματα καλλιέργειας και ταυτοποίησης^{3,4}.

Μοριακές τεχνικές

Τα τελευταία χρόνια, οι τεχνικές ενίσχυσης νουκλεϊκού οξέος, οι οποίες εφαρμόζονται σε κολπικά δείγματα, βοηθούν σημαντικά και με εξαιρετική ακρίβεια στην ανίχνευση παθογόνων όπως: *S. agalactiae*, μυκοπλάσματα και *C. trachomatis*³.

II. Τραχηλίτιδα

Τα κύρια παθογόνα αίτια της φλεγμονής του τραχήλου της μήτρας είναι τα εξής: *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis* και μυκοπλάσματα (κυρίως το *U. urealyticum*)^{1,5}.

Λήψη του τραχηλικού δείγματος

Μετά από την απομάκρυνση κολπικών εκκρίσεων και βλέννης, λαμβάνονται κύτταρα από τον ενδοτράχηλο με κυτταρολογική βούρτσα ή στυλεό (από dacron, rayon ή αλγινικό ασβέστιο με πλαστικές ή μη αλουμιένιες συρμάτινες λαβές), με περιστροφικές κινήσεις για 3-5'' αποφεύγοντας την επαφή με τα τοιχώματα του κόλπου⁸.

Η *N. gonorrhoeae* είναι ένα παθογόνο που αρχικά μολύνει το ουρογεννητικό επιθήλιο. Συγκεκριμένα, στους άνδρες την ουρήθρα και στις γυναίκες τον τράχηλο. Η μεταφορά του τραχηλι-

κού δείγματος για την καλλιέργεια του γονοκόκου επιτυγχάνεται σε υλικό τύπου Stuart, όπου διατηρείται για 6-12 ώρες. Εναλλακτικά, όταν η μεταφορά δεν είναι δυνατόν να πραγματοποιηθεί σε αυτό το χρονικό διάστημα, συνιστάται άμεση καλλιέργεια σε θρεπτικό υλικό και επώαση για 24 ώρες πριν τη μεταφορά σε ειδικό εργαστήριο^{3,4}.

Εργαστηριακή διάγνωση

I. Η άμεση μικροσκοπική εξέταση μετά από Gram χρώση είναι θετική στο περίπου 50 % των περιπτώσεων όπου παρατηρούνται ενδοκυττάρια Gram - αρνητικοί διπλόκοκκοι. Ωστόσο, χρειάζεται προσοχή καθώς μια αρνητική Gram χρώση δεν αποκλείει τη λοίμωξη.

II. Η καλλιέργεια πραγματοποιείται σε θρεπτικό υλικό Thayer-Martin, με επώαση στους 35-37°C για 72 ώρες, σε 5-7% CO₂.

III. Η ανοσοενζυμική μέθοδος χρησιμοποιεί μονοκλωνικά αντισώματα για την ανίχνευση του γονοκοκκικού αντιγόνου.

IV. Μοριακές τεχνικές: DNA probe (υβριδισμός των νουκλεϊκών οξέων) και NAAT (Nucleic acid amplification tests - τεχνική ενίσχυσης νουκλεϊκού οξέος).

Chlamydia trachomatis: Τα χλαμύδια είναι υποχρεωτικώς ενδοκυττάρια βακτήρια¹² και απαιτούν ειδικές συνθήκες μεταφοράς και συντήρησης¹³. Όταν τα δείγματα προορίζονται για καλλιέργεια, είναι απαραίτητο να τοποθετούνται αμέσως σε ειδικό υλικό μεταφοράς το οποίο περιέχει sucrose-phosphate, γενταμυκίνη, βανκομυκίνη και νυστατίνη), να μεταφέρονται σε πάγο και να εμβολιάζονται όσο το δυνατόν γρηγορότερα (μέσα σε 24 ώρες). Εναλλακτικά, μπορούν να συντηρηθούν στους -70°C μέχρι τον εμβολιασμό. Όταν τα δείγματα προορίζονται για μοριακές τεχνικές, συνήθως ακολουθούνται οι οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρείας. Γενικά, μετά τη λήψη, ο στυλεός τοποθετείται σε 1 ml υλικό μεταφοράς (STM) και μετά από έντονη περιστροφή για 20'' και πίεση

στα τοιχώματα του σωληναρίου, απορρίπτεται. Τα δείγματα πρέπει να τύχουν επεξεργασίας μέσα σε 10 μέρες από τη συλλογή τους και φυλάσσονται στους 18-25°C^{5,9,14}.

Εργαστηριακή διάγνωση

I. Άμεση μικροσκοπική εξέταση μετά από χρώση Giemsa. Το παρασκεύασμα μονιμοποιείται με μεθανόλη για 5', χρωματίζεται για 1 ώρα με αραιωμένη (1:40 ή 1:50) Giemsa και ξεπλένεται με αιθανόλη 95%. Τα έγκλειστα εμφανίζονται μπλε-ροζ. Δεν συνιστάται πλέον λόγω χαμηλής ευαισθησίας και ειδικότητας.

II. *Κυτταροκαλλιέργεια*: πραγματοποιείται σε κύτταρα Mc Coy ή HeLa, όπου μετά από 48 έως 72ώρες τα έγκλειστα ανιχνεύονται με χρώση Giemsa ή άμεσο ανοσοφθορισμό με μονοκλωνικά αντισώματα. Η κυτταροκαλλιέργεια εμφανίζει 100% ειδικότητα και 80% ευαισθησία, είναι όμως δαπανηρή και επίπονη και γι' αυτό το λόγο χρησιμοποιείται σε πολύ λίγα εργαστήρια. Το γεγονός ότι ανιχνεύει μόνο ζώντα στοιχειώδη σωματίδια, είναι σημαντικό για την ιατροδικαστική, για τον έλεγχο του γονοτύπου και για τον έλεγχο ευαισθησίας στα αντιβιοτικά, που αποτελεί ένα δύσκολο έργο τόσο στην εκτέλεση όσο και στην αξιολόγηση.

III. Άμεσος ανοσοφθορισμός: χαρακτηρίζεται από 98-99% ειδικότητα και 75-85% ευαισθησία. Είναι μια γρήγορη μέθοδος, η οποία χρησιμοποιεί μονοκλωνικά αντισώματα έναντι της κύριας πρωτεΐνης της εξωτερικής μεμβράνης - MOMP (Major Outer Membrane Protein) ή έναντι του λιποπολυσακχαριδίου (LPS). Το MOMP φαίνεται να είναι καλύτερο διότι είναι ομοιόμορφα κατανεμημένο στην επιφάνεια των χλαμυδίων, σε αντίθεση με το LPS.

IV. *Ανοσοενζυμική μέθοδος*: χρησιμοποιούνται είτε μονοκλωνικά είτε πολυκλωνικά αντισώματα για την ανίχνευση του χλαμυδιακού LPS, που είναι πιο διαλυτό από το MOMP.

V. *Μοριακές μέθοδοι*: DNA probe και NAAT DNA probe: ο υβριδισμός των νουκλεϊκών οξέων έχει 98-99% ειδικότητα και 85% ευαισθησία.

Χρησιμοποιείται ευρέως, όπως η PACE 2 (Gen-Probe, San Diego, CA) με την οποία ελέγχεται εκτός από *C. trachomatis* και η παρουσία της *N. gonorrhoeae*. Χρησιμοποιεί τον υβριδισμό DNA-RNA, σε μια προσπάθεια αύξησης της ευαισθησίας με την εντόπιση του χλαμυδιακού RNA. Τα προτερήματα αυτής της μεθόδου είναι τα ακόλουθα: τα δείγματα είναι σταθερά μέχρι την επεξεργασία και δεν χρειάζεται να μεταφερθούν σε συνθήκες ψύξης, υπάρχει δυνατότητα παράλληλου ελέγχου για *N. gonorrhoeae*, η μεθοδολογία είναι εύκολη και υπάρχει και αυτοματοποιημένο σύστημα.

Οι τεχνικές NAAT βασίζονται στην ενίσχυση του νουκλεϊκού οξέος και θεωρούνται πλέον μέθοδος «gold standard», καθώς εμφανίζουν την καλύτερη ευαισθησία και ειδικότητα συγκριτικά με τις υπόλοιπες μεθόδους^{13,15,16}. Συχνότερα χρησιμοποιείται η PCR Amplicor (Roche Molecular Systems, USA), αλλά υπάρχουν και άλλες μέθοδοι όπως: Transcription-mediated amplification AMP-CT (Gen-Probe, USA), Transcription-mediated amplification APTIMA Combo 2 (Gen-Probe, USA) και Strand displacement amplification Probe Tec (BD Diagnostic Systems, USA). Η μέθοδος PCR ανιχνεύει την παρουσία μόνο ενός αντιγράφου DNA στο δείγμα. Το 2006 απομονώθηκε από τους Ripa και Nilsson¹⁷ στη Σουηδία, ένα μεταλλαγμένο στέλεχος το οποίο δεν μπορεί να ανιχνευτεί με τις υπάρχουσες τεχνικές NAAT. Ωστόσο, με τεχνική Real Time PCR, τόσο η εταιρεία Roche (Roche COBAS TaqMan CT v2.0) όσο και η Abbott (Abbott RealTime CT/NG) έχουν σχεδιάσει άλλο primer ειδικό για το συγκεκριμένο στέλεχος.

Για την απομόνωση των μυκοπλασμάτων χρησιμοποιούνται οι μέθοδοι που ήδη αναφέρθηκαν.

Τέλος, στο τραχηλικό δείγμα αναζητείται η παρουσία των ιών των ανθρώπινων θηλωμάτων (*Human Papillomavirus* ή HPV) με τη βοήθεια των μοριακών τεχνικών καθώς δεν καλλιεργούνται εύκολα³. Το δείγμα ενδοτραχηλικών κυττάρων τοποθετείται σε διάλυμα PreservCyt (φιαλίδιο

ThinPrep® liquid Pap) και, μετά την απομάκρυνση του στυλεού ή της κυτταρολογικής βούρτσας, μπορούν να συντηρηθούν για 3 εβδομάδες σε θερμοκρασία δωματίου, ή 12 εβδομάδες στους 2-8°C.

III. Ουρηθρίτιδα

Η ουρηθρίτιδα είναι μία φλεγμονή της ουρήθρας που προκαλείται από σεξουαλικά και μη-σεξουαλικά μεταδιδόμενους μικροοργανισμούς.

Οι συνηθέστεροι μικροοργανισμοί οι οποίοι συνδέονται με την ουρηθρίτιδα^{1,5} είναι οι εξής: *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis* και μυκοπλάσματα (*U. urealyticum*, *M. hominis*, *M. genitalium*).

Μία έως δύο εβδομάδες μετά το πέρας της θεραπείας για γονοκοκκική ουρηθρίτιδα και ενώ η κλινική εικόνα έχει βελτιωθεί, ενδέχεται σε κάποιους ασθενείς να επανέλθουν το έκκριμα και η δυσουρία. Αυτό ονομάζεται μετα – γονοκοκκική ουρηθρίτιδα και δικαιολογείται από τη συνύπαρξη από την αρχή και άλλου παθογόνου μαζί με το γονόκοκκο, που συνήθως είναι *C. trachomatis* και μυκοπλάσματα³.

Λήψη δείγματος

Η συλλογή του ουρηθρικού εκκρίματος γίνεται με προσοχή, μετά από καθαρισμό με αποστειρωμένο φυσιολογικό ορό της ουρηθρικής περιοχής, με τη βοήθεια ενός στυλεού από dacron, rayon ή αλγινικό ασβέστιο με πλαστικές ή μη αλουμιένιες συρμάτινες λαβές. Όταν δεν υπάρχει ουρηθρικό έκκριμα συνιστάται η λήψη ουρηθρικού επιχρίσματος με λεπτό στυλεό από βάθος τουλάχιστον 2 εκ. μέσα στην ουρήθρα, με περιστροφικές κινήσεις, για τη συλλογή επιθηλιακών κυττάρων, 2 ώρες μετά την ούρηση⁵.

Μεταφορά και συντήρηση

Για την απομόνωση του γονοκόκκου η μεταφορά του δείγματος θα πρέπει να πραγματοποιείται σε υλικό τύπου Stuart, όπου είναι δυνα-

τόν να διατηρηθεί για 6-12 ώρες. Εάν η μεταφορά καθυστερήσει περισσότερο, το δείγμα πρέπει να εμβολιαστεί αμέσως σε υλικό Thayer-Martin και να επωαστεί για 24 ώρες πριν τη μεταφορά. Για την απομόνωση των μυκοπλασμάτων τοποθετούμε τον στυλεό σε ένα αποστειρωμένο σωληνάριο το οποίο περιέχει 1 ml Hanks, όπου συντηρείται για 48 ώρες στους 2-8°C. Για τα χλαμύδια συνήθως ακολουθούμε τις οδηγίες του κατασκευαστή, σύμφωνα με τη μέθοδο που έχουμε αποφασίσει να χρησιμοποιήσουμε. Γενικά, τοποθετούμε τον στυλεό σε 1 ml υλικό μεταφοράς (STM) και μετά από έντονη περιστροφή για 20 δευτερόλεπτα και πίεση στα τοιχώματα του σωληναρίου, τον απορρίπτουμε. Το δείγμα διατηρείται για 10 ημέρες σε θερμοκρασία δωματίου⁵.

Μικροβιολογική διάγνωση

Η Gram χρώση του ουρηθρικού εκκρίματος αποτέλεσε πάντοτε ένα από τα διαγνωστικά όπλα για τη γονοκοκκική ουρηθρίτιδα, καθώς η ανεύρεση πολυμορφοπύρηνων μέσα στα οποία παρατηρούνται Gram – αρνητικοί διπλόκοκκοι είναι χαρακτηριστική για λοίμωξη από *N. gonorrhoeae* σε συμπτωματικούς ασθενείς. Αντιθέτως, μια αρνητική Gram χρώση δεν είναι αρκετή για να αποκλείσουμε τη λοίμωξη. Υπάρχει μία περίοδος επώασης από τη στιγμή της μόλυνσης μέχρι την έναρξη των συμπτωμάτων. Κατά τη διάρκεια αυτής, οι γονόκοκκοι δεν μπορούν να καλλιεργηθούν από την ουρήθρα για περίπου 40 ώρες, μέχρι που αρχίζει το έκκριμα. Φαίνεται ότι το ουρηθρικό επιθήλιο αποτελεί ένα προστατευτικό περιβάλλον όπου επιβιώνουν και πολλαπλασιάζονται. Για την καλλιέργεια μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε το Thayer-Martin με επώαση στους 35-37°C για 72 ώρες σε 5-7% CO₂³. Για την ανίχνευση των χλαμυδίων και των μυκοπλασμάτων χρησιμοποιούμε τις μεθόδους που αναλύθηκαν προηγουμένως.

IV. Ενδομητρικά σπειράματα

Χρησιμοποιούνται ευρέως ως μέτρο αντισύλληψης καθώς προκαλούν μια άσηπτη φλεγ-

μονώδη αντίδραση στο ενδομήτριο η οποία εμποδίζει την εμφύτευση της βλαστοκύστης. Ωστόσο, η χρησιμοποίηση των ενδομητρικών σπειραμάτων σχετίζεται με την εμφάνιση λοιμώξεων, κυρίως με την πυελική φλεγμονώδη νόσο (PID). Η PID περιλαμβάνει διάφορες λοιμώξεις, όπως ενδομητρίτιδα, σαλπυγγοθηκικό απόστημα, πυελική περιτονίτιδα και σαλπυγγίτιδα που μπορούν να οδηγήσουν σε σοβαρές επιπλοκές, όπως εξωμήτριο κύηση, υπογονιμότητα και χρόνιο πυελικό άλγος⁵.

Κατά την τοποθέτησή του, το σπείραμα αποικίζεται από μικροοργανισμούς της χλωρίδας του κόλπου και του τραχήλου. Επίσης, διάφορα μικρόβια φτάνουν στο ενδομήτριο προσκολλημένα στην επιφάνεια των σπερματοζωαρίων.

Οι λοιμώξεις που σχετίζονται με τη χρήση των ενδομητρικών σπειραμάτων οφείλονται συχνά σε πολυμικροβιακά αίτια και απομονώνονται τόσο αερόβια Gram-θετικά και Gram-αρνητικά μικρόβια όσο και αναερόβια (κυρίως *Actinomyces israelii*).

Η καλλιέργεια των ενδομητρικών σπειραμάτων ενδείκνυται μόνο όταν υπάρχουν κλινικές ενδείξεις PID ή κάποιας άλλης λοίμωξης⁵. Σε αυτές τις περιπτώσεις, αφαιρείται το σπείραμα και αποστέλλεται ολόκληρο στο εργαστήριο υπό άσηπτες συνθήκες, αμέσως. Με έναν αποστειρωμένο στυλεό, τον οποίο έχουμε εμβαπτίσει σε φυσιολογικό ορό ή αποστειρωμένο νερό, τρίβουμε προσεκτικά όλη την επιφάνεια του σπειράματος. Εμβολιάζονται τα τρυβλία για την αερόβια και αναερόβια καλλιέργεια και στη συνέχεια επωάζονται αναλόγως. Μετά τον εμβολιασμό, ετοιμάζουμε ένα άμεσο παρασκεύασμα για τη Gram χρώση, η οποία θα μας δώσει πολλές πληροφορίες για τα πιθανά παθογόνα.

V. Προστατίτιδες

Η προστατίτιδα παραμένει ένα από τα μεγαλύτερα προβλήματα των ουρολόγων γιατί αποτελεί μια δύσκολη κλινική οντότητα. Χαρακτηρίζεται από ένα σύνολο συμπτωμάτων που σχετίζονται με φλεγμονές και με άλλες κλινικές εκδηλώσεις

του προστάτη. Αναφέρεται ότι το 50% των ενηλίκων ανδρών θα εμφανίσουν συμπτώματα προστατίτιδας κατά τη διάρκεια της ζωής τους^{18,19}.

Το 1995 το NIH (Εθνικό Ινστιτούτο Υγείας των ΗΠΑ) και η Διεθνής Ομάδα Συνεργασίας για την Προστατίτιδα πρότεινε μια καινούργια ταξινόμηση με 4 κατηγορίες:

- I. Οξεία βακτηριακή προστατίτιδα
- II. Χρόνια βακτηριακή προστατίτιδα
- III. Σύνδρομο χρόνιου πυελικού άλγους
 - IIIα. Φλεγμονώδες σύνδρομο χρόνιου πυελικού άλγους
 - IIIβ. Μη φλεγμονώδες σύνδρομο χρόνιου πυελικού άλγους
- IV. Ασυμπτωματική φλεγμονώδης προστατίτιδα

Οι κυριότεροι αιτιολογικοί παράγοντες της προστατίτιδας είναι οι εξής: εντεροβακτηριακά (κυρίως *E. coli*), *Pseudomonas aeruginosa*, *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* και *Cryptococcus neoformans* (σε HIV θετικούς ασθενείς), ενώ μικροοργανισμοί όπως *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, μυκοπλάσματα, αναερόβια βακτηρίδια, κοαγκουλάση-αρνητικοί σταφυλόκοκκοι, είδη *Candida* και άλλοι μύκητες είναι δυνητικά παθογόνα^{1,5,18,19}.

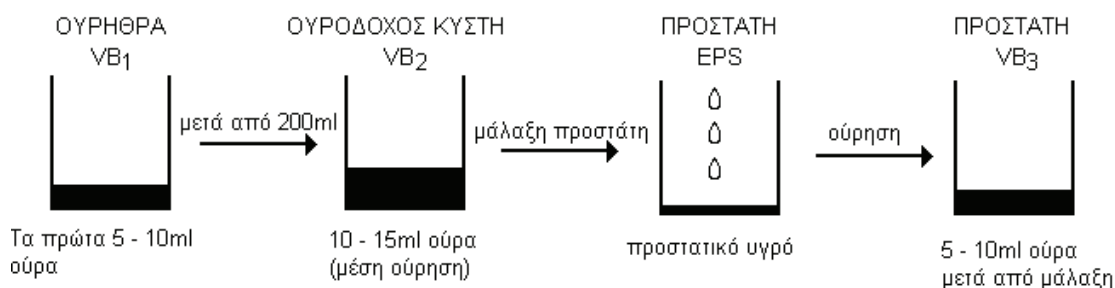
Τεχνική Meares-Stamey

Είναι μια δοκιμασία λήψης ούρων και προστατικού υγρού, διαδοχικά σε 4 αποστειρωμένα δοχεία, σε μια προσπάθεια εντοπισμού πιθανής λοίμωξης, για άμεση μικροσκόπηση και καλλιέργεια.

Η μέθοδος επινοήθηκε από τους Meares και Stamey το 1968 και ονομάζεται και «τεχνική των 4 δοχείων» (Εικόνα 1).

Κατά την προετοιμασία για τη δοκιμασία ο ασθενής θα πρέπει να ακολουθήσει τα εξής:

- όχι αντιβιοτικά ένα μήνα πριν την εξέταση
- όχι εκσπερμάτιση για 2-5 μέρες
- όχι μάλαξη του προστάτη σε υποψία ουρηθρίτιδας, ουρολοίμωξης ή οξείας βακτηριακής προστατίτιδας. Οι λοιμώξεις αυτές θα πρέπει



Εικόνα 1. Τεχνική Meares-Stamey

να θεραπευθούν για να αποφευχθούν τυχόν επιμολύνσεις των δειγμάτων.

- να μην ουρήσει για 3 ώρες και η ουροδόχος κύστη πρέπει να είναι γεμάτη
- μισή ώρα πριν την εξέταση πίνει 2 ποτήρια νερό
- η εξέταση αρχίζει όταν εμφανίζει έπειξη προς ούρηση
- πλύσιμο χεριών και βαλάνου με σαπούνι, στέγνωμα με αποστειρωμένη γάζα
- αφαιρούνται τα καπάκια των 4 δοχείων: VB₁, VB₂, EPS, VB₃

1. VB₁ (voided bladder 1): Συλλέγονται τα πρώτα 5-10 ml ούρων που αντιπροσωπεύουν την ουρήθρα

2. VB₂ (voided bladder 2): Μετά από διούρηση περίπου 200 ml ούρων στην τουαλέτα, συλλέγονται χωρίς διακοπή 10-15 ml ούρων μέσης ούρησης που αντιπροσωπεύουν την κύστη

3. EPS (expressed prostatic secretion): Μετά από μάλαξη του προστάτη για 1 λεπτό συλλέγονται λίγες σταγόνες προστατικού υγρού

4. VB₃ (voided bladder 3): Αμέσως μετά, συλλέγονται 5-10 ml ούρων που αντιπροσωπεύουν τον προστάτη

Τα δείγματα υποβάλλονται σε άμεση μικροσκοπική εξέταση (μέτρηση αριθμού πυοσφαιρίων ανά οπτικό πεδίο - 400×) και ποσοτική καλλιέργεια.

Οι καλλιέργειες θεωρούνται θετικές όταν ο αριθμός των αποικιών στα δείγματα EPS και VB₃ είναι 10 φορές μεγαλύτερος από τα δείγματα VB₁ και VB₂.

Η φλεγμονώδης μορφή της προστατίτιδας ξεχωρίζει από τον αριθμό των πυοσφαιρίων, που είναι >10 κ.ο.π. ή >10³/μl στο EPS και VB₃, όταν στο VB₁ και VB₂ δεν ανευρίσκονται πυοσφαίρια.

Η αξιολόγηση των αποτελεσμάτων της δοκιμασίας Meares-Stamey («τεχνική των 4 δοχείων») και της «τεχνικής των 2 δοχείων» φαίνεται στον Πίνακα 2.

Τεχνική των 2 δοχείων

Επειδή η δοκιμασία Meares-Stamey είναι πολύπλοκη και χρονοβόρα, δεν είναι πάντα διαθέσιμη σε ένα τμήμα επειγόντων περιστατικών. Το 1997 ο Nickel πρότεινε μία απλοποιημένη δοκιμασία με 2 μόνο δείγματα ούρων, πριν και μετά από μάλαξη προστάτη, για άμεση μικροσκόπηση και καλλιέργεια. Αν και αυτή η τεχνική δέχθηκε πολλές κριτικές, δίνει παρόμοια αποτελέσματα με την τεχνική των Meares-Stamey σε ποσοστό πάνω από 90%. Όταν υπάρχει υποψία κυστίτιδας, η οποία συνυπάρχει με χρόνια βακτηριακή προστατίτιδα, η δοκιμασία επαναλαμβάνεται μετά από 3 ημέρες θεραπείας με νιτροφουραντοΐνη ή άλλο κατάλληλο αντιβιοτικό²⁰.

VI. Σπέρμα

Αποτελείται από τα εκκρίματα των επιδιδυμίδων, των σπερματοδόχων κύστεων, του προστάτη και των περιουρηθρικών αδένων, εντός των οποίων αιωρούνται τα σπερματοζωάρια. Λόγω της συμμετοχής των διαφόρων αδένων στην

Πίνακας 2. Αξιολόγηση των αποτελεσμάτων της δοκιμασίας Meares-Stamey («τεχνική των 4 δοχείων») και της «τεχνικής των 2 δοχείων»

Διάγνωση	Παράμετρος	Meares-Stamey				Τεχνική των 2 δοχείων	
		VB ₁	VB ₂	EPS	VB ₃	Ούρα πριν τη μάλαξη	Ούρα μετά τη μάλαξη
Οξεία βακτηριακή προστατίτιδα	Πυοσφαίρια Αποικίες	+++ >10 ⁵ /ml	+++ >10 ⁵ /ml	Απαγορεύεται η μάλαξη προστάτη			
Χρόνια βακτηριακή προστατίτιδα	Πυοσφαίρια Αποικίες	- +/-	+/- +/-	+++ 10 ⁴ ml	+++ >10 ⁴ /ml	+/- +/-	+++ >10 ⁴ ml
Φλεγμονώδες σύνδρομο χρόνιου πυελικού άλγους	Πυοσφαίρια Αποικίες	- -	- -	+++ -	+++ -	- -	+++ -
Μη φλεγμονώδες σύνδρομο χρόνιου πυελικού άλγους	Πυοσφαίρια Αποικίες	- -	- -	- -	- -	- -	- -

τελική σύσταση του σπέρματος και της διέλευσης αυτού από την ουρήθρα κατά την εκσπερμάτιση, τα αποτελέσματα της μικροβιολογικής εξέτασης (Gram χρώση και καλλιέργεια) είναι δύσκολο να αξιολογηθούν. Ωστόσο, μας δίνει πληροφορίες για την πιθανή ύπαρξη κάποιας λοίμωξης στο γεννητικό σύστημα γενικότερα, ή για την παρουσία σημαντικών παθογόνων που μεταφέρονται πάνω στα σπερματοζώαρια²¹.

Η εξέταση του σπέρματος ενδείκνυται σε επιδιδυμίτιδα και ορχίτιδα, λοιμώξεις που συνήθως συνδέονται με χρόνια βακτηριακή προστατίτιδα. Επίσης, η καλλιέργεια σπέρματος είναι απαραίτητη όταν παρατηρούνται πυοσφαίρια κατά την εξέταση του σπέρματος (σπερμοδιάγραμμα) που πραγματοποιείται στο πλαίσιο του ελέγχου του υπογόνιμου άνδρα²².

Σημαντικά παθογόνα²³ τα οποία θα πρέπει να αξιολογηθούν είναι:

- Αερόβια: κυρίως εντεροβακτηριακά, ψευδομονάδα και εντερόκοκκοι
- Αναερόβια
- Chlamydia trachomatis

- Μυκοπλάσματα: *U. urealyticum*, *M. hominis*, *M. genitalium* και *M. spermatophilum* (σε υπογόνιμους άνδρες επηρεάζει την κινητικότητα και τη μορφολογία των σπερματοζωαρίων)

Λήψη του δείγματος

Για να μειωθεί η πιθανότητα επιμόλυνσης του σπέρματος με μικρόβια της χλωρίδας κατά τη διόδου του μέσω της πρόσθιας ουρήθρας, πριν τη συλλογή του δείγματος, ο ασθενής πρέπει να ουρήσει. Το σπέρμα συλλέγεται με αυνανισμό, μετά από καλό καθαρισμό της πόσθης και των χεριών, σε ένα αποστειρωμένο δοχείο με ευρύ στόμιο και βιδωτό πώμα²².

Μικροβιολογική διάγνωση

Η διάγνωση βασίζεται στην Gram χρώση και στην καλλιέργεια στα κατάλληλα θρεπτικά υλικά και επώαση υπό αερόβιες και αναερόβιες συνθήκες. Μελέτες έδειξαν ότι η καλλιέργεια σπέρματος έχει υψηλότερη ευαισθησία από τις καλλιέργειες

των EPS και VB₃ για τη διάγνωση της χρόνιας βακτηριακής προστατίτιδας^{18,24}. Για τη μεταφορά, συντήρηση και απομόνωση των μυκοπλασμάτων και *C. trachomatis* ακολουθούνται οι οδηγίες των εταιρειών σύμφωνα με τις επιλεγμένες μεθόδους.

Αξιολόγηση και απαντητικό σημείωμα

Η αξιολόγηση θα πρέπει να γίνεται, σε όλες τις περιπτώσεις, σύμφωνα με τα κλινικά στοιχεία του ασθενούς.

- Αναφέρουμε μόνο τα κλινικά σημαντικά παθογόνα
- Χειρουργικά δείγματα από περιοχές στείρες μικροβίων: αναφέρουμε όλα τα παθογόνα που απομονώθηκαν
- Δεν απομονώθηκαν παθογόνα, υπάρχει φυσιολογική χλωρίδα (ΦΧ): «Ανεπτύχθη ΦΧ του γεννητικού συστήματος»
- Απουσία ανάπτυξης: «Ουδεμία ανάπτυξη»
- Αναφέρουμε απουσία συγκεκριμένου παθογόνου που ζητήθηκε, π.χ. γονόκοκκο: «Δεν απομονώθηκε *N. gonorrhoeae*»
- Ενημερώνουμε άμεσα τον κλινικό για την παρουσία *N. gonorrhoeae*, *L. monocytogenes*, *S. agalactiae*
- *N. gonorrhoeae*, *S. pyogenes* και *Shigella*: θεωρούνται πάντα σημαντικά παθογόνα σε όλα τα δείγματα.

Διεύθυνση επικοινωνίας:

Σταυρούλα Μπάκα

Βιοπαθολόγος, Επίκουρη Καθηγήτρια, Εργαστήριο Βιοπαθολογίας, Αρεταίειο Νοσοκομείο Βασ. Σοφίας 76, 115 28 Αθήνα
e-mail: sbaka@aretaieio.uoa.gr

Summary

Genital tract specimens

S. BAKA

Department of Biopathology,
Aretaieio University Hospital-Athens
Applied Clinical Microbiology

Genital tract specimens are sent to the microbiology laboratory to determine the etiology of various clinical syndromes. The infections of the genital tract are responsible for high morbidity especially during reproductive age. Some of them, if left untreated, can cause serious consequences in women, such as infertility, ectopic pregnancy, cervical cancer, pregnancy wastage and low birth weight babies. Accurate diagnosis of the infections of the male and female genitalia depends on the separation of microbial pathogens from the normal genital microbiota. Nevertheless, many infections arise from endogenous microorganisms. In some instances, it is just as important to identify the carrier state, regardless of patient symptoms since some pathogens can be harboured asymptomatically and have been incriminated in infections of the neonate. Appropriate specimens are often difficult to obtain, particularly from women, and incorrect or suboptimal specimens are often received. Proper specimen collection is important to ensure optimal yield. In this review the following topics have been covered: genital tract specimen collection, the methods used to insure correct diagnosis of the genital tract infections as well as the interpretation of these results.

(Key words: genital tract specimens, vaginitis, bacterial vaginosis, cervicitis, urethritis, IUD, prostatitis, sperm sample).

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. **Isenberg H.** Clinical Microbiology Procedures Manual, 2nd Edition, American Society for Microbiology 2004, 03.09.01.
2. **CDC.** Sexually Transmitted Diseases Treatment Guidelines, MMWR 2006, 55, RR-11-100.
3. **Sweet RL, Gibbs RS.** Infectious diseases of the female genital tract, 5th Edition, Lippincott Williams & Wilkins 2009.
4. **Χριστάκης ΓΒ, Λεγάκης ΝΙ.** Κλινική μικροβιολογία & λοιμώξεις, Εκδόσεις Παρισιάνου, 2002.
5. NHS Investigation of genital tract and associated specimens BSOP 28 2005 www.evaluations-standards.org.uk

6. **Matytsina LA, Greydanus DE, Gurkin YA.** Vaginal microbiocenosis and cytology of prepubertal and adolescent girls: their role in health and disease. *World J Pediatr* 2010, **6**: 32-37.
7. **Stika CS.** Atrophic vaginitis. *Dermatologic Therapy* 2010, **23**: 514-522.
8. **Ελληνική Μικροβιολογική Εταιρεία.** Οδηγός λήψης και μεταφοράς κλινικών δειγμάτων στην εργαστηριακή διάγνωση των λοιμώξεων, 2001.
9. **Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC.** Manual of Clinical Microbiology, 8th Edition, American Society for Microbiology 2003.
10. **Wiesenfeld HC, Heine RP, Rideout A, Macio J, DiBiasi F, Sweet RL.** The vaginal introitus: a novel site for Chlamydia trachomatis testing in women. *Am J Obstet Gynecol* 1996, **174**: 1542-1546.
11. **Skidmore S, Horner P, Mallinson H.** Testing specimens for Chlamydia trachomatis. *Sex Transm Infect* 2006, **82**: 272-275.
12. **Agrawal T, Vats V, Salhan S, Mittal A.** The mucosal immune response to Chlamydia trachomatis infection of the reproductive tract in women. *J Reprod Immunol* 2009, **83**: 173-178.
13. **Domeika M, Savicheva A, Sokolovskiy E, Frigo N, Brilene T, Hallen A, et al.** Guidelines for the laboratory diagnosis of Chlamydia trachomatis infections in East European countries. *J EADV* 2009, **23**: 1353-1363.
14. **Winn W, Allen S, Janda W, Koneman E, Procop G, Schreckenberger P, et al.** Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology, 6th Edition, Lippincott Williams & Wilkins 2006.
15. **Gaydos CA, Ferrero DV, Papp J.** Laboratory aspects of screening men for Chlamydia trachomatis in the new millennium. *Sex Transm Dis* 2008, **35**: S45-S50.
16. **Hadgu A, Sternberg M.** Reproducibility and specificity concerns associated with nucleic acid amplification tests for detecting Chlamydia trachomatis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2009, **28**: 9-15.
17. **Ripa T, Nilsson P.** A variant of Chlamydia trachomatis with deletion in cryptic plasmid: implications for use of PCR diagnostic tests. *Euro Surveill* 2006. <http://www.eurosurveillance.org/viewArticle.aspx?ArticleId=3076>.
18. **Kermes K, Punab M, Lõivukene K, Mändar R.** Anaerobic seminal fluid micro-flora in chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome patients. *Anaerobe* 2003, **9**: 117-123.
19. **Wagenlehner FME, Diemer T, Naber KG, Weidner W.** Chronic bacterial prostatitis (NIH type II): diagnosis, therapy and influence on the fertility status. *Andrologia* 2008, **40**: 100-104.
20. **Gilbert DN, Moellering RC, Eliopoulos GM, Chambers HF, Saag MS.** The Sanford Guide to Antimicrobial Therapy, 40th Edition, Royalty Press 2010.
21. **Vigil P, Morales P, Tapia A, Riquelme R, Salgado AM.** Chlamydia trachomatis infection in male partners of infertile couples: incidence and sperm function. *Andrologia* 2002, **34**: 155-161.
22. **WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction, 5th Edition, Cambridge University Press 2010.**
23. **Gdoura R, Kchaou W, Chaari C, Znazen A, Keskes L, Rebai T, et al.** Ureaplasma urealyticum, Ureaplasma parvum, Mycoplasma hominis and Mycoplasma genitalium infections and semen quality of infertile men. *BMC Inf Dis* 2007, **7**: 129-137.
24. **Budía A, Luis Palmero J, Broseta E, Tejadillos S, Benedicto A, Queipo JA, et al.** Value of semen culture in the diagnosis of chronic bacterial prostatitis: a simplified method. *Scand J Urol Nephrol* 2006, **40**: 326-331.

ΜΕΛΕΤΗ

ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΟΥ ΥΛΙΚΟΥ *SceSel+* ΓΙΑ ΕΚΛΕΚΤΙΚΗ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ *Scedosporium/Pseudallescheria*

Μ. ΑΡΑΜΠΑΤΖΗΣ, Α. ΜΗΛΙΩΝΗ, Ε. ΗΛΙΑ, Α. ΒΕΛΕΓΡΑΚΗ

Η μελέτη αυτή τιμήθηκε με το «Βραβείο Αρσένη», 2011

Η συχνότητα αποικισμού και λοιμώξεων των αεραγωγών, ασθενών με κυστική ίνωση από σπάνιους μύκητες, όπως *Scedosporium/Pseudallescheria spp.*, έχει μελετηθεί ελάχιστα εξαιτίας της σπάνιας απομόνωσής τους σε θρεπτικά υποστρώματα ρουτίνας. Αυτό οφείλεται στην υπερανάπτυξη ταχέως αναπτυσσόμενων μυκήτων όπως *Aspergillus* και *Candida spp.* Την τελευταία τριετία, η ανάπτυξη εκλεκτικού υποστρώματος για την απομόνωση *Scedosporium/Pseudallescheria spp.* από το περιβάλλον βοηθήθηκε σημαντικά στην απομόνωση αυτών των μυκήτων από κλινικά υλικά. Σκοπός της μελέτης ήταν να ταυτοποιηθούν και να τυποποιηθούν κλινικά στελέχη της Ελλάδας *Scedosporium/Pseudallescheria* και να μελετηθεί η αποτελεσματικότητα του εκλεκτικού υποστρώματος *SceSel+*, ελέγχοντας μείγμα καθαρών καλλιεργημάτων. Τα στελέχη χαρακτηρίστηκαν πολυφασικά βάσει μορφοτύπων και αλληλουχιών των περιοχών ITS και β -*tubulin* και τυποποιήθηκαν μέσω της μεθόδου αποτύπωσης DNA (*PCR-fingerprinting*). Μεικτά εναιωρήματα (*Scedosporium/Pseudallescheria* + *Aspergillus*, *Scedosporium/Pseudallescheria* + *Candida*, *Scedosporium/Pseudallescheria* + *Exophiala*) ενοφθαλμίστηκαν σε υλικό *SceSel+* και ταυτόχρονα σε άγαρ *sabouraud*. Όλα τα εναιωρήματα έγιναν εις τριπλούν, σε φυσιολογικό ορό, σε δείγματα ρευστοποιημένων πτυέλων και βρογχοκυψελιδικού εκπλύματος. Συνολικά, κατά την τελευταία πενταετία έχουν συλλεγεί στην Ελλάδα εννέα κλινικά στελέχη *Scedosporium apiospermum s.s. (sensu stricto)* ($n=2$ από ασθενείς με ΚΙ) και πέντε στελέχη *Pseudallescheria boydii s.s.* ($n=3$ από ασθενείς με ΚΙ). Παρατηρήθηκε εξαιρετικά μεγάλη ποικιλομορφία των ειδών εντός του συμπλέγματος *Scedosporium/Pseudallescheria* και κάθε κλινικό ελληνικό στέλεχος παρήγαγε ένα μοναδικό χαρακτηριστικό γονότυπο. Το υλικό *SceSel+* έδειξε 100% ευαισθησία, με πλήρη αναστολή των μυκήτων *Aspergillus*, *Candida*, και *Exophiala* που συχνά συναπομονώνονται σε καλλιέργειες αναπνευστικών εκκρίσεων στα μυκητολογικά θρεπτικά υποστρώματα ρουτίνας. Το υλικό *SceSel+* είναι κατάλληλο για την ταχεία απομόνωση *Scedosporium/Pseudallescheria* από κλινικά υλικά με ποικίλη μυκητιακή και βακτηριακή χλωρίδα, όπως οι αναπνευστικές εκκρίσεις ασθενών με κυστική ίνωση. Ο πλήρης χαρακτηρισμός των στελεχών συμβάλλει στη χορήγηση κατάλληλης και έγκαιρης θεραπευτικής αγωγής στους ασθενείς, καθώς και στην επιδημιολογική μελέτη των λοιμώξεων.

(Λέξεις ευρετηρίου: κυστική ίνωση, *Scedosporium*, *Pseudallescheria*, εκλεκτικό υλικό, *SceSel+*, κλινικά στελέχη της Ελλάδας).

Εισαγωγή

Η κυστική ίνωση (ΚΙ) είναι μία σοβαρή και συχνή κληρονομική νόσος που οφείλεται σε μεταλλάξεις του ρυθμιστικού γονιδίου cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR), με επίπτωση 1/2500 στους Καυκάσιους¹. Η προσβολή των πνευμόνων με συνοδό αυξημένη χρόνια φλεγμονή και βακτηριακές και ιογενείς λοιμώξεις αποτελεί μείζον πρόβλημα της νόσου. Η αυξημένη επίπτωση του αποικισμού, της αλλεργικής βρογχοπνευμονικής ασπεργίλλωσης και των διεισδυτικών μυκητιάσεων, σχετίζονται με την ελαττωμένη απέκκριση βλέννης, τα συνοδά τοπικά ανοσολογικά ελλείμματα, και με την αυξημένη λήψη αντιβιοτικών και κορτικοειδών^{2,3}. Οι κυριότεροι μύκητες που ενέχονται σε πνευμονικό αποικισμό και νόσο είναι οι *Aspergillus fumigatus*, *Scedosporium/Pseudallescheria*, *Aspergillus terreus* και *Candida albicans*, ενώ δευτερεύοντα, αλλά κλινικά σημαντικά είδη, είναι οι *Aspergillus flavus*, *Emmericella nidulans*, *Exophiala dermatitidis*, και *Scedosporium prolificans*³. Έτσι, η συμμετοχή των ειδών *Aspergillus* υπολογίζεται στις αντίστοιχες παθήσεις σε 22-54% και 4-10% του πληθυσμού ατόμων με ΚΙ στην Ευρώπη, Αμερική και Αυστραλία³⁻⁶.

Το σύμπλεγμα ειδών *Scedosporium/Pseudallescheria* κατατάσσεται δεύτερο ως προς την κλινική σημασία μετά τον *A. fumigatus*, με επιπολασμό αποικισμού 8,6-10%^{4,6}. Ο μύκητας αυτός κλασικά εθεωρείτο ότι είχε ένα ανάμορφο (*S. apiospermum*), και ένα τελειόμορφο στάδιο (*P. boydii*)⁷. Νεότερες μελέτες μετά το 2005, με βάση γονιδιωματικά δεδομένα, έχουν διαφοροποιήσει μια σειρά διακριτών ειδών, όπως τα *Scedosporium apiospermum sensu stricto* (s.s.), *Pseudallescheria boydii* s.s. (τα δύο κύρια είδη που εμπλέκονται στην ΚΙ), *Scedosporium aurantiacum*, *Pseudallescheria elipsoidea* και άλλα σπανιότερα είδη^{8,9}.

Κλινικά, ο μύκητας θεωρείται σημαντικός στην ΚΙ λόγω της αιτιολογικής συμμετοχής του στη χρόνια φλεγμονή και των δυνητικών διεισ-

δυτικών λοιμώξεων (παραρρίνιοι κόλποι, πνεύμονες, κεντρικό νευρικό, συστηματική επέκταση). Επίσης συσχετίζεται με αλλεργική ευαισθητοποίηση, με αντοχή στην αμφοτερικίνη Β, καθώς και με άλλες επιπλοκές (ο αποικισμός με *Scedosporium/Pseudallescheria* αποτελεί ανένδειξη για μεταμόσχευση πνεύμονος)^{3,4}. Στην κλινική πράξη, η συχνότητά του στην ΚΙ έως πρόσφατα υπετιμάτο, λόγω της συχνής συνύπαρξης στις αναπνευστικές εκκρίσεις άλλων μυκήτων και βακτηρίων, που λόγω της ταχύτατης ανάπτυξής τους στα θρεπτικά μυκητιακά υποστρώματα ρουτίνας, όπως το άγαρ sabouraud, προκαλούσαν αναστολή ανάπτυξης *Scedosporium/Pseudallescheria*¹⁰⁻¹¹.

Πρόσφατα, ένα καλλιεργητικό υλικό, το SceSel+, που περιέχει τους εκλεκτικά ανασταλτικούς παράγοντες ανάπτυξης μυκήτων dichloran (2,6 dichloro-4-nitroaniline) και benomyl [Methyl N-(1-Butylcarbamoyl-2-benzimidazole) carbamate] καθώς και τρία αντιβιοτικά, έχει προταθεί για την αύξηση της απόδοσης των καλλιεργείων για *Scedosporium/Pseudallescheria* σε ασθενείς με ΚΙ¹⁰⁻¹². Αυτό το εκλεκτικό υπόστρωμα, αν και διαφαίνεται ότι θα διευκολύνει το κλινικό εργαστήριο στην ταχεία και αξιόπιστη έκδοση αποτελέσματος, βρίσκεται ακόμη στη φάση αξιολόγησης.

Σκοποί της παρούσας μελέτης ήταν: (α) η πολυφασική ταυτοποίηση των κλινικών στελεχών της χώρας μας και η κατάταξή τους σύμφωνα με την τελευταία ταξινόμική αναθεώρηση^{8,9}, με μελέτη του μορφότυπου και προσδιορισμό της αλληλουχίας (sequencing) κατά Sanger¹³, (β) η τυποποίηση των στελεχών της Ελλάδος βάσει των αποτυπωμάτων DNA (DNA-fingerprinting) και σύγκρισή τους με στελέχη αναφοράς παγκόσμιας προέλευσης, (γ) η in vitro αξιολόγηση του εκλεκτικού θρεπτικού υποστρώματος, με τον εμβολιασμό μεικτών καλλιεργημάτων των κλινικών στελεχών της Ελλάδος, *Scedosporium* και *Pseudallescheria* spp. με μύκητες που ανευρίσκονται συχνά στα πτύελα/βρογχοπνευμονικές εκπλύσεις (BAL) ασθενών με ΚΙ, και (δ) η αξιολόγηση του υποστρώματος υπό συνθήκες προσο-

μοίωσης ενοφθαλμίζοντας πτύελα και βρογχοπνευμονικές εκπλύσεις ασθενών με ΚΙ με μείγμα γνωστής βιομάζας κάθε ελεγχόμενου μύκητα (*Scedosporium/Pseudallescheria* και μυκήτων γνωστών για τη συμμετοχή τους σε λοιμώξεις στην ΚΙ, όπως οι ασπέργιλλοι).

Υλικά και Μέθοδοι

Στελέχη. Στην παρούσα μελέτη περιλαμβάνονται δεκατέσσερα στελέχη *Scedosporium/Pseudallescheria*, που απομονώθηκαν από λοιμώξεις Ελλήνων ασθενών την τελευταία πενταετία και ταυτοποιήθηκαν σύμφωνα με την παραδοσιακή έννοια του είδους (Πίνακας 1)^{7,14}. Επίσης, χρησιμοποιήθηκαν 21 κλινικά στελέχη της Ελλάδας από μύκητες που συχνά απομονώνονται από ασθενείς με κυστική ίνωση: *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. niger*, *A. terreus*, *Emericella nidulans*, και *Exophiala dermatitidis* (Πίνακας 1). Όλα τα στελέχη προέρχονταν από τη Συλλογή παθογόνων μυκήτων UOA/HCPF929 (<http://wdcm.nig.ac.jp/CCINFO/CCINFO.xml?929>), και 1 εβδομάδα πριν τον πειραματισμό ανακαλλιεργήθηκαν σε άγαρ malt extract (Mast, Mast Group Ltd., Merseyside, UK), στους 30°C. Τέλος, για συγκριτικούς σκοπούς τυποποίησης, χρησιμοποιήθηκαν και 28 στελέχη αναφοράς *Scedosporium/Pseudallescheria* παγκόσμιας προέλευσης, προερχόμενα από μεγάλες ευρωπαϊκές Συλλογές Μυκήτων (Πίνακας 1).

Συμβατική και Μοριακή Ταυτοποίηση. Όλα τα στελέχη ταυτοποιήθηκαν πολυφασικά, με μελέτη χαρακτηρισμών μορφολογίας και φυσιολογίας^{7,14} και με προσδιορισμό αλληλουχιών κατά Sanger (sequencing) των μυκητιακών γονιδιωματικών περιοχών internal transcribed spacer 1 & 2 (ITS) και β-τουμπουλίνης (beta-tubulin). Για την ενίσχυση των προαναφερθεισών περιοχών με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR), χρησιμοποιήθηκαν αντίστοιχα: (α) το γενικό μυκητιακό ζεύγος εκκινητών ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') / ITS4 (5'-GCTGCGTTCTTCCATCGATCG-3'), και (β) το ειδικό για τα μέλη του συμπλέγματος ει-

δών *Scedosporium/Pseudallescheria* ζεύγος εκκινητών TUBF (5'-CTGTCCAACCCCTCTTACGGCGACCTGAAC-3') / TUBR (5'-ACCC TCACCAGTATACCAATGCAAGAAAGC-3') (Interactiva Biotechnologie, Ulm, Germany)^{8,9,13}. Υιοθετήθηκαν οι ήδη δημοσιευμένες συνθήκες και στοιχειομετρία των αντιδράσεων και τα προϊόντα ενίσχυσης ανιχνεύθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 2%^{8,9,13}. Τέλος, ο προσδιορισμός αλληλουχιών κατά Sanger έγινε και προς τις δύο κατευθύνσεις της αλύσου DNA (Macrogen, Seoul, Korea).

Οι παραχθείσες αλληλουχίες των προϊόντων ενίσχυσης συγκρίθηκαν (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) και κατατέθηκαν στη δημόσια βάση δεδομένων GenBank (bankit 1148753-1148776). Η ταυτοποίηση έγινε όταν υπήρχε ομολογία αλληλουχιών $\geq 99\%$. Τέλος, όλες οι παραχθείσες αλληλουχίες κάθε περιοχής (ITS και β-τουμπουλίνης) στοιχίστηκαν (CLUSTAL-X)¹⁵ με αντίστοιχες αλληλουχίες αναφοράς *Scedosporium/Pseudallescheria* κατατεθειμένες στη GenBank^{8,9} και κατασκευάστηκαν φυλογενετικά δέντρα με τη χρήση της μεθόδου Neighbour-Joining και τη χρήση του λογισμικού MEGA v.4.¹⁶

Μοριακή τυποποίηση με μέθοδο γενετικού αποτυπώματος (PCR-Fingerprinting). Όλα τα στελέχη (κλινικά και αναφοράς) τυποποιήθηκαν μοριακά με τη χρήση του εκκινητού M13 (5'-GAGGGTGGCGGTCT-3')^{17,18}. Οι συνθήκες και η στοιχειομετρία των αντιδράσεων ήταν οι ήδη δημοσιευμένες^{17,18} και τα προϊόντα ενίσχυσης ανιχνεύθηκαν σε πήκτωμα ακρυλαμίδης διπλής συγκέντρωσης 4-6%, μετά από ηλεκτροφόρηση 3 h, 15 min σε 1% TBE, σε θερμοκρασία δωματίου στα 180 V και μετά από χρώση 15 min με βρωμιούχο αιθίδιο. Η ανάλυση των υποτύπων έγινε με το ειδικό λογισμικό Bionumerics, version 4, υποπρόγραμμα Dice Coefficient of Similarity Cluster Analysis (Bionumerics, Gent, Belgium), στο Εθνικό Κέντρο Μηνιγγίτιδος (Εθνική Σχολή Δημόσιας Υγείας, Αθήνα) με τη χρήση της μεθόδου unweighted pair-group method with arithmetic averages (UPGMA), υι-

Πίνακας 1. Στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη, πολυφασική ταυτοποίηση και προέλευση αυτών.

Στέλεχος	Είδος, πολυφασικά ταυτοποιημένο	Προέλευση (κλινικό υλικό)	Γεωγραφική προέλευση	
1	UOA/HCPF 4678	^δ <i>Scedosporium apiospermum</i>	Αρθρικό υγρό γόνατος	Ελλάς
2	UOA/HCPF 5988	<i>Scedosporium apiospermum</i>	ΕΝΥ	Ελλάς
3	UOA/HCPF 7695	<i>Scedosporium apiospermum</i>	Εκκριτική ωτίτις	Ελλάς
4	UOA/HCPF 8107	<i>Scedosporium apiospermum</i>	BAL	Ελλάς
5	UOA/HCPF 9327	<i>Scedosporium apiospermum</i>	Βρογχικές εκκρίσεις	Ελλάς
6	UOA/HCPF 9451	<i>Scedosporium apiospermum</i>	Βρογχικές εκκρίσεις, ΚΙ	Ελλάς
7	UOA/HCPF 10253	<i>Scedosporium apiospermum</i>	Βρογχικές εκκρίσεις, ΚΙ	Ελλάς
8	^ε UOA/HCPF 10648	<i>Scedosporium apiospermum</i>	BAL	Ελλάς
9	^ε UOA/HCPF 12224	<i>Scedosporium apiospermum</i>	Βιοψία ναλώδους σώματος	Ελλάς
10	UOA/HCPF 8956	^δ <i>Pseudallescheria boydii</i>	Βρογχικές εκκρίσεις, ΚΙ	Ελλάς
11	UOA/HCPF 9214	<i>Pseudallescheria boydii</i>	Βρογχικές εκκρίσεις	Ελλάς
12	UOA/HCPF 9519	<i>Pseudallescheria boydii</i>	BAL	Ελλάς
13	UOA/HCPF 9779 a	<i>Pseudallescheria boydii</i>	Βρογχικές εκκρίσεις, ΚΙ	Ελλάς
14	UOA/HCPF 9779 b	<i>Pseudallescheria boydii</i>	Βρογχικές εκκρίσεις, ΚΙ	Ελλάς
15	^α CBS 101717	<i>Pseudallescheria boydii</i>	Χώμα	Βραζιλία
16	CBS 101719	<i>Pseudallescheria boydii</i>	Λάσπη	Ολλανδία
17	CBS 101721	<i>Pseudallescheria boydii</i>	Λάσπη	Ολλανδία
18	CBS 101722	<i>Pseudallescheria boydii</i>	Λάσπη	Ολλανδία
19	CBS 101725	<i>Pseudallescheria boydii</i>	Λάσπη	Ολλανδία
20	CBS 101726	<i>Pseudallescheria boydii</i>	Λάσπη	Ολλανδία
21	CBS 100396	<i>Pseudallescheria boydii</i>	Βρογχικές εκκρίσεις	Γερμανία
22	CBS 108.54	<i>Pseudallescheria boydii</i>	Χώμα	Ζαΐρ
23	CBS 330.93	<i>Pseudallescheria boydii</i>	Βρογχικές εκκρίσεις	Ολλανδία
24	CBS 418.73	<i>Pseudallescheria ellipsoidea</i>	Χώμα	Τατζικιστάν
25	CBS 100392	<i>Pseudallescheria boydii</i>	Υποδόρια μυκητίαση	Ουγγαρία
26	CBS 100870	<i>Pseudallescheria boydii</i>	Μυκήτωμα	Γερμανία
27	^β IP 1945.90	<i>Pseudallescheria boydii</i>	Βρογχικές εκκρίσεις, ΚΙ	Γαλλία
28	IP 1742.88	<i>Pseudallescheria boydii</i>	Χώμα	Ταϊλάνδη
29	IP 1411.82	<i>Pseudallescheria boydii</i>	Μυκήτωμα	Μαρτινίκα
30	IP 1698.87	<i>Pseudallescheria boydii</i>	Λευχαιμία, πνεύμονας	Γαλλία
31	^γ d H 10653	<i>Pseudallescheria fusioidea</i>	Άγνωστο	Άγνωστο
32	d H 11810	<i>Pseudallescheria boydii</i>	Άγνωστο	Άγνωστο
33	d H 11907	<i>Pseudallescheria boydii</i>	Άγνωστο	Άγνωστο
34	d H 11908	<i>Pseudallescheria boydii</i>	Άγνωστο	Άγνωστο
35	d H 12720	<i>Pseudallescheria boydii</i>	Άγνωστο	Άγνωστο
36	d H 13246	<i>Pseudallescheria boydii</i>	Άγνωστο	Άγνωστο
37	d H 12996	<i>Pseudallescheria boydii</i>	Άγνωστο	Άγνωστο
38	d H 13030	<i>Pseudallescheria boydii</i>	Άγνωστο	Άγνωστο
39	d H 13323	<i>Pseudallescheria boydii</i>	Άγνωστο	Άγνωστο
40	d H 13324	<i>Pseudallescheria boydii</i>	Άγνωστο	Άγνωστο
41	d H 13348	<i>Pseudallescheria boydii</i>	Άγνωστο	Άγνωστο
42	d H 13555	<i>Scedosporium apiospermum</i>	Άγνωστο	Άγνωστο
43	UOA/HCPF 7510	<i>Aspergillus fumigatus</i>	Πλευριτικό υγρό	Ελλάς
44	UOA/HCPF 9188A2	<i>Aspergillus fumigatus</i>	Βρογχικές εκκρίσεις	Ελλάς

→ Συνέχεια του Πίνακα στην επόμενη σελίδα

Πίνακας 1. Συνέχεια

Στέλεχος	Είδος, πολυφασικά ταυτοποιημένο	Προέλευση (κλινικό υλικό)	Γεωγραφική προέλευση
45 UOA/HCPF 9356	<i>Aspergillus fumigatus</i>	BAL	Ελλάς
46 UOA/HCPF 3705	<i>Aspergillus flavus</i>	Βρογχικές εκκρίσεις	Ελλάς
47 UOA/HCPF 5774	<i>Aspergillus flavus</i>	BAL	Ελλάς
48 UOA/HCPF 8749	<i>Aspergillus flavus</i>	Βρογχικές εκκρίσεις	Ελλάς
49 UOA/HCPF 3960	<i>Aspergillus terreus</i>	BAL	Ελλάς
50 UOA/HCPF 5704	<i>Aspergillus terreus</i>	Βρογχικές εκκρίσεις	Ελλάς
51 UOA/HCPF 8955	<i>Aspergillus terreus</i>	Βρογχικές εκκρίσεις	Ελλάς
52 UOA/HCPF 3975	<i>Aspergillus niger</i>	Βρογχικές εκκρίσεις	Ελλάς
53 UOA/HCPF 4289	<i>Aspergillus niger</i>	Βρογχικές εκκρίσεις	Ελλάς
54 UOA/HCPF 10010A	<i>Aspergillus niger</i>	Ρίνα	Ελλάς
55 UOA/HCPF 8431B	<i>Emericella nidulans</i>	BAL	Ελλάς
56 UOA/HCPF 8722	<i>Emericella nidulans</i>	BAL	Ελλάς
57 UOA/HCPF 9011	<i>Emericella nidulans</i>	Βρογχικές εκκρίσεις	Ελλάς
58 UOA/HCPF 1841	<i>Candida albicans</i>	Βρογχικές εκκρίσεις	Ελλάς
59 UOA/HCPF 2968	<i>Candida albicans</i>	Βρογχικές εκκρίσεις	Ελλάς
60 UOA/HCPF 3507	<i>Candida albicans</i>	Βρογχικές εκκρίσεις	Ελλάς
61 UOA/HCPF 10002	<i>Exophiala dermatitidis</i>	Βρογχικές εκκρίσεις	Ελλάς
62 UOA/HCPF 12123	<i>Exophiala dermatitidis</i>	Βρογχικές εκκρίσεις	Ελλάς
63 UOA/HCPF 5674B	<i>Exophiala dermatitidis</i>	Επιμολυνθέν τραύμα	Ελλάς

α CBS, Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, Netherlands.

β IP, Institute Pasteur, Paris, France.

γ dH, Συλλογή περιορισμένης πρόσβασης του καθηγητού Sybren de Hoog, CBS, Utrecht, Netherlands.

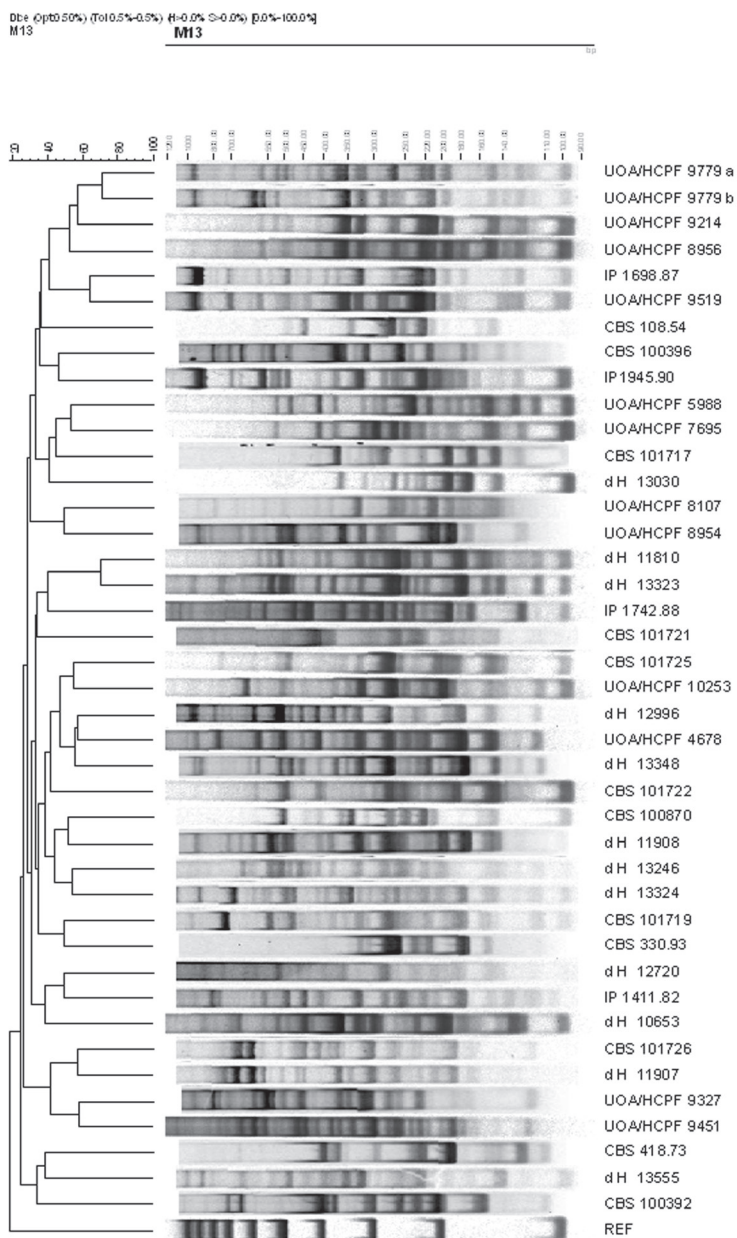
δ sensu stricto

ε Μη συμπεριληφθέντα στην τυποποίηση λόγω πρόσφατης απομόνωσης.

οθετώντας ανοχή θέσης 0,5% με στόχο τη μεγιστοποίηση του εύρους των ομοιοτήτων.

Αξιολόγηση του εκλεκτικού υλικού SceSel+ - Καλλιεργητικά υλικά και μέθοδοι. Το εκλεκτικό υλικό SceSel+ παρασκευάστηκε σύμφωνα με τις δημοσιευμένες οδηγίες^{10,12} και το άγαρ sabouraud με χλωραμφαινικόλη σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (Mast, Mast Group Ltd., Merseyside, UK) και μοιράστηκαν σε τρυβλία των 90 mm. Παρασκευάστηκαν εναιωρήματα ενοφθαλμισμού από κάθε κλινικό στέλεχος *Scedosporium/Pseudallescheria* σε συνδυασμό με κάθε ένα από τα 21 στελέχη *Aspergillus*, *Candida* και *Exophiala* (Πίνακας 1). Τα εναιωρήματα έγιναν εις τριπλούν, σε φυσιολογικό ορό, σε δείγματα ρευστοποιημένων πτυέλων και

βρογχοκυψελιδικού εκπλύματος ασθενών με θετικές καλλιέργειες *Staphylococcus aureus* (n=3) και *Pseudomonas aeruginosa* (n=3). (Συνολικά παρασκευάστηκαν 14 × 21 × 3 = 882 διαφορετικά εναιωρήματα). Για κάθε εναιώρημα και στέλεχος, και κατ' αναλογία με τις οδηγίες CLSI¹⁹ για τη μέτρηση των ελάχιστα ανασταλτικών συγκεντρώσεων (MIC) αντιμυκητιακών ουσιών έναντι νηματοειδών μυκήτων, η τελική οπτική πυκνότητα (OD) στα 530 nm ήταν 0,09-0,013, που αντιστοιχεί, μετά από αραιώση 1/1000, σε 0,4-5 × 10⁴ CFU/mL. Τα εναιωρήματα των στελεχών *C. albicans* παρασκευάστηκαν κατ' αναλογία με την οδηγία M27-A3²⁰ τελικής συγκέντρωσης 0,5-5 × 10⁴ CFU/mL. Ακολούθως, 50 μL από κάθε αραιωμένο εναιώρημα των υπό έλεγχο στε-



Εικόνα 1. Δενδρόγραμμα των υποτύπων των στελεχών *Scedosporium/Pseudallescheria*, που παρήχθη με την τυποποιητική μέθοδο αποτυπώματος DNA (PCR-fingerprinting) (εκκινητής M13). Κάθε στέλεχος της Ελλάδος παρήγαγε ένα μοναδικό χαρακτηριστικό γονότυπο, διαφορετικό από εκείνους των στελεχών αναφοράς.

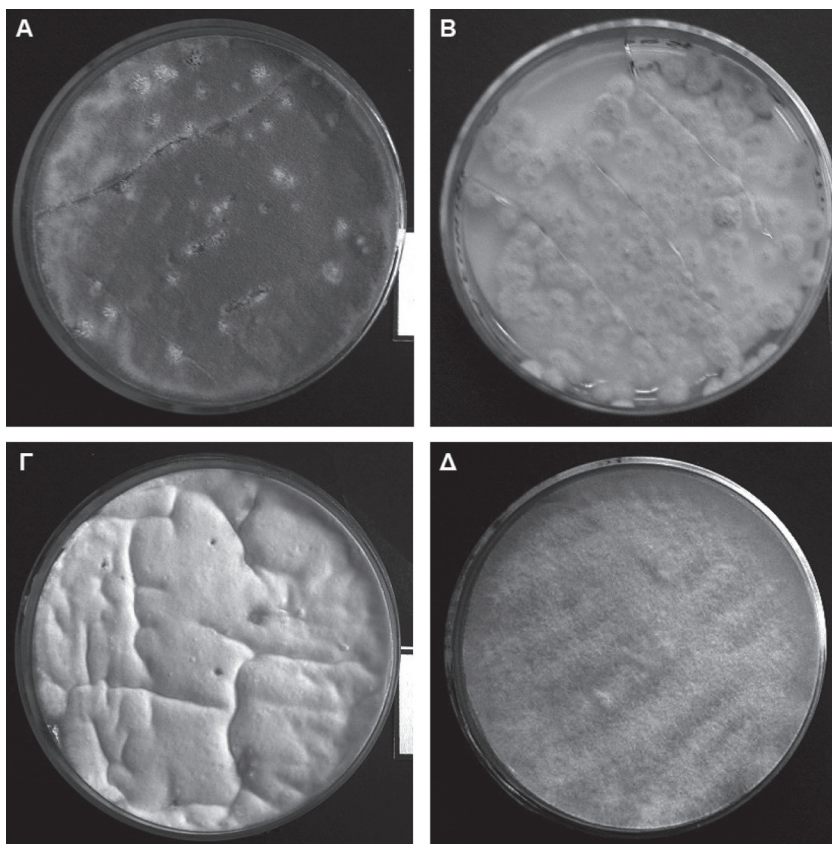
λεχών ενοφθαλμίστηκε σε ένα τρυβλίο με άγαρ sabouraud και σε ένα τρυβλίο με SceSel+, τα τρυβλία επώασθησαν στους 30°C και η μυκητιακή ανάπτυξη εκτιμήθηκε στις 24, 48 και 72 ώρες.

Αποτελέσματα

Ταυτοποίηση στελεχών. Ο Πίνακας 1 συνοψίζει τα αποτελέσματα της πολυφασικής ταυτο-

ποίησης των κλινικών στελεχών *Scedosporium/Pseudallescheria*. Συνολικά, ανευρέθησαν εννέα στελέχη *Scedosporium apiospermum* s.s. (sensu stricto) (εκ των οποίων δύο από ασθενείς με ΚΙ) και πέντε στελέχη *Pseudallescheria boydii* s.s (εκ των οποίων τρία από ασθενείς με ΚΙ).

Μοριακή τυποποίηση. Σύμφωνα με το παραθέν δενδρόγραμμα των υποτύπων των στελεχών *Scedosporium/Pseudallescheria* (Εικόνα 1) κά-



Εικόνα 2. Α-Β. Καλλιέργεια εναιωρήματος *Scedosporium/Pseudallescheria* και *Aspergillus fumigatus* σε BAL σε (Α) άγαρ sabouraud (Β) και σε εκλεκτικό υλικό SceSel+, μετά από επώαση 48 ωρών στους 30°C. Γ-Δ. Καλλιέργεια εναιωρήματος *Scedosporium/Pseudallescheria* και *Aspergillus terreus* σε BAL σε (Γ) άγαρ sabouraud και σε (Δ) εκλεκτικό υλικό SceSel+, μετά από επώαση 48 ωρών στους 30°C. Και στις δύο περιπτώσεις παρατηρείται άφθονη ανάπτυξη *Scedosporium/Pseudallescheria* στο εκλεκτικό υλικό SceSel+, σε αντίθεση με τη συρρέουσα ανάπτυξη *Aspergillus* στο άγαρ sabouraud.

θε κλινικό στέλεχος που απομονώθηκε στην Ελλάδα παρήγαγε ένα μοναδικό χαρακτηριστικό γονότυπο, διαφορετικό από εκείνο των στελεχών αναφοράς. Γενικά, παρατηρήθηκε εξαιρετικά μεγάλη ποικιλομορφία στο εσωτερικό του συμπλέγματος ειδών *Scedosporium/Pseudallescheria*, με αποτέλεσμα να μην ανευρεθεί κανένας κυρίαρχος παθογόνος υπότυπος.

Αξιολόγηση του εκλεκτικού υλικού SceSel+. Η εναισθησία του υποστρώματος SceSel+ για την απομόνωση *Scedosporium/Pseudallescheria* από μεικτά καθαρά καλλιεργήματα με *Aspergillus* ή *Candida* ή *Exophiala* spp. σε φυσιολογικό ορρό ήταν 100%. Παρομοίως, η εναισθησία του υποστρώματος SceSel+ κατά τους ελεγχόμενους μεικτούς ενοφθαλμισμούς προσομοίωσης με *Scedosporium/Pseudallescheria* + *Aspergillus*, *Scedosporium/Pseudallescheria* + *Candida* και *Scedosporium/Pseudallescheria* + *Exophiala* spp. σε πτύελα και βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα ασθενών με θετικές καλλιέργειες (1/3) *S. aureus* και

(2/3) *P. aeruginosa* ήταν 100%. Σε όλα τα τρυβλία SceSel+ παρατηρήθηκε αποκλειστική ανάπτυξη *Scedosporium/Pseudallescheria* (Εικόνα 2B και 2Δ).

Στα τρυβλία με άγαρ sabouraud αναπτύχθηκαν στις 24 ώρες μόνο λίγες μικρές αποικίες *Aspergillus*, ενώ στις 48 ώρες η ανάπτυξη *Aspergillus* spp. ήταν συρρέουσα. Εξαιρεση ανάπτυξης σε άγαρ sabouraud αποτέλεσαν δύο στελέχη: (1) *S. apiospermum* s.s. UOA/HCPF 10253 και (2) *P. boydii* s.s. UOA/HCPF 8956 (Πίνακας 1). Η ανάπτυξή τους ήταν αργή στις 72 ώρες σε σύγκριση με αυτήν του *A. fumigatus*, και οι αποικίες του στελέχους *S. apiospermum* s.s. UOA/HCPF 10253 καλύφθηκαν από συρρέουσα ανάπτυξη του στελέχους *A. fumigatus* UOA/HCPF 9188A2 (Εικόνα 2Α) και του στελέχους *P. boydii* s.s. UOA/HCPF 8956 από συρρέουσα ανάπτυξη του στελέχους *A. terreus* UOA/HCPF 5704 (Εικόνα 2Γ). Η απομόνωση καθαρών καλλιεργημάτων *S. apiospermum* s.s. και *P. boydii* s.s. από αυτές τις

μεικτές καλλιέργειες ήταν εφικτή, αλλά ιδιαίτερα χρονοβόρα απαιτώντας τέσσερις συνεχείς ανακαλλιέργειες σε άγαρ sabouraud μετά από αραιώσεις (1:100) κονιδίων σε φυσιολογικό ορό. Ο συνολικός χρόνος ανακαλλιέργειας καθάρων καλλιεργημάτων *Scedosporium/Pseudallescheria* ήταν 8 ημέρες. Εκτός των δύο αυτών στελεχών κανένα άλλο στέλεχος *Scedosporium* ή *Pseudallescheria* δεν αναπτύχθηκε στις σύγχρονες μεικτές καλλιέργειες με *Aspergillus*, *Candida* ή *Exophiala* spp.

Συζήτηση

Είδη του συμπλέγματος μυκήτων *Scedosporium/Pseudallescheria* έχουν ευρεία κατανομή στη φύση (χώρα, ευτροφικά γλυκά νερά και λιμνάζοντα, αποχετεύσεις, φυσικά λιπάσματα), και παγκόσμια κατανομή. Είναι κυρίως σαπροφυτικοί ασκομύκητες (Οικογένεια: Microascaceae). Πολλά από αυτά τα είδη, ως ευκαιριακά παθογόνα^{8,9}, ευθύνονται για μετατραυματικές λοιμώξεις, μυκήτωμα και μυκητιακή νόσο μετά από παρ' ολίγον πνιγμό σε ανοσοεπαρκείς ασθενείς²¹⁻²³, βαρύτερης πρόγνωσης πνευμονική νόσο ή γενικευμένη μυκητίαση σε ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς με μεταμόσχευση συμπαγών οργάνων, ή αιματολογικά νοσήματα⁴. Κύριο χαρακτηριστικό αυτής της ομάδας μυκήτων είναι ο νευροτροπισμός λόγω της προσέλασης του μηνιγγοεγκεφαλικού φραγμού και διείσδυσης εντός του κεντρικού νευρικού συστήματος²⁴. Κατά την τελευταία πενταετία αναφέρονται συχνά ως αποικιστές της αναπνευστικής οδού ασθενών με ΚΙ όπου χρόνιος αποικισμός προκαλεί ίνωση με ακόλουθη έκπτωση της πνευμονικής λειτουργίας²⁵.

Η παρούσα μελέτη είναι η πρώτη στην Ελλάδα όπου χαρακτηρίζονται κλινικά στελέχη του συμπλέγματος *Scedosporium/Pseudallescheria* με φαινοτυπικές και μοριακές μεθόδους. Η ορθή ταυτοποίηση κλινικών στελεχών *Scedosporium/Pseudallescheria*, παρέχει χρήσιμα επιδημιολογικά στοιχεία σε τοπικό γεωγραφικό επίπεδο για τον έλεγχο των λοιμώξεων σε ογκολογικούς/αιματολογικούς ασθενείς και σε ασθενείς με ΚΙ. Επιπλέον, λόγω της τεκμηριωμένης κλινικής α-

ντοχής έναντι μελών του συμπλέγματος στην αμφοτερικίνη Β²⁶ είναι κλινικά σημαντική η ταχεία διαφοροποίηση των ειδών *Scedosporium/Pseudallescheria* από τα είδη *Aspergillus* που συχνά συναπομονώνονται από αναπνευστικές εκκρίσεις ασθενών με ΚΙ. Σε αυτές τις περιπτώσεις, ταχεία χορήγηση κατάλληλης θεραπευτικής αγωγής βελτιώνει την πρόγνωση των λοιμώξεων και την ποιότητα ζωής των ασθενών.

Ο ακριβής χαρακτηρισμός και μοριακή τυποποίηση κλινικών στελεχών *Scedosporium/Pseudallescheria* δεν έδειξε την ύπαρξη σπάνιων μελών του συμπλέγματος, όπως η *P. elipsoidea* και το *S. aurantiacum*, στο μικρό δείγμα της μελέτης μας. Η χρήση του νέου υλικού στην καθ' ημέρα πράξη στα κλινικά εργαστήρια της χώρας μας θα οδηγήσει σε αύξηση των απομονούμενων *Scedosporium/Pseudallescheria*, φτάνοντας τα βιβλιογραφικά αναμενόμενα ευρωπαϊκά επίπεδα απομόνωσης στον πληθυσμό ασθενών με κυστική ίνωση⁵. Καθώς η χρήση του sabouraud οδηγεί ενίοτε σε καθυστέρηση της διάγνωσης και θεραπείας των λοιμώξεων από *Scedosporium/Pseudallescheria*, η αύξηση της ταχύτητας έκδοσης αποτελέσματος που προσφέρει το νέο εκλεκτικό υλικό πρέπει να αποτελέσει επιπλέον κίνητρο για την υιοθέτησή του στα κλινικά εργαστήρια του τόπου μας. Αυτό θα συμβάλει στην παροχή ταχύτερης και καταλληλότερης θεραπευτικής αγωγής και σε παροχή ρεαλιστικής επιδημιολογικής επιτήρησης στους ασθενείς με κυστική ίνωση.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η μελέτη αυτή υποστηρίχθηκε από το «Ίδρυμα Μποδοσάκη» και τον Ειδικό Λογαριασμό του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών (Κ.Α. 70/4/5905).

Θερμές ευχαριστίες στους ακόλουθους κλινικούς μικροβιολόγους για την ευγενική χορηγία κλινικών στελεχών, χωρίς την οποία δεν θα ήταν δυνατή η παρούσα μελέτη: Ε. Μαλάμου-Λαδά, Μ. Ορφανίδου, Α. Πάγκαλη, Α. Στάθη, Μ. Μαρτσούκου και Μ. Σκαρμούτσου.

Θερμές ευχαριστίες οφείλονται στην κ. Τζωρτζίνα Τζανακάκη και στον κ. Κωνσταντίνο

Κεσσανόπουλο, Εθνικό Κέντρο Μηνιγγιτίδος, Εθνική Σχολή Δημόσιας Υγείας, Αθήνα, για τη χρήση και την ενεργό βοήθεια στο χειρισμό του λογισμικού Bionumerics.

Διεύθυνση Επικοινωνίας:

Μιχαήλ Αραμπατζής

Ειδικό Εργαστήριο Μυκητολογίας, Εργαστήριο

Μικροβιολογίας, Ιατρική Σχολή, Εθνικό και

Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Μικράς Ασίας 75-77, Γουδή, Αθήνα 115 27

Τηλ: 210-7462146, Κιν.: 6974 909660,

Φαξ: 210-7462147, Email: marabatz@med.uoa.gr

Summary

Evaluation of SceSel+ medium with mixed inocula for improved isolation of *Scedosporium/Pseudallescheria* from patients with cystic fibrosis

M. ARABATZIS, A. MILIONI, I. ILIA,
A. VELEGRAKI

Mycology Laboratory, Department of Microbiology, Medical School, University of Athens
Applied Clinical Microbiology

The frequency of colonization and infection of cystic fibrosis (CF) patients' airways by rare fungi such as *Scedosporium/Pseudallescheria* has been insufficiently studied, due to their poor rate of recovery in conventional laboratory culture media. This is due to the overgrowth of rapidly grown colonizers/infection agents such as *Aspergillus* or *Candida* spp.,. In the last three years, the development of a selective isolation medium for *Scedosporium/Pseudallescheria* spp. from the environment has also improved the isolation rate of these fungi from clinical specimens. Additionally, their detailed identification became possible only after their last taxonomic revision in 2005. The aim of our study was to identify and type Greek clinical *Scedosporium/Pseudallescheria* isolates and to study the isolation efficacy of the selective medium using mixed inocula. The isolates were polyphasi-

cally identified by morphology and sequencing of ITS and β -tubulin genomic areas, and they were typed by PCR-fingerprinting (primer M13). Mixed inocula (*Scedosporium/Pseudallescheria* + *Aspergillus*, *Scedosporium/Pseudallescheria* + *Candida*, *Scedosporium/Pseudallescheria* + *Exophiala*) were inoculated in SceSel+ and sabouraud agar. All inocula were prepared in triple, in normal saline, pulmonary secretions and bronchoalveolar lavage material. During the last five years nine Greek clinical *Scedosporium apiospermum* s.s. (*sensu stricto*) isolates ($n=2$ from CF patients) and five Greek clinical *Pseudallescheria boydii* s.s. isolates ($n=3$ from CF patients) were identified. Marked strain heterogeneity was observed, with every tested isolate producing a unique and distinct subtype. SceSel+ proved 100% sensitive, with total inhibition of *Aspergillus*, *Candida*, or *Exophiala* growth. The selective SceSel+ proved excellent for rapid isolation of *Scedosporium/Pseudallescheria* from spiked clinical specimens with diverse fungal and bacterial flora, as are the respiratory secretions from CF patients. Full identification and typing of isolates prompts effective administration of antifungal therapy and supports epidemiological surveillance on *Scedosporium/Pseudallescheria* infections in this patient group.

(Key words: *Scedosporium*, *Pseudallescheria*, SceSel+ selective medium, cystic fibrosis).

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Welsh MJ, Ramsey BW, Accurso F, Cutting GR. Cystic Fibrosis. In: Sly WS, Valle D, eds. The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease, 8th edn, Vol. 3. New York: McGraw-Hill 2001, p. 5121-5188.
2. Mitchell RS, Kumar V, Robbins SL, Abbas AK, Fausto N. Cystic fibrosis. In: Robbins basic pathology. Saunders/Elsevier 2007, p. 248-250.
3. Pihet M, Carrere J, Cimon B, Chabasse D, Delhaes L, Symoens F, Bouchara JP. Occurrence and relevance of filamentous fungi in respiratory secretions of patients with cystic fibrosis-a review. Med Mycol 2009, 47: 387-397.
4. Cimon B, Carrere J, Vinatier JF, Chazallete JP, Chabasse D, Bouchara JP. Clinical significance of *Scedosporium apiospermum* in patients with

- cystic fibrosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2000, **19**: 53-56.
5. **Kaltseis J, Rainer J, De Hoog GS.** Ecology of *Pseudallescheria* and *Scedosporium* species in human-dominated and natural environments and their distribution in clinical samples. *Med Mycol* 2009, **47**: 398-405.
 6. **Williamson EC, Speers D, Arthur IH, Harnett G, Ryan G, Inglis TJ.** Molecular epidemiology of *Scedosporium apiospermum* infection determined by PCR amplification of ribosomal intergenic spacer sequences in patients with chronic lung disease. *J Clin Microbiol* 2001, **39**: 47-50.
 7. **De Hoog GS, J Guarro, J Gené, Figueras MJ.** 2000. Atlas of clinical fungi, 2nd ed. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands and University Rovira i Virgili, Reus, Spain.
 8. **Gilgado F, Cano J, Gené J, Guarro J.** Molecular phylogeny of the *Pseudallescheria boydii* species complex: proposal of two new species. *J Clin Microbiol* 2005, **43**: 4930-4942.
 9. **Gilgado F, Cano J, Gené J, Sutton DA, Guarro J.** Molecular and phenotypic data supporting distinct species statuses for *Scedosporium apiospermum* and *Pseudallescheria boydii* and the proposed new species *Scedosporium dehoogii*. *J Clin Microbiol* 2008, **46**: 766-771.
 10. **Rainer J, Kaltseis J, de Hoog SG, Summerbell RC.** Efficacy of a selective isolation procedure for members of the *Pseudallescheria boydii* complex. *Antonie Van Leeuwenhoek* 2008, **93**: 315-322.
 11. **Blyth CC, Harun A, Middleton PG, Sleiman S, Lee O, Sorrell TC, Meyer W, Chen SC.** Detection of occult *Scedosporium* species in respiratory tract specimens from patients with cystic fibrosis by use of selective media. *J Clin Microbiol* 2010, **48**: 314-316.
 12. **Rainer J, Mayr A, Lass-Flörl C, Dierich MP.** Abundance of *P. boydii* in CF-patients, detected with a semi-selective isolation method. Presented at the 2nd Meeting ECMM/ISHAM Working Group on *Pseudallescheria/Scedosporium* infections, Angers (France), 7-8 June 2007.
 13. **White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J.** 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, σελ. 315-322. Στο: *PCR Protocols: A guide to methods and applications*. M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White, (ed.) Academic Press, New York, NY.
 14. **Domsch KH, Gams W, Anderson TH.** 2007. *Pseudallescheria*, p. 408-409. In *Compendium of soil fungi*. IHW-Verlag, Eching, Germany.
 15. **Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG.** The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* 1997, **25**: 4876-4882.
 16. **Kumar S, Tamura K, Nei M.** MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Brief. Bioinform* 2004, **5**: 150-163.
 17. **Meyer W, Marszewska K, Amirmostofian M, Igraja RP, Hardtke C, Methling K, Viviani MA, et al.** Molecular typing of global isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* by polymerase chain reaction fingerprinting and randomly amplified polymorphic DNA - a pilot study to standardize techniques on which to base a detailed epidemiological survey *Electrophoresis* 1999, **20**: 1790-1799.
 18. **Delhaes L, Harun A, Chen SC, Nguyen Q, Slavin M, Heath CH, Maszewska K, et al.** Molecular typing of Australian *Scedosporium* isolates showing genetic variability and numerous *S. aurantiacum*. *Emerg Infect Dis* 2000, **14**: 282-290.
 19. **Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).** 2008. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi; approved standard, 2nd ed. M38-A2. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
 20. **Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).** 2008. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard, 3rd ed. M27-A3. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
 21. **Dupont B, Improvisi L, Ronin O.** Aspects épidémiologiques et cliniques des infections à *Scedosporium* et à *Pseudallescheria*. *J Mycol Méd* 1991, **1**: 33-42.
 22. **Stripeli F, Pasparakis D, Velegraki A, Lebessi E, Arsenis G, Kafetzis D, Tsolia M.** *Scedosporium apiospermum* skeletal infection in an immunocompetent child. *Med Mycol* 2009, **47**: 441-444.
 23. **Katragkou A, Dotis J, Kotsiou M, Tamiolaki M, Roilides E.** *Scedosporium apiospermum* infection after near-drowning. *Mycoses* 2007, **50**: 412-421.
 24. **Nesky MA, McDougal EC, Peacock JE.** *Pseudallescheria boydii* brain abscess successfully treated with voriconazole and surgical drainage: case report and literature review of central nervous system pseudallescheriasis. *Clin Infect Dis* 2000, **31**: 673-677.
 25. **Horré R, Marklein G, Siekmeier R, Reiffert SM.** Detection of hyphomycetes in the upper respiratory tract of patients with cystic fibrosis. *Mycoses* 2010, doi: 10.1111/j.1439-0507.2010.01897.
 26. **Pappas P G, Kauffman CA, Andes D, Benjamin K, Calandra Jr, T F, Edwards JE, et al.** Clinical practice guidelines for the management of candidiasis: 2009 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 2009, **48**: 503-535.

ΕΝΔΙΑΦΕΡΟΥΣΕΣ ΠΕΡΙΠΤΩΣΕΙΣ

ΟΣΤΕΟΜΥΕΛΙΤΙΔΑ ΑΚΡΑΣ ΧΕΙΡΟΣ ΑΠΟ *Rhizopus oryzae*

Σ. ΤΣΙΠΛΑΚΟΥ¹, Α. ΒΕΛΕΓΡΑΚΗ², Μ. ΑΡΑΜΠΙΑΤΖΗΣ², Α. ΚΟΥΤΣΟΥΚΟΥ¹

Ο *Rhizopus oryzae* ανευρίσκεται στο περιβάλλον και είναι το συχνότερο αίτιο ζυγομυκητίασης. Οι εν τω βάθει λοιμώξεις με οστική συμμετοχή είναι σπάνιες και εμφανίζουν υψηλά ποσοστά θνητότητας. Περιγράφεται περίπτωση εν τω βάθει μυκητιακής λοίμωξης της άκρας χειρός σε ανοσοεπαρκή ενήλικα από *Rhizopus oryzae*, η οποία περιελάμβανε σηπτική τενοντοελυτρίτιδα, νέκρωση του μέσου νεύρου και οστεομυελίτιδα του αντίχειρα του δεξιού χεριού (μετακάρπιο και φάλαγγες) και όλων των οστών του δείκτη και του μέσου δακτύλου. Η ταυτοποίηση του *Rhizopus oryzae* έγινε από τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά και με μοριακή ανάλυση. Η λοίμωξη αντιμετωπίστηκε χειρουργικά με καθαρισμό των νεκρωμένων ιστών και του μέσου νεύρου και χορηγήθηκε θεραπευτικά λιποσωματική αμφοτερικίνη Β.

(Λέξεις ευρετηρίου: *Rhizopus oryzae*, ζυγομυκητίαση, οστεομυελίτιδα σε ανοσοεπαρκή).

Εισαγωγή

Οι λοιμώξεις της άκρας χειρός από μύκητες είναι σπάνιες. Ταξινομούνται σε δερματικές, υποδόριες, εν τω βάθει, οι οποίες περιλαμβάνουν σηπτική τενοντοελυτρίτιδα, σηπτική αρθρίτιδα, οστεομυελίτιδα, και σε συστηματικές^{1,2}. Οι ανοσοκατεσταλμένοι ασθενείς εμφανίζουν μεγαλύτερο κίνδυνο να προσβληθούν από μυκητιακές λοιμώξεις. Οι περισσότερες από αυτές είναι επιφανειακές και αντιμετωπίζονται πιο εύκολα σε αντίθεση με τις εν τω βάθει και συστηματικές μυκητιακές λοιμώξεις που έχουν αυξημένα ποσοστά θνητότητας. Ο *Rhizopus oryzae* είναι το συχνότερο αίτιο ζυγομυκητίασης. Σε ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς προκαλεί προοδευτικά ε-

πιδεινούμενη νόσο με νεκρώσεις και, πολλές φορές, μοιραία κατάληξη. Σε ανοσοεπαρκείς ασθενείς η πρωτοπαθής ζυγομυκητίαση είναι σπάνια και αντιμετωπίζεται με συνδυασμό φαρμακευτικής αγωγής και επανειλημμένων χειρουργικών καθαρισμών^{3,4}. Λόγω της σπανιότητας της νόσου απαιτείται έγκαιρη διάγνωση και αναγνώριση του αιτιολογικού παράγοντα της νόσου.

Περιγραφή περίπτωσης

Άνδρας 40 ετών με κακώσεις μαλακών μορίων από πτώση και μη παρεκτοπισμένο κάταγμα ιερού οστού, μετά 10 ημέρες νοσηλείας, σε άλλο νοσοκομείο ανέπτυξε φλεγμονή στο δεξί χέρι στην είσοδο ενδοφλέβιου καθετήρα. Ετέθη διάγνωση επιφανειακής αγγειίτιδας, η οποία αντιμετωπίστηκε με κεφαλοσπορίνη 2ης γενιάς. Λίγες ημέρες αργότερα ο ασθενής ανέπτυξε τενοντοελυτρίτιδα των καμπτήρων του 4ου και 5ου δακτύλου. Ο ασθενής ήταν απύρετος. Η γενική ε-

¹Μικροβιολογικό Τμήμα ΠΓΝΑ «ΚΑΤ», ²Ειδικό Εργαστήριο Μυκητολογίας (Κ.Α 70/4/5905), Εργαστήριο Μικροβιολογίας, Ιατρική Σχολή, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

ξέταση αίματος, η ΤΚΕ και η CRP ήταν φυσιολογικές. Επίσης, ο ακτινολογικός έλεγχος ήταν φυσιολογικός. Λόγω της μη υποχώρησης των συμπτωμάτων έγινε αλλαγή της αντιμικροβιακής αγωγής σε βανκομυκίνη 1g/12ωρο και σιπροφλοξασίνη 600 mg/ανά 12ωρο. Παρατηρήθηκε ύφεση των συμπτωμάτων και ο ασθενής εξήλθε με αγωγή από το στόμα. Μετά δύο εβδομάδες παρουσίασε υποτροπή της τενοντοελυτρίτιδας των καμπτήρων και εξετάστηκε στα Εξωτερικά Ιατρεία του νοσοκομείου μας. Τα σημεία της φλεγμονής είχαν επεκταθεί σε όλα τα δάκτυλα του χεριού. Έγινε εισαγωγή στη Μικροχειρουργική Κλινική. Η ΤΚΕ ήταν αυξημένη ως 125 mm/h και η CRP ήταν 8,25 mg/dl (Φ.Τ. <0,5mg/dl). Από τον ακτινολογικό έλεγχο διαπιστώθηκε οστεομυελίτιδα, λύση των οστών του αντίχειρα (μετακάρπιο και φάλαγγες) του δεξιού χεριού και όλων των οστών του δείκτη και του μέσου δακτύλου (Εικόνα 1). Η φλεγμονή αντιμετωπίστηκε αμέσως χειρουργικά. Κατά τη διάρκεια της επέμβασης διαπιστώθηκε πυώδες καφεοειδές υγρό σε όλα τα διμερήσματα του χεριού και στα έλτρα των καμπτήρων και των εκτεινόντων τενόντων και νέκρωση του μέσου νεύρου. Έγινε χειρουργική διάνοιξη των διαφραγμάτων, υμενεκτομή των τενόντων, καθαρισμός των νεκρωμένων ιστών και του μέσου νεύρου. Ελήφθησαν δείγματα από το πύο και τους ιστούς για καλλιέργεια.

Κατά την άμεση μικροσκοπήση των δειγμάτων, έπειτα από επεξεργασία με KOH 10%, παρατηρήθηκαν λεπτές υαλοειδείς υφές χωρίς διαφραγμάτια, μακρίες σαν κορδέλα, ευρείες και ασύμμετρες (Εικόνα 2). Όλα τα δείγματα που στάλθηκαν στο εργαστήριο καλλιεργήθηκαν στα κατάλληλα θρεπτικά υλικά. Στην καλλιέργεια σε Sabouraud άγαρ με χλωραμφαινικόλη, μετά επώαση 48 ωρών σε 30°C, σε αερόβιες συνθήκες, αναπτύχθηκαν αποικίες άσπρες, χωρίς όριο, (σαν βαμβάκι), με τριχωτή εμφάνιση (Εικόνα 3). Ήταν χαρακτηριστική η γρήγορη ανάπτυξη σε όλη την επιφάνεια του τρυβλίου, με υφές που έφταναν στο σκέπασμα του τρυβλίου -εικόνα του «lid-lifter» (Εικόνα 4). Μετά 6 ημέρες το χρώμα των υφών ήταν μαύρο-γκρι. Μετά α-

πό χρώση με lactophenol cotton blue παρατηρήθηκαν υαλοειδείς στύλοι πλατείς, χωρίς διακλαδώσεις και διαφραγμάτια (σποραγγειοφόροι). Σε αντίθετη κατεύθυνση εκφύονταν 4-6 ριζοειδή. Στο άκρο των σποραγγειοφόρων υπήρχαν σφαιρικά γκρι-μαύρα σποράγγεια με ελλειψοειδή σποραγγειοσπόρια. Έγινε ανακαλλιέργεια σε Malt extract agar (MEA) και Oat meal agar (OMA) και παρατηρήθηκε καλή ανάπτυξη στους 42°C σε 48-72 ώρες (Εικόνα 5). Ήταν χαρακτηριστική η απουσία ανάπτυξης στους 45°C. Η μικροσκοπική μορφολογία έδειξε διάμετρο σποραγγείων 150-170 μm, σποραγγειοφόρου 18 μm και σπορίων 6-8 μm (Εικόνα 6). Η ταυτοποίηση έγινε από τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά, τα οποία περιλαμβάνουν τη μορφολογία των σποραγγειοφόρων, τη μορφολογία του σποράγγειου, τη μορφολογία των σποραγγειοσπορίων, την ύπαρξη ριζοειδών, από τη μέγιστη θερμοκρασία ανάπτυξης και με προσδιορισμό της αλληλουχίας (sequencing) της ενισχυθείσας με PCR διαγονιδιακής περιοχής ITS (internal transcribed spacer). Η σύγκριση των αλληλουχιών της περιοχής ITS με τις δημοσιευμένες (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) έδειξε 100% ομοιότητα με τις αλληλουχίες του *Rhizopus oryzae*. Ο έλεγχος ευαισθησίας έγινε με προσδιορισμό της ελάχιστης ανασταλτικής πυκνότητας MIC με τη μέθοδο μικροαραιώσεων κατά AFST-EUCAST και την κατά CLSI M38-A2⁵. Οι δύο μέθοδοι είχαν εξαιρετική συμφωνία για όλες τις αντιμυκητιακές ουσίες (99%, p<0,05). Οι τιμές CLSI στις αντιμυκητιακές ουσίες που ελέγχθηκαν ήταν: amphotericin B 0,5 μg/ml, 5-flucytocine 32 μg/ml, itraconazole 3 μg/ml, posaconazole 1,5 μg/ml. Βάσει κλινικοεργαστηριακών δεδομένων, οι ζυγομύκητες θεωρούνται ευαίσθητοι κατά CLSI όταν η τιμή της MIC είναι ≤1 μg/ml και μέτρια ευαίσθητοι όταν η τιμή της MIC είναι <2 μg/ml, καθώς δεν έχουν καθοριστεί σαφή όρια ερμηνείας τιμών MIC. Κλινικοεργαστηριακά δεδομένα υποδηλώνουν ότι οι κατά AFST-EUCAST τιμές MIC <2 μg/ml για τους ζυγομύκητες υποδεικνύουν ευαισθησία⁶.

Μετά την κοινοποίηση του αποτελέσματος της καλλιέργειας στην κλινική, χορηγήθηκε θε-

ραπευτικά λιποσωμιακή αμφοτερικίνη Β, 1mg/kg/24ωρο. Επί 4 εβδομάδες επραγματοποιείτο χειρουργικός καθαρισμός της περιοχής και χρήση υπερβαρικού οξυγόνου. Στο εργαστήριο εστάλησαν επιπλέον τέσσερα δείγματα για καλλιέργεια, στα οποία δεν αναπτύχθηκε ο μύκητας. Δύο μήνες αργότερα επειδή επέμενε η οστεομυελίτιδα έγινε αφαίρεση του αντίχειρα και φάλαγγας του δείκτη και του μέσου δακτύλου. Στη συνέχεια έγινε αφαίρεση των οσταιρίων του καρπού (καρπεκτομή) εκτός του πισσοειδούς και του μείζονος πολυγώνου. Έξι μήνες αργότερα η λοίμωξη είχε εξαλειφθεί και ακολούθησε χειρουργική αποκατάσταση των δακτύλων και αρθρόδεση του καρπού.

Επειδή ο μύκητας *Rhizopus oryzae* αποτελεί αίτιο λοίμωξης σε ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς έγινε περαιτέρω εργαστηριακός έλεγχος για τη διερεύνηση τυχόν προδιαθεσικών παραγόντων για ανάπτυξη λοίμωξης από ζυγομύκητα, όπως σάκχαρο αίματος, βιοχημικές δοκιμασίες, ποσοτικός προσδιορισμός ανοσοσφαιρινών και ακτινογραφία θώρακος. Από τον έλεγχο που έγινε δεν διαπιστώθηκε κάποιος προδιαθεσικός παράγοντας στον ασθενή.

Συζήτηση

Ο μύκητας *Rhizopus oryzae* (arhizus) ανήκει στους ζυγομύκητες, στην τάξη των Mucorales, στην οικογένεια των Mucoraceae, και στο γένος *Rhizopus*. Τα χαρακτηριστικά που οδηγούν στην ταυτοποίηση κατά γένος είναι η ύπαρξη ριζοειδών και ο πολλαπλασιασμός που γίνεται με μονογονική αναπαραγωγή (asexual) με σποραγγειοσπόρια, καθώς και με αμφιγονική αναπαραγωγή (sexual) με ζυγοσπόρια^{2,3,4,7}.

Ο *Rhizopus oryzae* ανευρίσκεται στον αέρα, στο χώμα, σε φυτά και φρούτα σε αποσύνθεση, σε παλιά τρόφιμα, όπως ψωμί, σε περιττώματα ζώων και πτηνών, σε κλιματιστικά, ιματισμό και αλλού. Η ζυγομυκητίαση, γνωστή και ως μορφομυκητίαση, είναι η πιο συχνή νόσος που προκαλούν οι ζυγομύκητες με συχνότερο αίτιο τον *Rhizopus oryzae*. Η νόσος προκαλείται μετά από εισπνοή σπορίων, την είσοδό τους με την τροφή,

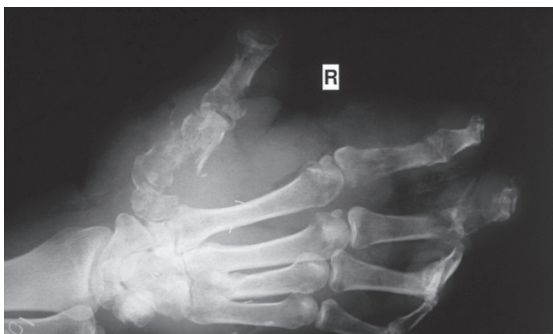
από μόλυνση τραυμάτων, ή προσβολή αγγείων. Πιο συχνά προσβάλλονται ανοσοκατεσταλμένοι ασθενείς και η νόσος έχει μεγάλη θνητότητα. Μορφές της ζυγομυκητίασης μπορεί να είναι η ρινοεγκεφαλική, κρανιοπροσωπική, της γαστρεντερικής οδού, πνευμονική, δερματική, βλεννογονοδερματική, ουρογεννητικού και διάχυτη γενικευμένη. Επίσης μπορεί να υπάρχει προσβολή αγγείων με νέκρωση ιστών, οστών και νεύρων^{3,4}.

Οι προδιαθεσικοί παράγοντες αναφέρονται στον Πίνακα 1. Οι ανοσοεπαρκείς ασθενείς, όπως ο ασθενής μας, συνήθως εμφανίζουν τη δερματική μορφή της νόσου από ανάπτυξη του *Rhizopus oryzae* σε προϋπάρχουσα βλάβη. Η είσοδος του μύκητα οδηγεί σε φλεγμονώδη αντίδραση με δημιουργία πύου και αποστήματος. Η επέκταση στους ιστούς τοπικά έχει ως αποτέλεσμα την προσβολή του λιπώδους ιστού των μυών και της περιτονίας των μυών (νεκρωτική απονευρωσίτιδα), των τενόντων (τενοντοελυτρίτιδα) και των νεύρων. Η κατά συνέχεια ιστού προσβολή των οστών οδηγεί σε οστεομυελίτιδα, όπως στο συγκεκριμένο ασθενή. Στη συνέχεια μπορεί να ακολουθήσει διείσδυση στα αγγεία η οποία έχει υψηλή θνητότητα, ως 80%^{2,3,4,8}.

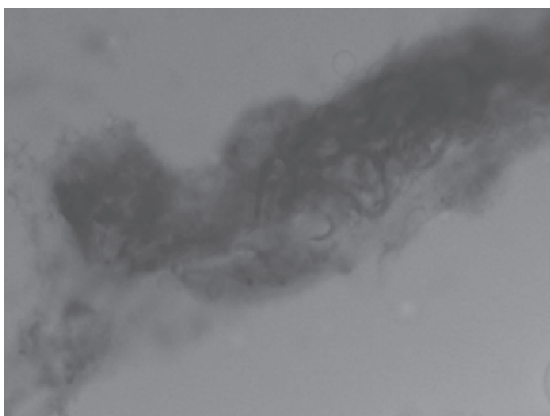
Η θεραπεία περιλαμβάνει συνδυασμό φαρμακευτικής αγωγής με την αμφοτερικίνη Β να αποτελεί το φάρμακο εκλογής. Σε διάφορες μελέ-

Πίνακας 1. Προδιαθεσικοί παράγοντες για την ανάπτυξη ζυγομυκητίασης.

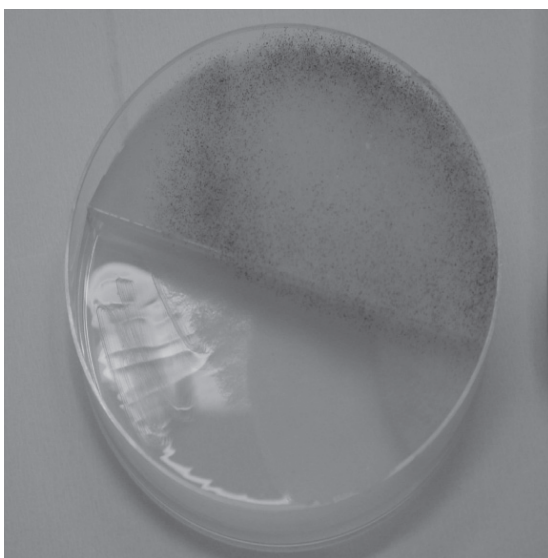
Σακχαρώδης διαβήτης – οξέωση
Ουδετεροπενία
Ανοσοκαταστολή
Αιματολογικές κακοήθειες νόσοι - Όγκοι
Μεταμόσχευση οργάνων, μυελού των οστών
Λήψη αντιμικροβιακών φαρμάκων
Λήψη κορτικοστεροειδών
Νεφρική ανεπάρκεια
Θεραπεία με δεσφεροξαμίνη
Εκτεταμένα εγκαύματα - Χειρουργικά τραύματα
Συστηματικός ερυθματώδης λύκος
Ενδοφλέβιοι καθετήρες
Μολυσμένα ράμματα, επίδεσμοι, κολλητικές ταινίες, γλωσσοπίεστρα, κ.ά.



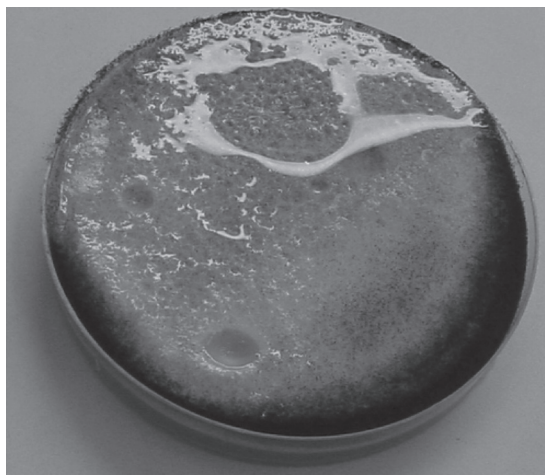
Εικόνα 1. Ακτινολογική εικόνα οστεομυελίτιδας των οστών του αντίχειρα της δεξιάς χειρός και όλων των φαλάγγων του δείκτη και του μέσου δακτύλου.



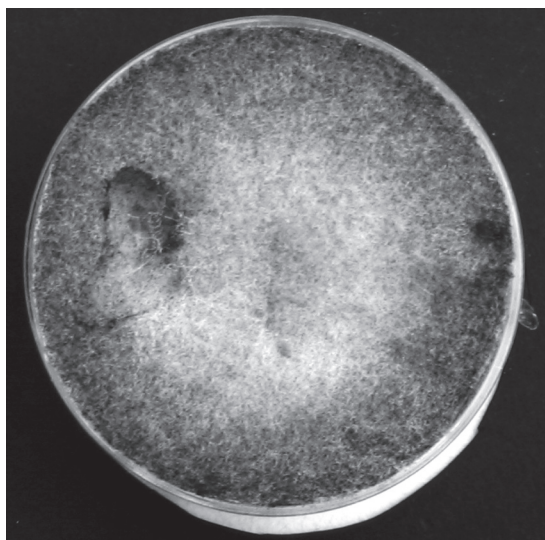
Εικόνα 2. Υαλοειδείς υφές πλατιές, χωρίς διαφραγμάτια (χρώση με lactophenol cotton blue).



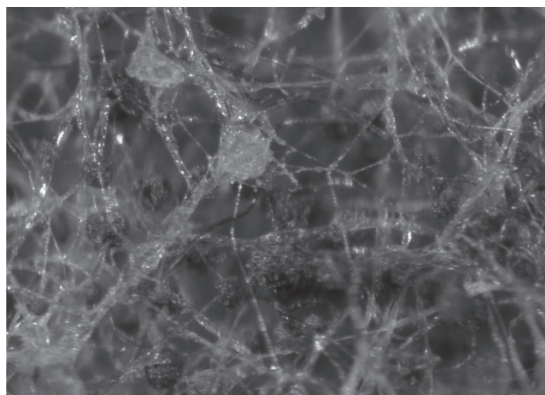
Εικόνα 3. Αποικίες του *Rhizopus oryzae* μετά 48 ώρες.



Εικόνα 4. Μακροσκοπική εικόνα αποικιών του *R. oryzae* με υφές που φτάνουν στο σκέπασμα του τρυβλίου - «lid-lifter».



Εικόνα 5. Μακροσκοπική εικόνα αποικιών σε Oat meal agar.



Εικόνα 6. Στερεομικροσκοπική εικόνα σποραγγείου.

τες στη βιβλιογραφία η ποσακοναζόλη και η ιτρακοναζόλη έχουν χρησιμοποιηθεί και μπορεί να είναι δραστικές. Η βορικοναζόλη δεν είναι δραστική έναντι των ζυγομυκήτων, καθώς και οι εχινοκανδίνες και η φλουκυτοσίνη^{8,9}. Η χειρουργική αντιμετώπιση είναι απαραίτητη και περιλαμβάνει επανειλημμένους χειρουργικούς καθαρισμούς, όπου αυτό είναι δυνατό. Η χρήση υπερβαρικού οξυγόνου 10 atm σε 24°C επί 1-2 εβδομάδες μπορεί να έχει θετικά αποτελέσματα στην αντιμετώπιση της νόσου¹⁰. Τέλος, είναι σημαντικό να γίνεται προσπάθεια διόρθωσης των προδιαθεσικών παραγόντων κινδύνου.

Ο εργαστηριακός γιατρός πρέπει να γνωρίζει και να υποπτευθεί το μύκητα για να γίνει η διάγνωση του *Rhizopus oryzae*. Η έγκαιρη διάγνωση είναι κρίσιμη για την ορθή αντιμετώπιση μιας απειλητικής για τη ζωή λοίμωξης.

Διεύθυνση επικοινωνίας:

Σοφία Τσιπλάκου

Ιατρός Βιοπαθολόγος, Επιμελήτρια Α',

Μικροβιολογικό Τμήμα ΠΓΝΑ «ΚΑΤ»

Νίκης 2, 14561 Κηφισιά

Τηλ: 2106280502, e-mail: stsiplakou@gmail.com

Summary

A rare case of osteomyelitis of the hand due to *Rhizopus oryzae* in an immunocompetent patient

S. TSIPLAKOU¹, A. VELEGRAKI²,
M. ARABATZIS², A. KOUTSOUKOU¹

¹Microbiology Laboratory "KAT" Hospital, ²My-
cology Laboratory, Department of Microbiology,
Medical School, National and Kapodistrian
University of Athens, Athens, Greece
Applied Clinical Microbiology

Rhizopus oryzae is a filamentous fungus frequently isolated in the environment and is the most common organism isolated from patients with zygomycosis. Deep zygomycosis with bone involvement is rare and has a high mortality rate. A case of primary deep zygomycosis of the hand in an immunocompetent patient is presented. Infection involved flexor tenosynovitis, necrosis of the median nerve and os-

teomyelitis of the thumb of the right hand and all the phalanges of index and middle finger. Laboratory identification was performed using both morphological features and molecular analysis. Treatment included surgical synovectomy of all tendons and extensive debridement of all necrotic tissue including the median nerve and administration of amphotericin B.

(Key words: *Rhizopus oryzae*, zygomycosis, osteomyelitis).

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Moran SL, Strickland J, Shin AY. Upper-extremity mucormycosis infections in immunocompetent patients. *J Hand Surg* 2006, **31**(7): 1201-1205.
2. Richardson MD, Kahkola PK, Shankland GS. *Rhizopus*, *Rhizomucor*, *Absidia* and other agents of systemic and subcutaneous zygomycosis. In *Manual of Clinical Microbiology*, 8th Edition, American Society for Microbiology 2003, p 1761-1780.
3. Ibrahim AS, Edwards JE, Filler SG. Zygomycosis. In *Clinical Mycology*. Oxford University Press 2003, p. 241-251.
4. Spellberg B, Edwards J Jr, Ibrahim A. Novel perspectives on mucormycosis: pathophysiology, presentation, and management. *Clin Microbiol Rev* 2005, **18**: 556-569.
5. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) 2008. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi; approved standard, 2nd ed. M38-A2. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
6. Cuenca-Estrella M, et al. AFST Subcommittee of EUCAST. Multicentre determination of quality control strains and quality control ranges for antifungal susceptibility testing of yeasts and filamentous fungi using the methods of the Antifungal Susceptibility Testing Subcommittee of the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (AFST-EUCAST). *Clin Microbiol Infect*. 2007, **13**: 1018-1022.
7. Schwarz P, et al. Molecular identification of zygomycetes from culture and experimentally infected tissues. *J Clin Microbiol*. 2006, **44**(2): 340-349.
8. Greenberg RN, Scott LJ, Vaughn HH, Ribes JA. Zygomycosis (mucormycosis): emerging clinical importance and new treatments. *Curr Opin Infect Dis* 2004, **17**: 517-525.
9. Alastruey-Izquierdo A, et al. In vitro activity of antifungals against Zygomycetes. *Clin Microbiol Infect* 2009, **15** (s5): 71-76.
10. Tragiannidis A and Groll AH. Hyperbaric oxygen therapy and other adjunctive treatments for zygomycosis. *Clin Microbiol Infect* 2009, **15** (s5): 82-86.