

1

ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΤΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ

Ταξινόμηση μικροβίων

Η ταξινόμηση των μικροβίων βασίζεται στις γονοτυπικές και φαινοτυπικές ομοιότητές τους. Η γνώση της ταξινομικής θέσης του παθογόνου μικροοργανισμού βοηθάει στην εκτίμηση της παθογένειας αλλά και της ανθεκτικότητας του μικροβίου στα χημειοθεραπευτικά. Συνδυασμός βιοχημικών, ορολογικών και μοριακών τεχνικών χρησιμοποιούνται σήμερα για την ταξινόμηση των μικροβίων. Η συμπεριφορά τους όμως στις κλασσικές χρώσεις και τα μορφολογικά χαρακτηριστικά τους συνεχίζουν να αποτελούν τα βασικά κριτήρια για την ταξινόμησή τους.

Η μικροσκοπική παρατήρηση της μορφολογίας των μικροβίων απαιτεί τον χρωματισμό τους με κοινές ή φθορίζουσες χρωστικές. Με βάση τη δυνατότητα χρώσης των μικροβίων και τα μορφολογικά τους χαρακτηριστικά διακρίνονται σε τρεις μεγάλες ομάδες. 1) Τα μικρόβια που χρωματίζονται εύκολα με την χρώση Gram 2) Τα οξεάντοχα μικρόβια και 3) τα σπειροχαιτικά. Η χρώση κατά Gram αποτελεί την σημαντικότερη τεχνική για την αρχική ταυτοποίηση των μικροβίων στα εργαστήρια κλινικής μικροβιολογίας. Διαχωρίζει τα μικρόβια σε Gram-θετικά (ιώδη) και Gram-αρνητικά (ερυθρά) και πραγματοποιείται σε τέσσερα στάδια. Στην πρώτη φάση χρησιμοποιείται το κρυσταλλικό ιώδες, ακολουθεί το ιώδιο (διάλυμα Lugol) που δρα ως μονιμοποιητικό της πρώτης χρωστικής, μια αλκοόλη ή ακετόνη που εφαρμόζεται για τον αποχρωματισμό και τέλος χρησιμοποιείται μια ερυθρά χρωστική, όπως είναι η σαφρανίνη, η οποία μεταχρωματίζει όσα από τα μικρόβια έχουν αποχρωματισθεί. Η συμπεριφορά ενός μικροβίου στη Gram-χρώση καθορίζεται από τη δομή του κυτταρικού του τοιχώματος. Μετά την εφαρμογή της ιώδους χρωστικής, τα Gram-θετικά μικρό-

βια χρωματίζονται κυανά και αυτό το χρώμα διατηρείται και μετά την επίδραση του μέσου αποχρωματισμού. Αυτό οφείλεται πιθανώς στη μεγάλη περιεκτικότητα του τοιχώματος των μικροβίων αυτών σε βλεννοπεπτίδια και τειχοϊκά οξέα, που τα καθιστά πιο όξινα και τους προσδίδει μεγαλύτερη συγγένεια προς τις βασικές χρωστικές. Τα Gram-αρνητικά μικρόβια, αρχικά βάφονται κυανά, μετά όμως από την επίδραση της ακετόνης αποχρωματίζονται και μεταχρωματίζονται ερυθρά με τη σαφρανίνη. Ο αποχρωματισμός των Gram-αρνητικών μικροβίων οφείλεται στη μεγαλύτερη διαπερατότητα του κυτταρικού τους τοιχώματος, που επιτρέπει την έκπλυση της ιώδους χρωστικής μετά την επίδραση της αλκοόλης ή ακετόνης.

Για το χρωματισμό μικροβίων με υψηλή περιεκτικότητα λιπιδίων στο κυτταρικό τους τοίχωμα, όπως τα μυκοβακτηρίδια και οι νοκάρδιες, που δε χρωματίζονται ικανοποιητικά με τη χρώση κατά Gram, χρησιμοποιούνται οι οξεάντοχες χρώσεις. Στη χρώση Ziehl-Neelsen, που είναι η συχνότερα χρησιμοποιούμενη για οξεάντοχα μικρόβια, αρχικά εφαρμόζεται φαινικούχος φουξίνη, ενώ το παρασκεύασμα θερμαίνεται για να διευκολυνθεί η είσοδος της χρωστικής στο μικροβιακό κύτταρο. Ακολουθεί αποχρωματισμός με οξινομένη αλκοόλη και μεταχρωματισμός με κυανό του μεθυλενίου. Τα οξεάντοχα μικρόβια διατηρούν την πρώτη χρωστική και χρωματίζονται ερυθρά, ενώ τα υπόλοιπα μικρόβια κυανά.

Μία άλλη κατηγορία μικροβίων είναι τα σπειροχαιτιακά, κινητοί μικροοργανισμοί με λεπτό κυτταρικό τοίχωμα. Η μικροσκοπική παρατήρησή τους δεν είναι δυνατή με τη Gram-χρώση, παρά μόνο με χρώσεις με άλατα αργύρου σε κοινό μικροσκόπιο ή με μικροσκόπηση χωρίς χρώση, σε σκοτεινό πεδίο. Στα σπειροχαιτιακά περιλαμβάνονται τα τρεπονήματα, οι μπορέλλιες και οι λεπτόσπειρες.

Τα μικρόβια έχουν μέγεθος που ποικίλει από 0,4-2 μm. Ανάλογα με τη μορφολογία τους διακρίνονται στους κόκκους, που είναι σφαιρικοί, τα βακτηρίδια, που έχουν σχήμα ραβδίου και τις σπειροχαιίτες, που είναι ελικοειδείς. Το κάθε είδος μικροβίων μπορεί να εμφανίζει χαρακτηριστικούς σχηματισμούς. Οι κόκκοι μπορούν να παρουσιάζονται μονήρεις, σε ζεύγη (διπλόκοκκοι), σε αλύσους (στρεπτόκοκκοι) ή σε μεγάλες ομάδες (σταφυλόκοκκοι). Τα βακτηρίδια ποικίλουν ιδιαίτερα ως προς το σχήμα και το μέγεθος, από τους βραχείς κοκκοβάκιλλους έως τα μακρά νηματοειδή βακτηρίδια, τα άκρα τους μπορεί να είναι στρογγυλά ή ορθογώνια και μερικά είναι κεκαμμένα, ενώ μπορεί να εμφανίζονται μονήρη, σε αλύσους ή διαταγμένα το ένα πλάι στο άλλο. Τέλος, οι σπειροχαιίτες ποικίλουν ως προς το μήκος και τον αριθμό των ελίκων.

Οι πρόοδοι της τεχνολογίας έχουν καταστήσει δυνατή την ταξινόμηση με ανάλυση της γενετικής συγγένειας μεταξύ των μικροβίων (δομή και ομολογία του DNA και RNA). Ιδιαίτερα χρήσιμη γι' αυτό το σκοπό έχει φανεί η ανάλυση του ριβοσωμικού RNA (rRNA). Οι πληροφορίες που έχουν προκύψει από αυτές τις μελέτες του γενετικού υλικού οδήγησαν σε επαναταξινόμηση μερικών μικροβίων. Η ανάπτυξη βάσης δεδομένων για την ταξινόμηση των μικροβίων αποτελεί σήμερα την σημαντικότερη προϋπόθεση για τον προσδιορισμό νέων ειδών μικροβίων.

Ταξινόμηση ιών

Οι ιοί είναι οι μικρότεροι λοιμογόννοι μικροοργανισμοί και περιέχουν ένα μόνο είδος νουκλεονικού οξέος. Ριβοσώματα και μηχανισμός σύνθεσης πρωτεϊνών απουσιάζει στους ιούς, με αποτέλεσμα να μην πολλαπλασιάζονται σε τεχνητά θρεπτικά υλικά αλλά μόνο σε ζωντανά κύτταρα. Ταξινομούνται ανάλογα με τον τύπο του νουκλεϊκού οξέος που περιέχουν, σε DNA και RNA ιούς. Ταξινομούνται σε διάφορες οικογένειες με βάση το μέγεθος του ιϊκού σωματιδίου, τον αριθμό των καψομεριδίων, το κατά πόσον το βίριο εμφανίζεται ελεύθερο ή με περίβλημα και από ορισμένα χαρακτηριστικά του πυρηνικού οξέος (μοριακό βάρος, μονόκλωνο ή δίκλωνο). Μέσα στην κάθε οικογένεια, τα γένη και τα είδη των ιών ταξινομούνται με βάση την αντιγονικότητα σε συνδυασμό με άλλα χαρακτηριστικά των ιών και ιδιαίτερα την ομολογία της γενετικής τους αλληλουχίας. Η διάταξη των καψιδίων των ιών επέτρεψε ακόμη το μορφολογικό τους διαχωρισμό σε ιούς με κυβική (εικοσαεδρική), ελικοειδή ή σύνθετη συμμετρία. Οι περισσότεροι παθογόνοι ιοί ανήκουν σε οικογένειες και γένη που περιέχουν RNA ιούς (π.χ. εντεροϊοί, ρινοϊοί, ορθοβλεννοϊοί), ενώ από τους DNA ιούς οι κύριως παθογόνοι είναι οι ιοί ραρονα, οι αδενοϊοί, οι ερπητοϊοί και ο ιός της ηπατίτιδας Β. Οι ρετροϊοί είναι RNA ιοί που μετά την είσοδό τους στο κύτταρο του ξενιστή μετατρέπουν το γενετικό τους υλικό σε DNA με το ένζυμο ανάστροφη τρानσκριπτάση.

Ταξινόμηση μυκήτων

Οι μύκητες, σε αντίθεση με τα μικρόβια, είναι ευκαρυωτικοί μικροοργανισμοί, έχουν δηλαδή πυρήνα με πυρηνική μεμβράνη και μιτοχόνδρια. Είναι αερόβιοι, αναπτύσσονται σε μεγάλη ποικιλία τιμών του pH και κυρίως σε υγρό περιβάλλον, αν και τα σπόρια και τα κονίδια επιβιώνουν και σε συνθήκες ξηρασίας. Οι μύκητες μπορούν να αναπτυχθούν ως μα-

κρά νημάτια (υφές), με τις διακλαδώσεις των οποίων σχηματίζονται τα μυκητήλια, ως μονήρεις μύκητες ή ως μακρά μη διακλαδούμενα νημάτια (ψευδοϋφές). Ο πολλαπλασιασμός τους γίνεται είτε με μίτωση, κατά την οποία παρατηρείται εκβλάστηση θυγατρικού κυττάρου, είτε με μείωση που χαρακτηρίζεται από σύζευξη μυκηλλιακών κυττάρων ή βλαστοκυττάρων του ίδιου του μύκητα. Οι μύκητες που κυρίως ενοχοποιούνται στην πρόκληση λοιμώξεων του ανθρώπου, ταξινομούνται σε τέσσερις ομάδες. Οι Ζυγομύκητες, όπως είναι οι μύκητες *Mucor*, *Rhizopus*, *Absidia*, είναι συχνά ευκαιριακά παθογόνοι μύκητες σε ανοσοκατασταλμένους ασθενείς. Οι Ασκομύκητες με κυριότερους τους *Blastomyces dermatidis*, *Histoplasma capsulatum*, *Microsporium* spp., *Trichophyton* spp. και *Epidermophyton* spp., προκαλούν διάφορες λοιμώξεις κυρίως σε ανοσοκατασταλμένους ασθενείς. Οι Βασιδιομύκητες, απομονώνονται σπάνια από κλινικά δείγματα, αλλά μετά την αύξηση των ασθενών με AIDS ανευρίσκονται συχνότερα, όπως ο *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans*. Τέλος, στη κατηγορία των ατελών μυκήτων ανήκουν οι συχνότερα απομονούμενοι από μυκητιάσεις του ανθρώπου (π.χ. *Candida albicans*, *Sporothrix schenckii*). Οι μύκητες μπορούν επίσης να διαχωριστούν ανάλογα με το αν προκαλούν επιφανειακές ή εν τω βάθει λοιμώξεις. Έτσι, επιφανειακές λοιμώξεις μπορούν να προκαλέσουν τα δερματόφυτα (*Microsporium* spp., *Trichophyton* spp. και *Epidermophyton* spp.), καθώς και οι *Aspergillus niger*, *Candida albicans* και *Malassezia furfur*, ενώ εν τω βάθει και συστηματικές λοιμώξεις προκαλούνται από διάφορους μύκητες, όπως οι *Aspergillus fumigatus*, *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatidis* και *Coccidioides immitis*.

Παράγοντες που επηρεάζουν τη λοιμογόνο δύναμη των μικροβίων

Η λοιμογόνος δύναμη, δηλαδή η ικανότητα του μικροβίου να προκαλεί νόσο σε έναν ξενιστή, ποικίλει μεταξύ των μικροβίων του ίδιου είδους ή διαφορετικών ειδών. Πειραματικά μπορεί να εκτιμηθεί με τον υπολογισμό της θανατηφόρου δόσης του μικροβίου (lethal dose), του αριθμού δηλαδή των μικροβίων που απαιτούνται για τη θανάτωση του 50% των πειραματοζώων στα οποία ενοφθαλμίζεται το μικρόβιο αυτό. Όσο πιο λοιμογόνος είναι ένα μικρόβιο, τόσο μικρότερη είναι η θανατηφόρος δόση του. Για την αύξηση της λοιμογόνου δύναμης των μικροβίων ευθύνονται διάφοροι παράγοντες, κυριότεροι των οποίων είναι τοξίνες και έλκτρα των μικροβίων. Μερικά παραδείγματα αποτελούν οι εξωτοξίνες των κλωστηριδίων και του κορυνοβακτηριδίου της διφθερίτιδας, η ερυθρογόνος τοξί-

νη του στρεπτοκόκκου, η εντεροτοξίνη του σταφυλοκόκκου ή οι ενδοτοξίνες των Gram-αρνητικών βακτηριδίων και το έλυτρο του *Haemophilus influenzae* τύπου β ή το αντιγόνο Vi της *Salmonella typhi*. Επίσης, για την αύξηση της λοιμογόνου δράσης έχουν ενοχοποιηθεί παράγοντες που προάγουν την προσκόλληση των μικροβίων στους ιστούς του ξενιστή, όπως τα ινίδια του γονοκόκκου ή της *Escherichia coli* που προκαλεί ουρολοιμώξεις. Οι παράγοντες που αυξάνουν τη λοιμογόνο δύναμη των μικροβίων μπορεί να μεταφέρονται με πλασμίδια, όπως το K88 αντιγόνο του ελύτρου της *E. coli* ή με φάγους, όπως η εξωτοξίνη του κορνοβακτηριδίου της διφθερίτιδας.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Busse HJ, Denner EB, Lubitz W.* Classification and identification of bacteria: current approaches to an old problem. Overview of methods used in bacterial systematics. *J Biotechnol* (1996) 47: 3-38.
- Grollman A.* The viruses. *Postgrad Med* (1996) 39: 128-130.
- Kolbert CP, Persing DH.* Ribosomal RNA sequencing as a tool for identification of bacterial pathogens. *Curr Opin Microbiol* (1999) 2: 299-305.
- Maslow JN, Mulligan ME, Arbeit RD.* Molecular epidemiology: application of contemporary techniques to the typing of microorganisms. *Clin Infect Dis* (1993) 17: 153-164.
- Schleifer KH, Kandler O.* Peptidoglycan types of bacterial cell wall and their taxonomic implications. *Bacteriol Rev* (1972) 36: 407-477.

2

ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΧΕΙΡΙΣΜΟΙ ΤΟΥ ΚΛΙΝΙΚΟΥ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ

Για την ταχεία διάγνωση και θεραπεία των λοιμώξεων απαιτείται η σωστή λήψη, μεταφορά και εργαστηριακός χειρισμός του κλινικού δείγματος. Αυτό προϋποθέτει την αρμονική επικοινωνία και συνεργασία μεταξύ της κλινικής και του εργαστηρίου και την κατάλληλη εκπαίδευση του ιατρικού και νοσηλευτικού προσωπικού.

Το εργαστήριο μπορεί να προσδιορίσει αξιόπιστα το παθογόνο αίτιο μιας λοίμωξης, μόνο αν το παθολογικό δείγμα έχει ληφθεί με τον κατάλληλο τρόπο. Έτσι, ένα δείγμα για καλλιέργεια θα πρέπει να συλλέγεται, αν είναι δυνατόν, κατά την οξεία φάση της λοίμωξης και πριν τη χορήγηση αντιβιοτικών. Ο ακριβής προσδιορισμός της θέσης και του σημείου λήψης του κλινικού δείγματος αυξάνει τις πιθανότητες απομόνωσης του παθογόνου αιτίου της νόσου ενώ συγχρόνως αποφεύγεται η ανάπτυξη της φυσιολογικής χλωρίδας ή άλλων μικροοργανισμών που μπορεί να αποικίσουν μία περιοχή. Πάντοτε, επίσης, το αποτέλεσμα της μικροβιολογικής εξέτασης πρέπει να αντιμετωπίζεται σε σχέση με την πιθανή κλινική διάγνωση. Η μη απομόνωση του αναμενόμενου παθογόνου μικροοργανισμού από μία ύποπτη εστία λοίμωξης μπορεί να οφείλεται είτε σε πραγματική απουσία του είτε σε κακή λήψη του δείγματος.

Εγκρίσεις που λαμβάνονται με αναρρόφηση ή από φλεγμένους περιοχές, συνήθως δεν παρουσιάζουν προβλήματα επιμόλυνσης κατά την διάρκεια της λήψης των δειγμάτων. Στα δείγματα από ιστούς μπορεί να αποτραπεί η ξήρανση, με την προσθήκη αποστειρωμένου φυσιολογικού ορού. Πιο σύνθετα προβλήματα όσον αφορά την ποιότητα και την ποσότητα του δείγματος, υπάρχουν στη συλλογή δειγμάτων από τραύματα ή αποστήματα. Από τέτοιες θέσεις είναι προτιμότερη η αναρρόφηση, αν υπάρ-

χει, πύου και κατά προτίμηση από κλειστές κλυδάζουσες βλάβες, παρά από ανοικτές, που είναι εκτεθειμένες σε επιμολύνσεις.

Η λήψη παθολογικών υλικών με βαμβακοφόρο στυλεό θα πρέπει να αποφεύγεται όταν υπάρχει εναλλακτικός τρόπος λήψης του δείγματος, γιατί πολλές φορές η ποσότητα είναι ανεπαρκής και το παθολογικό υλικό δεν μπορεί πάντα να εξαχθεί από το στυλεό. Αν δεν είναι δυνατή η λήψη μολυσματικού υγρού ή ιστικού τεμαχίου, χρησιμοποιείται ο βαμβακοφόρος στυλεός, υπό ορισμένες όμως προϋποθέσεις, για να αυξηθεί η πιθανότητα απομόνωσης του παθογόνου αιτίου. Κατ' αρχήν, η θέση της βλάβης πρέπει να καθαρίζεται, ώστε να απομακρύνονται κατά το δυνατόν οι επιφανειακοί μικροοργανισμοί της χλωρίδας ή αυτοί που έχουν προέλθει από τον αέρα ή τα χέρια του ασθενούς ή του προσωπικού και να παραμείνουν οι πραγματικά παθογόνοι που συνήθως βρίσκονται σε περισσότερο εν τω βάθει σημεία. Για τον καθαρισμό της βλάβης μπορεί να χρησιμοποιηθεί το υπεροξειδίο του υδρογόνου, που θανατώνει τα μικρόβια μόνο για όσο διάστημα παράγει φυσαλίδες, ενώ η ιωδιούχος ποβιντόνη απελευθερώνει ιώδιο σταδιακά και μπορεί να παραβιάσει και τους μικροοργανισμούς που βρίσκονται πάνω στον στυλεό. Η φλεγμαίνουσα περιοχή πρέπει επίσης να εξετάζεται προσεκτικά, για εκτίμηση της έκτασής της και πιθανή ύπαρξη διαφραγμάτων και εσωτερικών κοιλοτήτων, στις οποίες μπορεί να υπάρχουν μικροοργανισμοί πολύ διαφορετικοί από εκείνους που απομονώνονται από την επιφάνεια της βλάβης και να απαιτούν διαφορετική θεραπεία. Για τη λήψη δείγματος με στυλεό από τις κοιλότητες ενός αποστήματος, είναι χρήσιμοι οι ρινοφαρυγγικοί στυλεοί, που έχουν μικρή κεφαλή και είναι εύκαμπτοι. Το υλικό του δείγματος, ακόμη, πρέπει να είναι πρόσφατο. Για το λόγο αυτό θα πρέπει να αποκλείεται η λήψη από ασκούς ή παροχετεύσεις πύου, μέσα στους οποίους το παθολογικό δείγμα έχει παραμείνει για αρκετό διάστημα και πιθανόν έχουν αναπτυχθεί άλλοι μικροοργανισμοί, που πολλαπλασιάζονται ταχύτερα από τον παθογόνο. Για τον ίδιο λόγο, τα συστήματα συλλογής δείγματος με στυλεό, πρέπει να περιέχουν υλικά που προστατεύουν τους μικροοργανισμούς, χωρίς να επιτρέπουν το γρήγορο πολλαπλασιασμό κατά τη διάρκεια της μεταφοράς τους προς το εργαστήριο. Ιδιαίτερη σημασία έχει η λήψη με το στυλεό επαρκούς ποσότητας δείγματος, που μπορεί να επιτευχθεί με την εξωτερική πίεση της βλάβης ώστε να εξέλθει ποσότητα πύου ικανή να διαποτίσει το βαμβάκι του στυλεού. Επίσης συνιστάται η λήψη περισσότερων του ενός δειγμάτων.

Για την αξιολόγηση μιας φλεγμονώδους βλάβης πρέπει πάντα να

εκτελείται εκτός από την καλλιέργεια και Gram χρώση ενός επιχρίσματος του υλικού, με την οποία μπορούν να αναγνωρισθούν κάποια από τα κλασσικά παθογόνα μικροβιακά αίτια και να προσδιορισθεί η αναγκαιότητα χρήσης εκλεκτικών ή εμπλουτιστικών θρεπτικών υλικών καθώς και οι συνθήκες ή το χρονικό διάστημα επώασης. Για παράδειγμα, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ειδικά θρεπτικά υλικά και επώαση για μεγάλο χρονικό διάστημα αν παρατηρηθούν στη Gram χρώση μικρόβια, όπως οι ακτινομύκητες και οι νοκάρδιες. Η αναζήτηση μικροβίων που απαιτούν ειδικές καλλιέργειες (π.χ. για οξεάντοχα βακτηρίδια) προϋποθέτουν τη λήψη δύο ή και περισσότερων στυλεών. Αν έχει ληφθεί μόνο ένας στυλεός, προτιμάται η εκτέλεση της καλλιέργειας και όχι του παρασκευάσματος, γιατί αυτή παραμένει η μέθοδος με τη μεγαλύτερη ευαισθησία και διαγνωστική αξία. Τέλος, η παρακολούθηση της πορείας μιάς λοίμωξης, μπορεί να γίνει σε καθημερινή βάση με την εκτέλεση επιχρισμάτων κατά Gram ενώ καλλιέργειες μπορούν να επαναληφθούν 4 με 5 μέρες μετά από τις αρχικές, αν η φλεγμονή δεν έχει υποχωρήσει.

Για τη συλλογή δειγμάτων, όπως ούρων, πτυέλων ή κοπράνων, που δεν απαιτούν τη συμμετοχή νοσηλευτικού προσωπικού, είναι απαραίτητη η ενημέρωση του ασθενούς για τον σωστό τρόπο λήψης. Έτσι, για τη λήψη δείγματος ούρων πρέπει, αφού προηγηθεί καλή καθαριότητα της περιοχής, να απορρίπτονται τα πρώτα και να συλλέγονται τα ούρα από το μέσον της ούρησης, ώστε να αποφεύγεται η επιμόλυνση από τη χλωρίδα της ουρήθρας. Το ίδιο συνιστάται και για τη λήψη ούρων από καθετήρα, για να ελαχιστοποιηθεί η επιμόλυνση από μικρόβια που εισέρχονται από την ουρήθρα προς την κύστη κατά τον καθετηριασμό.

Ιδιαίτερα δύσκολη είναι η λήψη δείγματος πτυέλων, που μπορεί να απαιτήσει και αναπνευστική φυσιοθεραπεία ή εισπνοή αλατούχων διαλυμάτων, αν οι εκκρίσεις είναι παχύρρευστες ή ο ασθενής δεν μπορεί να τις αποβάλει. Η λήψη των πτυέλων είναι συχνά πιο επιτυχής το πρωί, λόγω της κατακράτησης των εκκρίσεων των πνευμόνων τη νύχτα. Ο ασθενής πρέπει να ξεπλένει το στόμα του, να κάνει γαργάρες με νερό και να επιδιώκει την απόχρεψη μετά από βαθύ βήχα. Όταν υπάρχει υποψία λοίμωξης του αναπνευστικού και τα πτύελα έχουν φυσιολογική όψη, δεν θα πρέπει να στέλνονται στο εργαστήριο, αλλά να επιχειρείται η λήψη ενός επόμενου δείγματος, με πιθανές παθολογικές προσμίξεις, όπως πύου ή αίματος.

Για τη συλλογή δείγματος κοπράνων, συνιστάται η χρησιμοποίηση τριών διαφορετικών φιαλιδίων. Το ένα φιαλίδιο περιέχει συντηρητικό για παράσιτα, το δεύτερο συντηρητικό για τα εντερικά παθογόνα μικρόβια,

ενώ το τρίτο είναι κενό και χρησιμεύει για την αδρή εξέταση των κοπράνων και οποιαδήποτε άλλη εξέταση χρειασθεί. Η αναλογία κοπράνων προς συντηρητικό πρέπει να είναι 1:3 και να γίνεται καλή ανάμιξη από τον ασθενή, ώστε να προστατεύονται τα μικρόβια και τα παράσιτα. Για τη διάγνωση παρασιτικών λοιμώξεων συνήθως απαιτούνται διαδοχικές λήψεις δειγμάτων, σε διαφορετικές όμως ημέρες, λόγω του κύκλου ζωής των παρασίτων. Γίνεται σύσταση ώστε ο ασθενής να αποφεύγει την πρόσμιξη ούρων στο δείγμα των κοπράνων. Δείγματα κοπράνων, τέλος, δεν θα πρέπει να συλλέγονται πριν την πάροδο 4 ημερών από τη λήψη βαριούχου διαλύματος.

Ιδιαίτερη σημασία για την απομόνωση του παθογόνου μικροοργανισμού και την αποφυγή επιμόλυνσης του δείγματος, έχει η σωστή προετοιμασία του ασθενούς ή της θέσης λήψης του υλικού. Έτσι, για τη σωστή εκτίμηση του αιτίου μιας πιθανής λοίμωξης ενός τραύματος ή εγκαύματος, πρέπει να απομακρυνθεί πρώτα η τυχόν υπάρχουσα εσχάρα και ύστερα να ληφθεί η καλλιέργεια. Η πιθανότητα, επίσης, απομόνωσης του αιτίου της λοίμωξης του τραχήλου της μήτρας, αυξάνει εάν πριν τη λήψη του τραχηλικού δείγματος απομακρυνθεί η τραχηλική βλέννη, ενώ για τα ουρηθρικά δείγματα ο ασθενής πρέπει να μην έχει ουρήσει για 1 ώρα και χρησιμοποιείται στυλεός με dacron, που εισάγεται στην ουρήθρα σε βάθος 2-4 cm για 2-3 δευτερόλεπτα. Η λήψη δείγματος για αιμοκαλλιέργεια απαιτεί καλό καθαρισμό του δέρματος, αρχικά με αλκοόλη, έπειτα με ιώδιο και τέλος πάλι με αλκοόλη. Αντίστοιχοι χειρισμοί απαιτούνται για τη λήψη δειγμάτων εγκεφαλονωτιαίου υγρού όπου απαιτείται η άμεση μεταφορά του δείγματος στο εργαστήριο για γενική εξέταση και καλλιέργεια. Για να ληφθούν, τέλος, ξέσματα από μυκητιασικές βλάβες, η περιοχή καθαρίζεται με αλκοόλη 70% και έπειτα με ξέστρο παίρνεται το δείγμα από την περιφέρεια της βλάβης.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Gray LD, Fedorko DP.* Laboratory diagnosis of bacterial meningitis. *Clin Microbiol Rev* (1992) 5: 130-145.
- Miller JM.* A Guide to Specimen Management in Clinical Microbiology. 2nd edition. ASM Press (1999) Washington, D.C.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards.* Approved Standard M28-A. Procedures for the Recovery and Identification of Parasites from the Intestinal Tract. NCCLS, (1997) Villanova, Pa.
- Riley JA, Weinstein MP.* Laboratory diagnosis of bacteremia and endocarditis. *Infect Dis Newsl* (1991) 10: 4-6.

3

Η ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΩΝ ΛΟΙΜΩΞΕΩΝ ΚΑΙ Η ΣΥΜΒΟΛΗ ΤΟΥ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟΥ

Εισαγωγή

Οι λοιμώξεις αποτελούν μια συνήθη αλλά και συχνά σοβαρή κλινική οντότητα. Η διάγνωσή τους βασίζεται σε κλινικά κριτήρια που συνδυάζονται με τις πληροφορίες που προέρχονται από τον εργαστηριακό έλεγχο. Η εμφάνιση της λοίμωξης μπορεί να γίνει με διάφορους τρόπους. Η συμπτωματολογία και τα κλινικά σημεία αποτελούν τον οδηγό για την εργαστηριακή διερεύνηση της λοίμωξης. Συχνά όμως η λοίμωξη, ιδιαίτερα στα αρχικά στάδια, εμφανίζεται με μη ειδικά ευρήματα καθιστώντας δύσκολη τόσο την αναγνώριση των σοβαρών λοιμώξεων όσο και την εργαστηριακή τους προσέγγιση. Η εργαστηριακή διερεύνηση μπορεί να προσθέσει σημαντικά στοιχεία που βοηθούν στον εντοπισμό και τη σοβαρότητα της λοίμωξης καθώς και στη θεραπευτική της αντιμετώπιση. Διαφορετικό είναι το φάσμα των εργαστηριακών εξετάσεων που συνήθως ζητούνται σε λοιμώξεις που αφορούν εξωνοσοκομειακούς και νοσοκομειακούς ασθενείς. Στις εξωνοσοκομειακές λοιμώξεις η καλλιέργεια ούρων αποτελεί τη συχνότερη εξέταση που ζητείται από το μικροβιολογικό εργαστήριο, ενώ ακολουθούν σε σειρά συχνότητας, η καλλιέργεια κολπικού ή τραχηλικού εκκρίματος, η καλλιέργεια τραύματος ή αποστήματος, η κοπροκαλλιέργεια και η καλλιέργεια φαρυγγικού εκκρίματος. Οι αιματοκαλλιέργειες σπάνια ζητούνται σε εξωνοσοκομειακές λοιμώξεις σε αντίθεση με ότι συμβαίνει σε λοιμώξεις που αφορούν ασθενείς που νοσηλεύονται. Εκτός από τις κλασικές μικροβιολογικές εξετάσεις, σε πολλές περιπτώσεις σημαντική είναι και η συμβολή βασικών εργαστηριακών εξετάσεων όπως της γενικής εξέτασης αίματος καθώς επίσης και της ταχύτητας καθίζησης των ερυθρών.

Η συχνότητα όμως με την οποία χρησιμοποιούνται οι διάφορες μικροβιολογικές εξετάσεις δεν συμβαδίζουν με τη συχνότητα εμφάνισης της αντίστοιχης λοίμωξης. Η απόφαση της εργαστηριακής διερεύνησης της λοίμωξης βασίζεται στα κλινικά της χαρακτηριστικά και τη σοβαρότητα με την οποία παρουσιάζεται καθώς επίσης και στην συμβολή που μπορεί να έχουν τα εργαστηριακά αποτελέσματα στην επιλογή της κατάλληλης θεραπείας. Η δυσκολία επίσης στη λήψη ή τη μεταφορά του κλινικού δείγματος στο εργαστήριο αποτελούν παράγοντες ανασταλτικούς της εργαστηριακής διερεύνησης της λοίμωξης. Το αποτέλεσμα είναι σε συχνές λοιμώξεις, όπως είναι αυτές του ανώτερου αναπνευστικού, σπάνια να ζητούνται καλλιέργειες φαρυγγικού ή ρινικού εκκρίματος, ενώ σε άλλες λιγότερο συχνές, όπως είναι οι ουρολοιμώξεις, η μικροβιολογική διερεύνηση ζητείται στη πλειονότητα των περιπτώσεων.

Οι ιογενείς λοιμώξεις αν και απαντούν πολύ συχνά, ιδιαίτερα σε εξωνοσοκομειακούς ασθενείς, σε ελάχιστες μόνο περιπτώσεις η διάγνωση τους επιβεβαιώνεται με εργαστηριακό έλεγχο. Πολλά εργαστήρια δεν έχουν τον κατάλληλο εξοπλισμό για τη διάγνωση ιογενών λοιμώξεων, αλλά και όταν υπάρχει, η διάγνωση τους απαιτεί μεγάλο χρονικό διάστημα. Το γεγονός επίσης ότι οι περισσότερες ιογενείς λοιμώξεις αυτοπεριορίζονται σε συνδυασμό με την απουσία αποτελεσματικής αιτιολογικής θεραπείας, μειώνει την σημασία της εργαστηριακής διερεύνησης. Τα τελευταία όμως χρόνια η εξέλιξη στην αντιϊκή θεραπεία πολλών ιογενών λοιμώξεων απαιτεί και την έγκαιρη εργαστηριακή τους διάγνωση. Η δυνατότητα αναζήτησης των ιικών αντιγόνων με τη χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων καθώς και του DNA του ιού με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης επιτρέπουν σήμερα την ταχεία και ειδική διάγνωση των ιογενών λοιμώξεων.

Η χρησιμότητα των μικροβιολογικών εξετάσεων

Η χρησιμότητα του εργαστηριακού ελέγχου στη διάγνωση των λοιμώξεων εξαρτάται από διάφορους παράγοντες. Το αποτέλεσμα της εξέτασης θα πρέπει να συνεισφέρει στην τελική διάγνωση και την αποτελεσματικότερη θεραπεία της συγκεκριμένης λοίμωξης. Η επίπτωση επίσης που μπορεί να υπάρχει στον ασθενή από πιθανό ψευδώς θετικό ή ψευδώς αρνητικό αποτέλεσμα αξιολογείται στην χρησιμότητα των μικροβιολογικών εξετάσεων. Η διάγνωση αρκετών λοιμώξεων δεν βασίζεται σε καλλιέργειες παθολογικού δείγματος, αλλά σε άλλες εργαστηριακές εξετάσεις με μικρότερη ευαισθησία και σημαντικό αριθμό ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων. Επίσης, η ειδικότητα των εξετάσεων αυτών μπορεί να είναι χαμη-

λή, με αποτέλεσμα σημαντικό αριθμό ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων. Η θετική και αρνητική προγνωστική αξία της κάθε εργαστηριακής εξέτασης αξιολογούνται επίσης στη χρησιμότητα της συγκεκριμένης δοκιμασίας για τη διάγνωση της λοίμωξης. Η θετική προγνωστική αξία της κάθε δοκιμασίας σχετίζεται με τη συχνότητα της νόσου στον πληθυσμό. Στις περιπτώσεις που αφορούν ασυνήθεις λοιμώξεις, ένα μεγάλο ποσοστό θετικών αποτελεσμάτων θα είναι ψευδώς θετικό. Κλασικό παράδειγμα αποτελεί η διάγνωση της λοίμωξης από *Chlamydia trachomatis* με την ανίχνευση του αντιγόνου του μικροβίου. Δεδομένου ότι η συχνότητα της λοίμωξης στις ασυμπτωματικές γυναίκες είναι μικρότερη από 5%, δοκιμασίες με ευαισθησία και ειδικότητα 95%, θα έχουν θετική προγνωστική αξία μικρότερη από 50%. Έτσι, μια θετική δοκιμασία ανίχνευσης αντιγόνου *C. trachomatis* μπορεί να αποτελεί απλά ένα ψευδώς θετικό αποτέλεσμα και θα πρέπει να επιβεβαιώνεται με καλλιέργεια. Αντίθετα, ένα αρνητικό αποτέλεσμα έχει πολύ μεγαλύτερες πιθανότητες να ανταποκρίνεται στη πραγματικότητα, δεδομένου ότι η αρνητική προγνωστική αξία της δοκιμασίας θα είναι 99.7%. Οι ανοσολογικές εξετάσεις για τη διάγνωση της HIV λοίμωξης παρουσιάζουν επίσης τις ίδιες δυσκολίες όταν γίνονται σε πληθυσμούς με χαμηλή επίπτωση της νόσου. Στις περιπτώσεις αυτές οι πιθανότητες ψευδώς θετικού αποτελέσματος είναι μεγαλύτερες από τις πιθανότητες πραγματικά θετικού αποτελέσματος. Για τους λόγους αυτούς η επιλογή της εργαστηριακής διαγνωστικής δοκιμασίας θα πρέπει να γίνεται με ιδιαίτερη προσοχή και σε σχέση πάντοτε με τον επιπολασμό της λοίμωξης. Επίσης θα πρέπει να αποσαφηνίζεται κάθε θετική διαγνωστική δοκιμασία με την εκτέλεση δοκιμασιών που επιβεβαιώνουν τη διάγνωση. Στις μικροβιακές λοιμώξεις και τις ιογενείς που η καλλιέργεια είναι εφικτή, η δοκιμασία αναφοράς για κάθε καινούργια διαγνωστική εξέταση παραμένει η καλλιέργεια του κλινικού δείγματος. Οι καλλιέργειες εμφανίζουν την μεγαλύτερη ειδικότητα, αλλά η ευαισθησία τους εξαρτάται από διάφορους παράγοντες, που μπορούν να αναστείλουν την ανάπτυξη του μικροοργανισμού από το κλινικό δείγμα. Νεότερες διαγνωστικές δοκιμασίες εμφανίζουν μεγαλύτερη ευαισθησία από τις παραπάνω μεθόδους, ιδιαίτερα στη διάγνωση των ιογενών λοιμώξεων.

Οι μικροβιολογικές εξετάσεις που γίνονται για τη διερεύνηση της λοίμωξης μπορούν να διαχωριστούν ανάλογα με την αναγκαιότητά τους, σε αυτές που είναι απαραίτητες, σε αυτές που συνιστάται η εκτέλεσή τους και τέλος σε αυτές που η εκτέλεσή τους είναι προαιρετική. Για παράδειγμα, η ουροκαλλιέργεια είναι απαραίτητη για τη διάγνωση της ουρολοίμωξης σε

παιδιά, εγκύους γυναίκες και άνδρες, ενώ η εκτέλεση της συνιστάται χωρίς όμως να είναι απόλυτα απαραίτητη, στη διάγνωση της λοίμωξης στις νεαρές γυναίκες.

Η σχέση εργαστηρίου και κλινικού γιατρού

Η τεχνολογική εξέλιξη στην εργαστηριακή διαγνωστική δίνει τη δυνατότητα για καλύτερη ποιότητα των παρεχόμενων υπηρεσιών υγείας. Απαραίτητη προϋπόθεση αποτελεί η κατανόηση του ρόλου και των υπηρεσιών που πρέπει να παρέχει το κλινικό εργαστήριο. Οι βασικές αρχές που διασφαλίζουν την σωστή λειτουργία του εργαστηρίου αλλά και οι υποχρεώσεις της κλινικής προς το εργαστήριο φαίνονται στους Πίνακες 1 και 2.

Πίνακας 1. Προϋποθέσεις σωστής λειτουργίας του εργαστηρίου

-
- Επαρκής σχεδιασμός παραπεμπτικών εξετάσεων
 - Ασφαλής μέθοδος μεταφοράς δειγμάτων
 - Ασφαλής μέθοδος αιμοληψιών.
 - Πρωτόκολλο που περιγράφει τα δείγματα που χρειάζονται για κάθε εξέταση, τις κλινικές ενδείξεις για την εκτέλεσή τους και οδηγό για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων. Μπορεί επίσης να αναφέρεται η ευαισθησία και η ειδικότητα των μη-καλλιεργητικών μεθόδων που χρησιμοποιούνται στη διάγνωση των λοιμώξεων.
 - Οδηγός που περιγράφει τις νέες εξετάσεις και τη σωστή χρησιμοποίησή τους από την κλινική καθώς και μεταβολές που έχουν σχέση με τις υπάρχουσες εξετάσεις. Η συχνότητα των λοιμώξεων στο νοσοκομείο και οι φαινότυποι αντιμικροβιακής αντοχής θα πρέπει επίσης να περιλαμβάνονται στον οδηγό που διανέμεται στις κλινικές.
 - Υπηρεσία συλλογής των δειγμάτων από τις κλινικές.
 - Πλήρες και κατανοητό σύστημα καταγραφής των αποτελεσμάτων και διασφάλιση ταχείας επικοινωνίας για τα επείγοντα αποτελέσματα.
 - Τηλεφωνική επικοινωνία εργαστηριακού και κλινικού γιατρού για τη διασφάλιση σωστής λήψης των δειγμάτων και ερμηνείας των αποτελεσμάτων καθώς και για την ερμηνεία του αντιβιογράμματος στην χορήγηση της αντιμικροβιακής θεραπείας.
-

Οι κλινικές πληροφορίες μπορούν να βοηθήσουν σημαντικά στην εργαστηριακή διερεύνηση της λοίμωξης. Ιδιαίτερα χρήσιμες είναι όταν γίνονται μικροβιολογικές εξετάσεις σε ασθενείς με πυρετό αγνώστου αι-

Πίνακας 2. Υποχρεώσεις της κλινικής προς το εργαστήριο

-
- Σωστή συμπλήρωση των παραπεμπτικών ώστε να περιλαμβάνονται όλες οι απαραίτητες κλινικές πληροφορίες.
 - Σωστή μεταφορά των δειγμάτων και αναγραφή των στοιχείων του ασθενούς.
 - Σωστή λήψη των δειγμάτων και αποστολή τους μαζί με τα αντίστοιχα παραπεμπτικά.
 - Γνώση από τον κλινικό γιατρό της χρησιμότητας της εργαστηριακής εξέτασης.
 - Αναγραφή στο παραπεμπτικό του υπεύθυνου κλινικού γιατρού που θα συζητήσει τα εργαστηριακά αποτελέσματα με τον εργαστηριακό γιατρό.
 - Συζήτηση του κλινικού με τον εργαστηριακό γιατρό στη διερεύνηση της λοίμωξης και την ορθή χρήση των αντιβιοτικών σε ασυνήθη κλινικά περιστατικά ή σε λοιμώξεις από πολυανθεκτικά μικρόβια.
-

τιολογίας. Στις περιπτώσεις αυτές σημαντική είναι η πληροφορία αν ο ασθενής έχει επισκεφθεί χώρες που ενδημούν συγκεκριμένα λοιμώδη νοσήματα. Επίσης ο κλινικός γιατρός θα πρέπει να ενημερώνει για περιπτώσεις που αφορούν ασθενείς με επαναλαμβανόμενες ή εμμένουσες λοιμώξεις. Η επικοινωνία εργαστηρίου και κλινικής είναι επίσης επιβεβλημένη ώστε να εξασφαλίζεται η σωστή λήψη και αποστολή των δειγμάτων. Παράδειγμα αποτελεί η μικροβιολογική διερεύνηση του κοκκύτη ή οι καλλιέργειες που απαιτούν ειδικά υλικά μεταφοράς, όπως στην αναζήτηση του κορυνοβακτηριδίου της διφθερίτιδας ή διαφόρων ιών. Η λήψη επίσης υλικού από δερματικές βλάβες για απομόνωση μυκήτων ή η χρησιμότητα των επαναλαμβανόμενων κοπρανοκαλλιεργειών σε χειριστές τροφίμων αποτελούν θέματα προς συζήτηση μεταξύ κλινικών και εργαστηριακών γιατρών.

Η συνεργασία του εργαστηριακού γιατρού με την κλινική είναι επίσης σημαντική στην ενημέρωση των κλινικών γιατρών για τους φαινότυπους αντοχής και του μηχανισμού αντοχής των μικροβίων που απομονώνονται από λοιμώξεις στο συγκεκριμένο νοσοκομειακό περιβάλλον. Αυτό θα βοηθήσει αποτελεσματικά ώστε να περιορισθεί πιθανή εξάπλωση μικροβίων ανθεκτικών στα αντιβιοτικά στο νοσοκομειακό περιβάλλον αλλά και στην κοινότητα. Τέλος, σημαντική είναι η συνεισφορά του εργαστηρίου στον έλεγχο των λοιμώξεων. Πρακτικές οδηγίες που σχετίζονται με την απολύμανση, την αποστείρωση, την χημειοπροφύλαξη και την πολιτική ατυχημάτων από μολυσμένα υλικά στο νοσοκομειακό χώρο θα πρέπει να είναι στην υπευθυνότητα του κλινικού εργαστηρίου.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Cooke R, Hodgson E. General practitioners and health and safety at work. *BMJ* (1992) 305: 1044.

Owen P. Clinical practice and medical research: bridging the divide between the two cultures. *Brit J Gen Pract* (1995) 45: 557-560.

Tompkins DS, Shannon AM. Clinical value of microbiological investigations in general practice. *Brit J Gen Pract* (1993) 43: 155-158.