



ΑΛΙΚΗ ΒΟΓΙΑΤΖΗ
ΣΥΝΤΟΝΙΣΤΡΙΑ Δ/ΝΤΡΙΑ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
«ΓΕΝΙΚΟ ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ ΠΑΙΔΩΝ ΠΕΝΤΕΛΗΣ»

ΣΥΓΧΡΟΝΗ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ
ΛΟΙΜΩΞΕΩΝ
ΚΑΤΩΤΕΡΟΥ ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΟΥ

Εργαστηριακή Διαγνωστική Προσέγγιση Λοιμώξεων ΚΑ



- Κατάταξη λοιμώξεων αναπνευστικού
 - ✓ Κλινικές ενδείξεις καλλιέργειών
- Κατάλληλα κλινικά υλικά για καλλιέργεια
 - ✓ Βασικές αρχές σωστής συλλογής και μεταφοράς δειγμάτων
- Μεθοδολογία καλλιέργειών και αξιολόγηση των αποτελεσμάτων
- Αλγόριθμοι μικροβιολογικής διαγνωστικής προσπέλασης

Λοιμώξεις αναπνευστικού



- **Ανώτερου αναπνευστικού**
- **Κατώτερου αναπνευστικού**
 - **Οξεία βρογχίτιδα**
 - **Χρόνια βρογχίτιδα**
 - **Παρόξυνση χρόνιας βρογχίτιδας (COPD)**
 - **Πνευμονία**

Σημασία φυσιολογικής χλωρίδας ανώτερου αναπνευστικού



- Η φυσιολογική χλωρίδα του αναπνευστικού συστήματος: πρασινίζοντες στρεπτόκοκκοι, β-αιμολυτικοί στρεπτόκοκκοι, *S.aureus*, *H. influenzae*, *S.pneumoniae*, *M.catarrhalis*, αναερόβια βακτήρια, *Fusobacterium spp.* *Actinomyces israelii*, *C. albicans*, αδενοϊοί και ιοί του απλού έρπητα.
- **Νοσηλευόμενοι ασθενείς** :η φυσιολογική χλωρίδα, αποτελείται από Gram(+) βακτήρια (κυρίως στρεπτόκοκκοι) και αντικαθίσταται σε μεγάλο βαθμό από Gram(-) βακτήρια(εντεροβακτηριακά και *Pseudomonas spp.*)

Η παρουσία τους στα δείγματα και η επακόλουθη ανάπτυξη στις καλλιέργειες καθιστά επιτακτική την σωστή αξιολόγηση των αποτελεσμάτων

Λοιμώξεις κατώτερου αναπνευστικού



● Οξεία βρογχίτιδα

- Φλεγμονή βρογχικού δένδρου μετά από λοίμωξη ανωτέρου αναπνευστικού
- Συχνότερα προκαλείται από ιογενή αίτια
- Στη διάγνωση δεν αξιολογούνται οι καλλιέργειες
- Καλλιέργεια δύσκολη και χρονοβόρα
- Δεν βοηθά στη ταχεία διάγνωση
- Σημασία έχει η εφαρμογή μοριακών τεχνικών
- Εξαίρεση η βρογχίτιδα του κοκκύτη

Οξεία βρογχίτιδα

Αιτιολογικοί παράγοντες



	Παιδιά	Ενήλικες
Συχνότερα	<ul style="list-style-type: none">-RSV-Adenovirus-Rhinovirus-Parainfluenza virusEnterovirus-Influenza A/B	<ul style="list-style-type: none">-Influenza A/B-Adenovirus-Rhinovirus-Parainfluenza virus-RSV-Enterovirus
Σπανιότερα	<ul style="list-style-type: none">-Streptococcus pneumoniae-Haemophilus influenzae-Chlamydophila pneumoniae-Mycoplasma pneumoniae-Bordetella pertussis	<ul style="list-style-type: none">-Streptococcus pneumoniae-Haemophilus influenzae-Mycoplasma pneumoniae-Chlamydophila pneumoniae-Bordetella pertussis

Χρόνια βρογχίτιδα και παρόξυνση (COPD)



- Παραγωγικός βήχας > 3 μήνες για 2 συνεχή χρόνια
- Πάσχει το 25% ενηλίκων (καπνιστές)
- Παρόξυνση
 - Δύσπνοια, ταχύπνοια, δυσφορία, αλλαγή στη ποιότητα, ποσότητα ή σύσταση πτυέλων, ακροαστικά ευρήματα
 - Παρατηρείται σε έδαφος ΧΑΠ και Κ.Ι.

ΧΑΠ- ΠΑΘΟΓΟΝΟΙ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ

Συχνότητα (%)	Παθογόνος μικροοργανισμός
Ιοί (30-50%)	<i>Influenzae A και B</i> <i>Parainflueza 1, 2 και 3</i> <i>Rhinovirus</i> <i>Coronavirus</i> <i>Adenovirus</i> <i>Respiratory syncytial virus (RSV)</i>
Άτυπα (ενδοκυττάρια) παθογόνα (5-10%)	<i>Chlamydophila pneumoniae</i> <i>Mycoplasma pneumoniae</i>
Βακτήρια (40-50%)	<i>H.influenzae</i> <i>S.pneumoniae</i> <i>M.Catarrhalis</i> <i>H.parainfluenzae</i> <i>P.aeruginosa</i> <i>Εντεροβακτηριακά (E.coli, K.pneumoniae)</i>

80%

ΧΑΠ- ΜΗ ΛΟΙΜΩΔΕΙΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ

Μη λοιμώδεις
παράγοντες

Μη συμμόρφωση του ασθενούς
στη θεραπευτική αγωγή

Περιβαλλοντικοί παράγοντες:

- ✓ Τοξικά εισπνεόμενα σωματίδια
- ✓ Διοξείδιο του θείου
- ✓ Διοξείδιο του αζώτου

20%

ΧΑΠ

ΟΜΑΔΑ	ΣΟΒΑΡΟΤΗΤΑ ΠΑΡΟΞΥΝΣΗΣ	ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ
Α. Ασθενείς που δεν χρειάζονται εισαγωγή στο νοσοκομείο Στάδιο I: ήπια ΧΑΠ	Ηπια παρόξυνση	<i>H.influenzae</i> <i>S.pneumoniae</i> <i>M.catarrhalis</i> <i>C.pneumoniae</i> <i>Ιοί</i>
Β. Ασθενείς που εισάγονται στο νοσοκομείο στάδιο II-IV: μέτρια-σοβαρή ΧΑΠ	Μέτρια-σοβαρή παρόξυνση Χωρίς παράγοντες κινδύνου για λοίμωξη από ψευδομονάδα	Ό,τι στην ομάδα Α <u>Και:</u> Εντεροβακτηριακά (<i>K.pneumoniae</i>, <i>E.coli</i>, <i>Proteus sp</i>, <i>Enterobacter sp.</i>, κλπ
Γ. Ασθενείς που εισάγονται στο νοσοκομείο στάδιο II-IV: μέτρια-σοβαρή ΧΑΠ	Μέτρια-σοβαρή παρόξυνση με παράγοντες κινδύνου για λοίμωξη από ψευδομονάδα	Ό,τι στην ομάδα Β <u>Και:</u> <i>P.aeruginosa</i>

Μικροβιολογική διερεύνηση παροξύνσεων ΧΑΠ



- Ο ρόλος της καλλιέργειας πτυέλων περιορίζεται λόγω του χρόνιου αποικισμού των αεραγωγών με συνήθη παθογόνα
- Καλλιέργειες πτυέλων ζητούνται σε :
 - Σε συχνές παροξύνσεις
 - Χρόνια αποβολή πυωδών πτυέλων
 - Μη ανταπόκριση στη θεραπεία

Λοιμώξεις κατώτερου αναπνευστικού



- **Οξεία βρογχίτιδα**
- **Χρόνια βρογχίτιδα**
- **Παρόξυνση χρόνιας βρογχίτιδας**
- **Πνευμονία :**
 - Φλεγμονή πνευμονικού παρεγχύματος από βακτήρια, ιούς, μύκητες**

Μηχανισμοί εγκατάστασης πνευμονίας



- **Εισρόφηση**
 - ✓ **Εξωγενή βακτήρια**
 - ✓ **Ενδογενή βακτήρια (στομάχι, στοματοφάρυγγας)**
- **Εισπνοή-Καταστροφή κροσσών**
- **Αιματογενής διασπορά**

Παράγοντες εγκατάστασης πνευμονίας



- **Αποικισμός στοματοφάρυγγα**
- **Αποικισμός στομάχου**
- **Λοιμογόνος δύναμη βακτηρίων**
- **Διαταραχή αμυντικών μηχανισμών πνεύμονα**

Συχνότητα αποικισμού



- Φυσιολογικά άτομα <10%
- Μέτριας βαρύτητας ασθενείς (σε 48h) 30-40%
- Σοβαρής βαρύτητας ή χρόνια πάσχοντες ασθενείς 70-75%

Οξεία λοίμωξη πνευμονικού παρεγχύματος



- Συμπτωματολογία (>2 συμπτώματα):
- Πυρετός ή υποθερμία
 - Ρίγος/Δύσπνοια/Εφιδρώσεις/Κεφαλαλγία
 - Πρωτοεμφανιζόμενος βήχας (παραγωγικός ή μη)
 - Αλλαγή στη ποιότητα, ποσότητα ή σύσταση πτυέλων σε ασθενή με προϋπάρχοντα χρόνια βήχα
 - Πλευριτικού τύπου άλγος
 - Μη ειδικά: κακουχία, μυαλγίες, ανορεξία,

CAP-Κλινικά ευρήματα



- **Αμβλύτητα-μείωση αναπνευστικού ψιθυρίσματος**
- **Τρίζοντες, ρεγχάζοντες, αιγοφωνία**
- **Ταχύπνοια(>25 αναπνοές/ min)**
- **Ταχυκαρδία(>100 σφίξεις/ min)**

CAP-Εργαστηριακά ευρήματα



- **Λευκοκυττάρωση ($>10.400/ml$)**
- **Λευκοπενία $<4000/ml$**
- **CRP $>50 mg/dL$**
- **Ουρία $>20 mg/dL$**
- **Υποξυγοναιμία $PO_2 >50 mmHg$**
- **Ακτινολογική πύκνωση >1 λοβό**

Είδη πνευμονίας



- **Πνευμονία της κοινότητας (CAP)**
 - ασθενείς που νοσηλεύονται στο σπίτι
 - ασθενείς που εισάγονται στο νοσοκομείο
 - ασθενείς που εισάγονται στη ΜΕΘ
- **Νοσοκομειακή Πνευμονία (HAP)**
 - εκδηλώνεται ≥ 48 ώρες μετά την εισαγωγή στο νοσοκομείο
- **Πνευμονία του Αναπνευστήρα (VAP)**
 - σε ασθενή που παραμένει διασωληνωμένος και σε μηχανικό αερισμό για $\geq 48-72$ ώρες

Αιτιοπαθογόνοι μικροοργανισμοί CAP



	Παθογόνος μικροοργανισμός
Βακτήρια	<i>Streptococcus pneumoniae</i> (~40%)
	<i>Haemophilus influenzae</i>
	<i>Moraxella catarrhalis</i>
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	Εντεροβακτηριακά - <i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i>
	<i>Staphylococcus aureus</i> (HA-MRSA, CA-MRSA)
Άτυπα παθογόνα	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>
	<i>Chlamydophila pneumoniae</i>
	<i>Legionella sp.</i>
Ιοί	<i>Influenzae A and B</i>
	<i>Respiratory syncytial virus (RSV)</i>

Αίτια πνευμονίας ανά ηλικία

- **0-1 μήνες:** *E.coli*, *GBS*
- **1-6 μήνες:** *C. trachomatis*, *S. aureus*, *RSV*
- **6 μήνες–5 έτη:** *RSV*, *Parainfluenzae virus*
- **5-15 έτη:** *M. pneumoniae*, ιοί γρίπης
- **16-30 έτη:** *M. pneumoniae*, *S.pneumoniae*
- **Ηλικιωμένοι:** *S. pneumoniae*, *H.influenzae*

Συχνότερα αίτια πνευμονίας της κοινότητας

Είδος Ασθενών

Ασθενείς που νοσηλεύονται στο σπίτι

Ασθενείς που νοσηλεύονται στο νοσοκομείο (εκτός ΜΕΘ)

Ασθενείς που νοσηλεύονται στη ΜΕΘ

Αίτιολογία

Streptococcus pneumoniae
Mycoplasma pneumoniae
Haemophilus influenzae
Chlamydophila pneumoniae
Αναπνευστικοί ιοί

Streptococcus pneumoniae
Mycoplasma pneumoniae
Chlamydophila pneumoniae
Haemophilus influenzae
Legionella species
Εισρόφηση
Αναπνευστικοί ιοί

Streptococcus pneumoniae
Staphylococcus aureus
Legionella species
Gram-αρνητικά βακτηρίδια
Haemophilus influenzae

CAP-Διάγνωση



- **Gold standard: καλλιέργεια**
- **Εναλλακτικά-συνδυασμός στοιχείων:**
 - Κλινικών(συμπτώματα, ευρήματα)
 - Ακτινολογικών
 - Εργαστηριακών(μικροβιολογικών)
 - Επιδημιολογικών
- **Η αξονική τομογραφία ενδείκνυται σε:**
 - Υποτροπιάζουσα πνευμονία
 - Μη ανταπόκριση στη θεραπεία
 - Ανοσοκατασταλμένοι (Aspergillus)

Ενδείξεις Μικροβιολογικής διερεύνησης εκτός νοσοκομείου- CAP

● Η εξέταση καλλιέργειας πτυέλων ενδείκνυται:

- ✓ σε ασθενείς χωρίς ανταπόκριση στην εμπειρική αγωγή
- ✓ σε ασθενείς με υποψία για *M.tuberculosis*

● Η Ορολογική διερεύνηση γίνεται :

- ✓ Σε επιδημίες από *M.pneumoniae*

Πνευμονία μετά έκθεση σε διάφορα είδη νοσηλείας ή θεραπείας-HCAP

- ✓ **Νοσηλεία κατά το τελευταίο τρίμηνο με διάρκεια >2 ημέρες**
- ✓ **Διαμονή σε γηροκομεία ή ψυχιατρεία**
- ✓ **Αιμοκάθαρση / Έναρξη από μηνός**
- ✓ **Ενδοφλέβια κατ' οίκον θεραπεία**
- ✓ **Ασθενείς με ΧΑΠ 4^ο σταδίου (FEV₁<30%, βρογχεκτασίες, Κ.Ι.)**
- ✓ **Ανοσοκατασταλμένοι αιματολογικά νοσήματα, μεταμοσχεύσεις**

Πίνακας 2. CURB-65 index. Εκτίμηση της βαρύτητας της πνευμονίας.

Εκτίμηση Βαρύτητας - Στο Ιατρείο

ΒΑΣΙΚΟΙ ΠΡΟΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ

- Ηλικία >65 ετών
- Πρόσφατη διαταραχή επιπέδου συνείδησης (<8 στη κλίμακα Γλασκώβης)
- Αριθμός αναπνοών ≥ 30 /min
- ΣΑΠ <90 mmHg, ΔΑΠ <60 mmHg

0

Θνητότητα 1,2%

Πιθανή κατ'οίκον νοσηλεία

1 ή 2

Θνητότητα 8,15%

Παραπομπή και εκτίμηση σε νοσοκομείο

3 ή 4

Θνητότητα 31%

Επείγουσα εισαγωγή στο νοσοκομείο

Πίνακας 2. CURB-65 index. Εκτίμηση της βαρύτητας της πνευμονίας.

Εκτίμηση Βαρύτητας - Στο ΤΕΠ

ΒΑΣΙΚΟΙ ΠΡΟΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ

- Ηλικία ≥ 65 ετών
- Πρόσφατη διαταραχή επιπέδου συνείδησης (≤ 8 στη κλίμακα Γλασκώβης)
- Ουρία > 40 mg/dl
- Αριθμός αναπνοών ≥ 30 /min
- ΣΑΠ < 90 mmHg, ΔΑΠ < 60 mmHg



Προσοχή: Η κλίμακα CURB-65 μεμονωτεί στην εκτίμηση ηλικιωμένων ασθενών με υποκείμενα νοσήματα.

CAΡ απαιτούσα εισαγωγή στον νοσοκομείο (<20%, 2-30% θνησιμότητα)

- *S. pneumoniae* (9-55%)
- *C. pneumoniae* (4-43%)
- *M. pneumoniae* (2-32%)
- *H. influenzae* (4-12%)
- Gram(-) βακτήρια (0,5-7%)
- *Legionella spp* (1,2-6%)
- *S. aureus* (1-4%)

CAΡ απαιτούσα εισαγωγή στη ΜΕΘ (<50% θνησιμότητα)

- Άγνωστα (18-52%)
- *S. Pneumoniae* (11-37%)
- Gram(-) βακτήρια (3-25%)
- *Legionella spp* (3-23%)
- *S.aureus* (4-18%)

CAP-Μικροβιολογική διερεύνηση εντός νοσοκομείου



- Γενική αίματος– τύπος λευκοκυττάρων
- Βιοχημικός έλεγχος– σάκχαρο, ουρία, ηλεκτρολύτες
- Ορολογικός έλεγχος(HIV) –σύμφωνη γνώμη αρρώστου
- Αέρια αίματος
- Μικροσκοπική κατά Gram + καλλιέργεια πτυέλων
- Καλλιέργεια αίματος (> 2 ζεύγη)
- Αντιγόνο *S.pneumoniae* και *Legionella* στα ούρα

Πνευμονία από εισρόφιση

Αίτια εγκατάστασης



- Κατάργηση φαρυγγο-λαρυγγικού φραγμού
- Μεταβολή επιπέδου συνείδησης
- Ανώμαλη κατάποση
- Καταστολή αντανακλαστικού του βήχα
- Καθυστέρηση κένωσης γαστρικού περιεχομένου
- Μειωμένη κινητικότητα γαστρεντερικού σωλήνα

Συχνότητα νοσοκομειακής πνευμονίας (ΗΠΑ)



- **15-25% του συνόλου των (250.000) νοσοκομειακών λοιμώξεων/έτος**
- **3,8/1000 ασθενείς μικρών νοσοκομείων**
- **7/1000 ασθενείς μεγάλων Πανεπιστημιακών νοσοκομείων**
- **17-20% των ασθενών σε ομάδες υψηλού κινδύνου**

Επιβαρυντικοί παράγοντες για ανάπτυξη ΝΠ



- Μηχανική αναπνοή (αύξηση 4-66%)
- Τραχειοστομία (αύξηση 66%)
- Παχυσαρκία
- Σοβαρά υποκείμενα νοσήματα
- Εισρόφηση/Αποικισμός
- Ιογενείς λοιμώξεις

Συχνότερα είδη μικροβίων στην ΝΠ



- *P.aeruginosa*
- *S.aureus*
- *Enterobacteriaceae*
- *Acinetobacter spp*
- Αναερόβια
- *S.pneumoniae*
- *Legionella spp*
- Ιοί

Αποικισμός ΜΕΘ



76% των ασθενών αποικίζονται με μικροβιακά στελέχη, τα οποία στη συνέχεια θα προκαλέσουν λοίμωξη

HAAP/VAP



Πρώιμης έναρξης

- εκδηλώνεται μέσα στις πρώτες 4 ημέρες νοσηλείας ή μηχανικού αερισμού
- προκαλείται συνήθως από ευαίσθητα στα αντιβιοτικά βακτήρια
- είναι καλύτερης πρόγνωσης

Ώψιμης έναρξης

- εκδηλώνεται από την 5^η ημέρα νοσηλείας ή μηχανικού αερισμού και μετά σχετίζεται με πολυανθεκτικά βακτήρια
- έχει αυξημένη νοσηρότητα και θνητότητα

HAAP/VAP



Πρώιμη VAP
(≤ 4 ημέρες Μηχανικού
Αερισμού)
ή
χωρίς παράγοντες κινδύνου
για πολυανθεκτικά

Όψιμη VAP
(≥ 5 ημέρες Μηχανικού
Αερισμού)
ή
με παράγοντες κινδύνου
για πολυανθεκτικά

Streptococcus pneumoniae
Haemophilus influenzae
Moraxella, MSSA
Ευαίσθητα εντεροβακτηριακά
(*E.coli*, *K. pneumoniae*,
Enterobacter sp. *Proteus*,
Serratia marcescens
OXI Pseudomonas aeruginosa

Pseudomonas aeruginosa
K.Pneumoniae (ESBL+)
Acinetobacter sp.
Πολυανθεκτικά Gram(-)
MRSA

Εμπειρική Θεραπεία CAP

● Νοσηλεία κατ' οίκον

αμοξυκιλλίνη+ νεότερες μακρολίδες ή νεότερες κινολόνες ή κετολίδη

Εισρόφηση: αμοξυκιλλίνη/κλαβουλανικό οξύ
ή κεφαλοσπορίνη 2ης γενεάς + κλινδαμυκίνη

● Νοσοκομειακοί ασθενείς

αμινοπενικιλίνη με αναστολέα β-λακταμασών ή μη αντιψευδομοναδική κεφαλοσπορίνη 3^{ης} γενιάς+νεότερη μακρολίδη ή λεβοφλοξασίνη ή μοξιφλοξασίνη

● Νοσηλευόμενοι στη ΜΕΘ

μακρολίδη+αμινοπενικιλίνη με αναστολέα β-λακταμασών ή κεφαλοσπορίνη 3^{ης} γενεάς +κινολόνη

P.aeruginosa

πιπερακιλλίνη/ταζομπακτάμη ή καρβαπενέμη+κινολόνη

Συστάσεις διαγνωστικών εξετάσεων σε CAP (1)



• Κατ' οίκον νοσηλεία:

- Οι διαγνωστικές εξετάσεις είναι προαιρετικές

• Νοσοκομειακοί ασθενείς:

- Αιμοκαλλιέργειες > 2 ζεύγη

- Καλλιέργεια πτυέλων προ της θεραπευτικής αγωγής

- Αντιγόνα ούρων (*L. pneumophila*, *S. pneumoniae*)

Συστάσεις διαγνωστικών εξετάσεων σε CAP (2)



- **Διασωληνωμένοι ασθενείς:**
 - Καλλιέργεια αναρροφήσεων τραχείας
- **Ασθενείς με VAP**
 - Επιβεβλημένες οι καλλιέργειες (BAL/PSB)

Είδη δειγμάτων για τη διάγνωση πνευμονίας (1)



- **A) Μη επεμβατικές τεχνικές**

**1) Πτύελα: -Αυτόματη απόχρεμψη
-Πρόκληση**

Ημιοσοτική καλλιέργεια από βλεννοπυώδες και αιματηρό τμήμα του κλινικού δείγματος γίνονται διαδοχικές αραιώσεις με βαθμονομημένο κρίκο (10μl) στα κατάλληλα θρεπτικά υλικά.

Στις καλλιέργειες πτυέλων αντενδείκνυνται οι εμπλουτιστικοί ζωμοί και οι αναερόβιες καλλιέργειες.

Είδη δειγμάτων – επεμβατικές τεχνικές για τη διάγνωση πνευμονίας (2)

- Β)Στείρα δείγματα
- Πλευριτικό υγρό:υψηλή ειδικότητα
Χαμηλή ευαισθησία (40%)
- Διαθωρακική αναρρόφηση με βελόνη:
επιλεκτική λήψη
- Πνευμονικό βιοπτικό υλικό(Θωρακοσκοπικά ανοικτή βιοψία πνεύμονα) :
- Υψηλή διαγνωστική αξία
- Ευαισθησία 33-80%.

Είδη κλινικών δειγμάτων/επεμβατικές τεχνικές



Μη στείρα δείγματα

Βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα (BAL)

Ποσοτική καλλιέργεια/Μοριακές τεχνικές

Υλικό προστατευμένης βούρτσας

Ποσοτική καλλιέργεια/Μοριακές τεχνικές

Δείγμα κατάλληλο για κυτταρολογική εξέταση

Ενδοτραχειακή αναρρόφηση

Καλλιέργεια μόνο επί πνευμονίας

Διατραχειακή αναρρόφηση

Ποσοτική καλλιέργεια/Μοριακές τεχνικές

Αποφυγή επιμολύνσεων-διάγνωση μικτών
λοιμώξεων

Δυσκολίες στην εργαστηριακή διάγνωση



- Έλλειψη απόχρεμψης (30%)
- Προηγούμενη λήψη αντιβιοτικών (30%)
- Μικροοργανισμοί που δεν ανιχνεύονται εύκολα (25%)
- Απομόνωση μικροβίων-αποικιστών

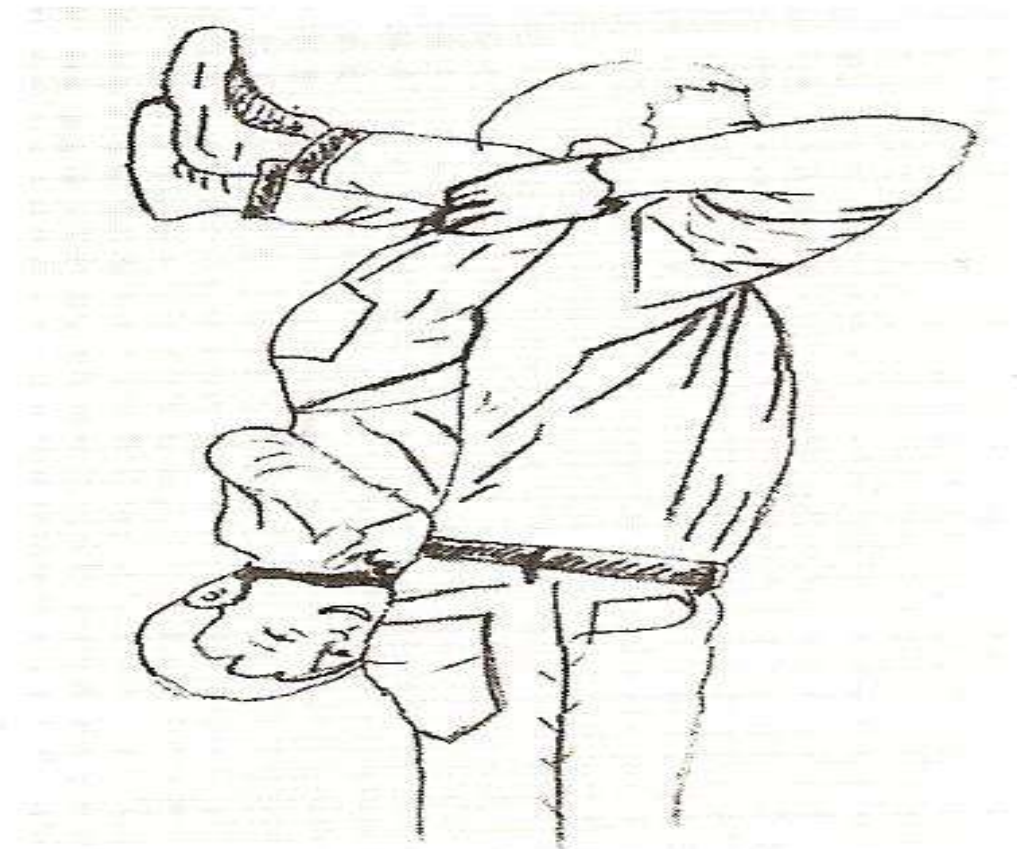
Προκλητά πτύελα (INDUCED SPUTUM)

- Συλλογή μετά από εισπνοή διαλύματος NaCl 3 % υπό μορφή αερολύματος σε νεφελοποιητή για 20 - 30 min
- Σημειώνεται στο παραπνευπτικό η ένδειξη «προκλητά πτύελα»
- Οδηγίες φυσικοθεραπευτού για κατάλληλες θέσεις παροχέτευσης
- Δείγμα κατάλληλο για *P. jirovecii* και *Mycobacterium spp*





Εικόνα 1. Τραμπολίνο για κινητοποίηση εκκρίσεων.



Εικόνα 2. «Upside down piggy back»
θέση για κινητοποίηση εκκρίσεων.

Πτύελα από απόχρεμψη



- Καλύτερο το πρωινό δείγμα πριν από το πρόγευμα
 - Αφαίρεση οδοντοστοιχιών
 - Καλό πλύσιμο στόματος με αποστειρωμένο νερό ή φυσιολογικό ορό
 - Πτύελα με βαθειά απόχρεμψη
 - Βοήθεια από φυσικοθεραπευτή
 - Ευρύστομο δοχείο που σφραγίζει καλά
 - Σήμανση δοχείου
- Μεταφορά στο εργαστήριο < 1 ώρα**



Χρώση Gram και καλλιέργεια πτυέλων



- **Να γίνονται:**
 - **μόνον σε δείγμα υψηλής ποιότητας**
- **Να λαμβάνονται πριν την χορήγηση της αντιβιοτικής θεραπείας**

Κριτήρια διαλογής /αξιολόγησης χρώσης Gram

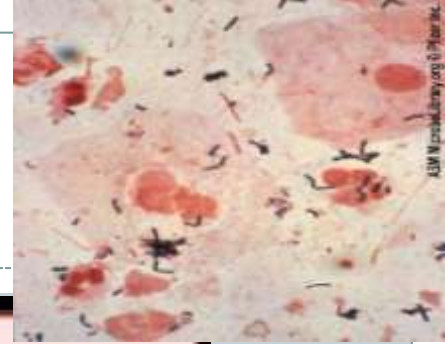


- **Προτυποποίηση των κριτηρίων της χρώσης Gram απαραίτητη**
 - εξασφάλιση αντικειμενικότητας/επαναληψιμότητας αποτελεσμάτων από κάθε εξεταστή
 - εξασφάλιση ποιότητας του κλινικού δείγματος για καλλιέργεια
- **Διάφορα ποσοτικά κριτήρια έχουν προταθεί για την διαλογή κατάλληλων (ποιοτικών) δειγμάτων**
- Η παρουσία πολλών επιθηλιακών κυττάρων είναι ενδεικτική επιμόλυνσης με στοματοφαρυγγική χλωρίδα → υποδεικνύει την αναγκαιότητα νέας δειγματοληψίας

Μικροσκοπική εξέταση: Gram χρώση

- **Κατάλληλο δείγμα πτυέλων (μικροσκόπηση με 10 x αντικειμενικό φακό):**
 - >25 πυοσφαίρια/ οπτικό πεδίο
 - <10 πλακώδη επιθήλια/ οπτικό πεδίο
- **Ευαισθησία: <70%**
 - πνευμονιόκοκκος: ευαισθησία 90%
 - Αιμόφιλος της γρίπης: ευαισθησία 60%
- **Ειδικότητα:**
επηρεάζεται από το είδος του αναζητούμενου μικροοργανισμού

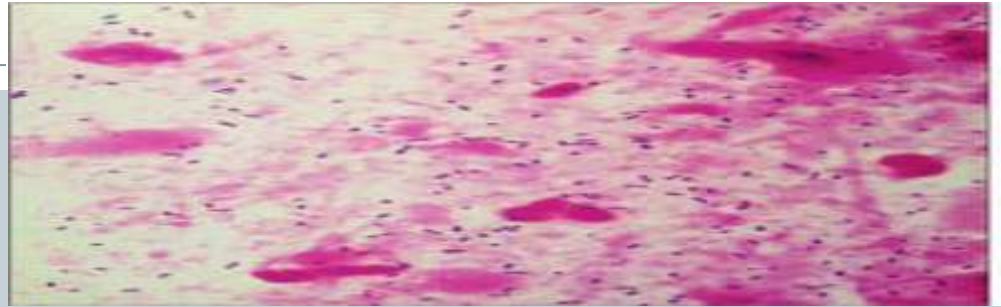
Σύστημα κατά Murray – Washington



	Κατηγορία	Πυροσφαίρια	Επιθήλια
Ακατάλληλο	1	10	>25
	2	10-25	>25
	3	>25	>25
Κατάλληλο	4	>25	10-25
	5	>25	<10
	6	<25	<25



Χρώση Gram



© 2004 MedlinePlus.gov

Ευαισθησία 11 – 100 %
Ειδικότητα 11 – 100 %

- Εκτίμηση της καταλληλότητας του δείγματος
- Εκτίμηση της φυσιολογικής χλωρίδας
- Αναζήτηση παθογόνων και δυνητικά παθογόνων μικροοργανισμών
- Ταχεία απάντηση στον κλινικό για την έναρξη θεραπείας
- Αξιολόγηση της καλλιέργειας

Χρησιμότητα χρώσης Gram στα πτύελα (Cumitech 7B, 2004)



- Διαχωρισμός δειγμάτων σε:
 - α. εμπριέχοντα το παθογόνο βακτήριο
 - β. επιμολυσμένα από την στοματοφαρυγγική χλωρίδα
- Προσδιορίζεται εάν ο μικροοργανισμός στη χρώση βρίσκεται ενδοκυττάρια και το είδος του επικρατούντος μικροοργανισμού → προκαταρκτικές πληροφορίες → αρχική επιλογή της θεραπείας

Γραπτή απάντηση Gram χρώσης



- Α) Επικράτηση ή αποκλειστική παρουσία ενός μικροοργανισμού
- Β) Επικράτηση ενός μικροοργανισμού και παρουσία μικτού βακτηριακού πληθυσμού
- Γ) Παρουσία μικτού βακτηριακού πληθυσμού
- Δ) Απουσία μικροοργανισμών
- Ε) Αριθμός λευκοκυττάρων/επιθηλιακών κυττάρων

Αξιολόγηση-Γραπτή απάντηση κ/ας πτυέλων (I)



- Εάν αναπτυχθούν βακτήρια της χλωρίδας του Α.Α.Σ σημειώνεται ως απάντηση:
 - παρουσία φ.χ. χλωρίδας Α.Α.Σ
- Θετική κ/α σε αποκλειστική ανάπτυξη για *S.pneumoniae* ή *H.influenzae*
 - Ημιποσοτική εκτίμηση , ταυτοποίηση αντιβιόγραμμα

Αξιολόγηση-Γραπτή απάντηση κ/ας πτυέλων (II)

- Απομόνωση ένα ή δύο πιθανών παθογόνων.
- Α. Ημιποσοτική εκτίμηση ($>10^7$ cfu/ml), ταυτοποίηση, αντιβιογράμμα
- Β. Ημιποσοτική εκτίμηση του ποσού της φυσιολογικής χλωρίδας και περιγραφική ταυτοποίηση των βακτηρίων.
- Απομόνωση σε αποκλειστική ανάπτυξη Gram(-) βακτηρίου ή *S. aureus* συνεκτιμάται με τη χρώση Gram για λοίμωξη κυρίως στους ασθενείς της ΜΕΘ.
- Ημιποσοτική εκτίμηση, ταυτοποίηση, αντιβιογράμμα.

Αξιολόγηση-Γραπτή απάντηση κ/ας πτυέλων (III)

- Αριθμός βακτηρίου $\geq 10^5$ cfu/ml σε αποκλειστική στη ημιποσοτική καλλιέργεια είναι ένδειξη για λοίμωξη ΚΑΣ
- Αρνητικό αποτέλεσμα δεν αποκλείει λοίμωξη ΚΑΣ

Αξιολόγηση-Γραπτή απάντηση κ/ας πτυέλων (IV)

- Στους ενήλικες κατεργάζονται τα πτύελα (0.1ml) με 0.9 ml KCL-HCL ανακινούνται και παραμένουν για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια ενοφθαλμίζονται στο ειδικό θρεπτικό υλικό για *Legionella* (BCYE με α-κετογλουταρικό οξύ) και επωάζονται 5 ημέρες σε περιβάλλον υγρασίας.

Πνευμονία-Αιμοκαλλιέργειες



- Προβληματική ειδικότητα
- Χαμηλή ευαισθησία : θετικές σε ποσοστό 4-29%
- 34% αν ληφθούν σε διάστημα <4 ημέρες
- 12% αν ληφθούν > 4 ημέρες
- Σε χορήγηση αντιβίωσης : η συχνότητα ↓ κατά 50%
- Έχουν μεγαλύτερη ευαισθησία για *S. pneumoniae* και μικρότερη για *H. influenzae*

Μειονεκτήματα Αιμοκαλλιεργειών

(1) Υψηλό κόστος

(2) Ψευδώς (+) αιμοκαλλιέργειες

με συνέπεια ακατάλληλη αντιμικροβιακή θεραπεία

→ Η κλινική χρησιμότητα αμφισβητείται

Πνευμονία-Αιμοκαλλιέργειες

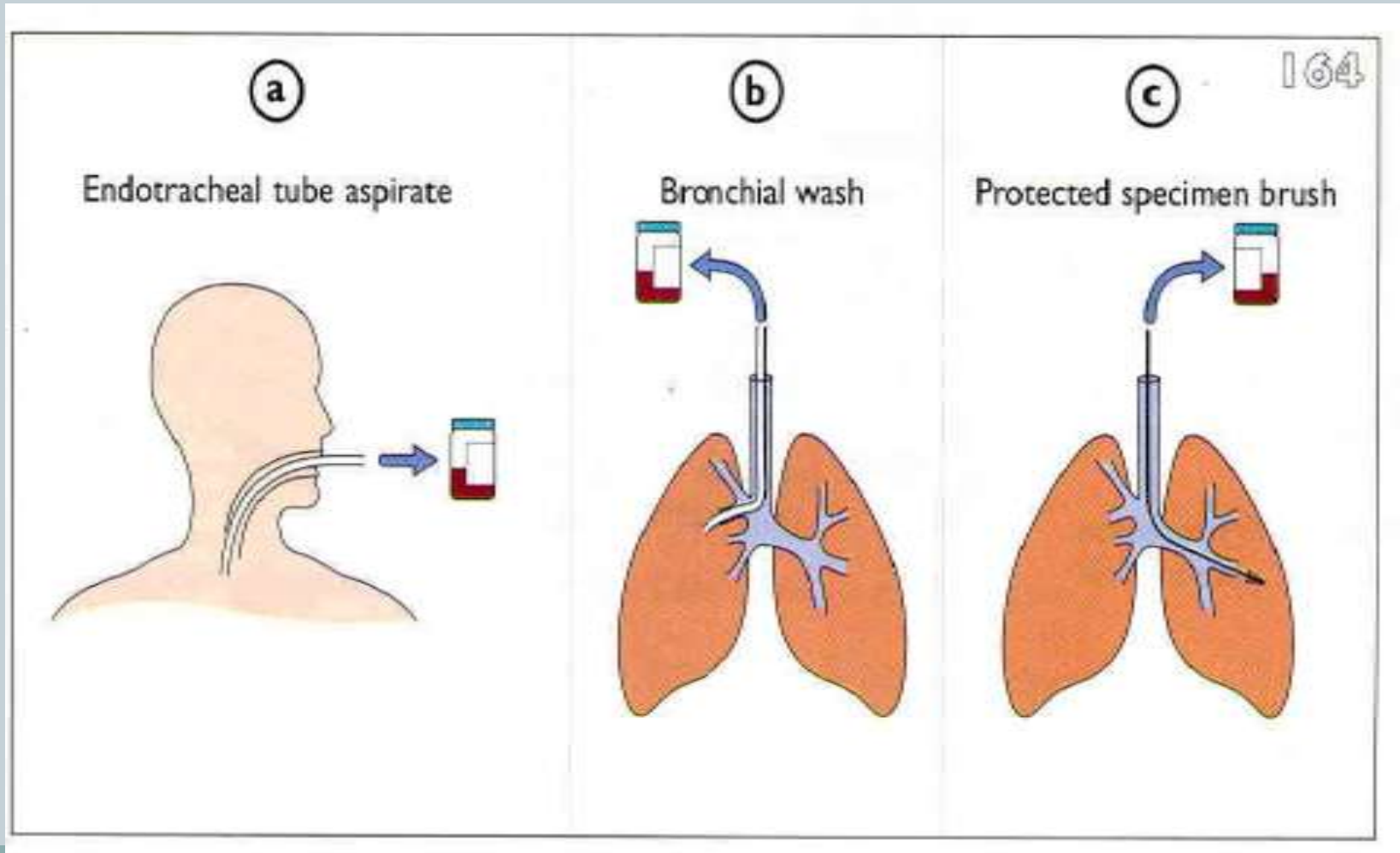


- Σε ασθενείς με σοβαρή πνευμονία ανιχνεύονται
P. aeruginosa, άλλα *Gram (-)* παθογόνα και *S. aureus*.
- Αιμοκαλλιέργειες γίνονται σε ανοσοανεπαρκείς ασθενείς : στη σπληνεκτομή, ανεπάρκεια συμπληρώματος, λευκοπενία και χρόνια ηπατική νόσο
- Πρέπει να παίρνονται δύο ζεύγη αιμοκαλλιεργείων (αερόβια και αναερόβια φιάλη) πριν την έναρξη αντιβιοτικής αγωγής

Κλινικές ενδείξεις εκτεταμένου διαγνωστικού ελέγχου (IDSA Guidelines)

Ένδειξη	Κ/α αίματος	Κ/α Πτυέλων	Ag ούρων <i>Legionella</i>	Ag ούρων <i>S. pneumoniae</i>	Άλλες εξετάσεις
Εισαγωγή σε ΜΕΘ	X	X	X	X	Αναρροφήσεις Τραχείας Βρογχοσκόπηση Μη βρογχοσκ. BAL
Αποτυχία θεραπείας		X	X	X	
Σπληαιώδεις διηθήσεις	X	X			Κ/α για μύκητες και φυματίωση
Λευκοπενία	X			X	
Χρόνια κατάχρηση αλκοόλ	X	X	X	X	
Χρόνια ηπατοπάθεια	X			X	
Σοβαρή ΧΑΠ/ άλλη αναπνευτική νόσος		X			
Ασπληνία	X			X	
Πρόσφατο ταξίδι(2 εβδ)			X		Κ/α για <i>Legionella</i>
(+) τέστ <i>Legionella</i> (ούρα)		Κ/α για <i>Legionella</i>	-		
(+) τέστ <i>S. pneumoniae</i> (ούρα)	X	X		-	
Πλευριτική συλλογή	X	X	X	X	Παρακέντηση και κ/α πλευριτικού υγρού

Μεθοδολογία δειγμάτων από ασθενείς της ΜΕΘ



(I) Βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα (BAL)



- ✓ Τεχνική για απομόνωση κυτταρικών και βιοχημικών στοιχείων από το επιθήλιο των τελικών βρογχιολίων ή κυψελίδων (1-2,5% της κυψελιδικής επιφάνειας)
- ✓ Το εύκαμπτο βρογχοσκόπιο κατευθύνεται σε τμηματικό ή υπο-τμηματικό βρόγχο του μέσου λοβού ή τη γλωσσίδα ή το δεξιό κάτω λοβό

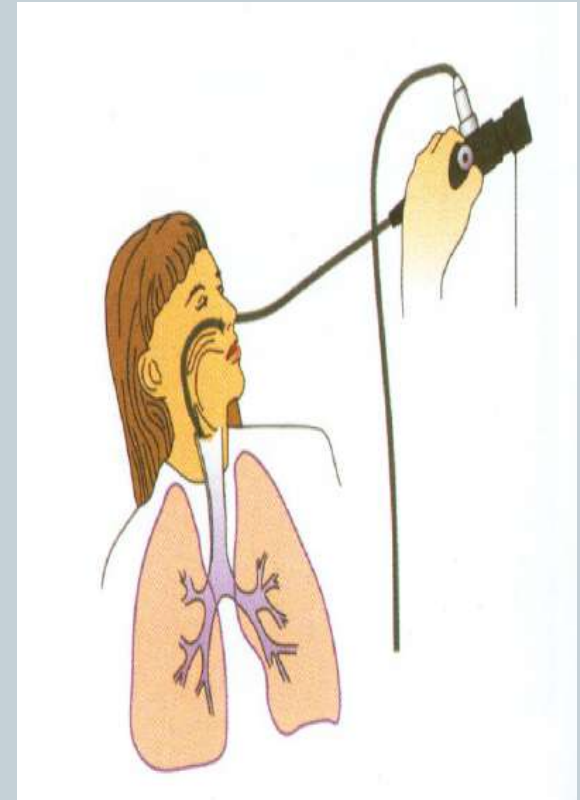
Μεθοδολογία BAL (1)



- ✓ Έπλυση των αεροφόρων οδών με σταδιακή έγχυση φυσιολογικού ορού (NaCl) προθερμασμένου σε 37°C.
- Αναρρόφηση με χαμηλή πίεση (<100 Torr)
- ✓ Το έκπλυμα πρέπει να είναι >40% της συνολικής ποσότητας Φ.Ο.
- ✓ 1^ο Δείγμα βρογχικής προέλευσης (μικροβιολογικές εξετάσεις)
2^ο/3^ο Δείγμα για κυτταρολογική εξέταση

Μεθοδολογία BAL (2)

- Δείγμα εκλογής για το αίτιο της πνευμονίας
- Αναφέρεται το είδος της καλ/γείας (κοινά μικρόβια, μύκητες, β-Koch κ.ά.)
- Στοιχεία ιστορικού (ανοσοκαταστολή, ουδετεροπενία, χημειοθεραπεία κ.ά.)
- Το υγρό μοιράζεται σε 2-3 δοχεία σημειώνεται η ανατομική θέση της διαδικασίας του lavage
- Εναλλακτικά χρησιμοποιείται το mini BAL(20 ml φ.ο)



II) Προστατευμένη βρογχική βούρτσα (PSB)



- Ποσοτική καλλιέργεια για βακτήρια
- Κυτταροκαλλιέργειες ιών
- Προσοχή για μείωση κινδύνου επιμόλυνσης από βακτήρια του Α.Α.Σ.

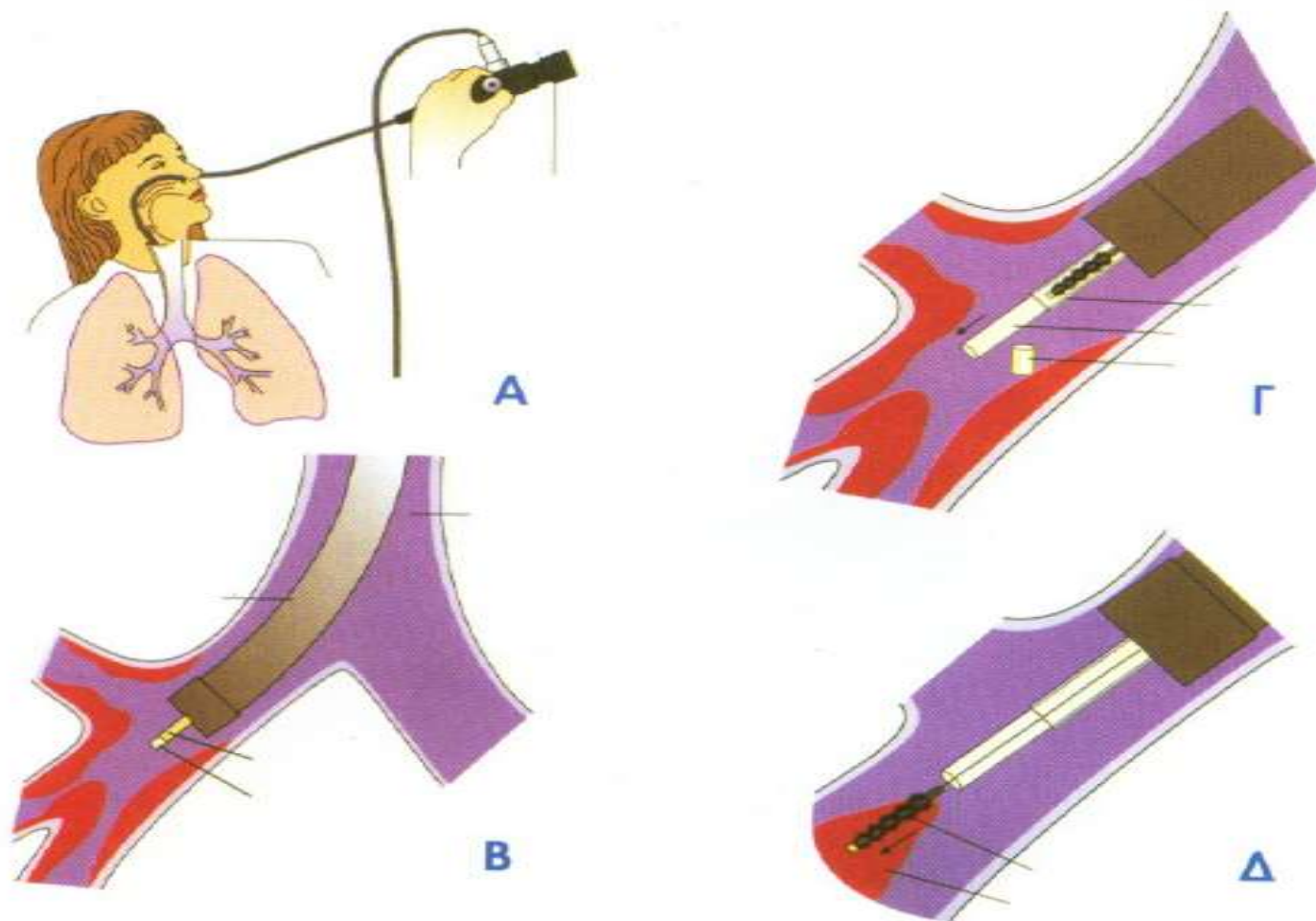
Gram χρώση (BAL) : 1-10 βακτήρια αντιστοιχούν σε αριθμό μικροβιακού φορτίου $\geq 10^4$ cfu/ml, ενδεικτικό στην καλλιέργεια για λοίμωξη.

Μεθοδολογία PBS



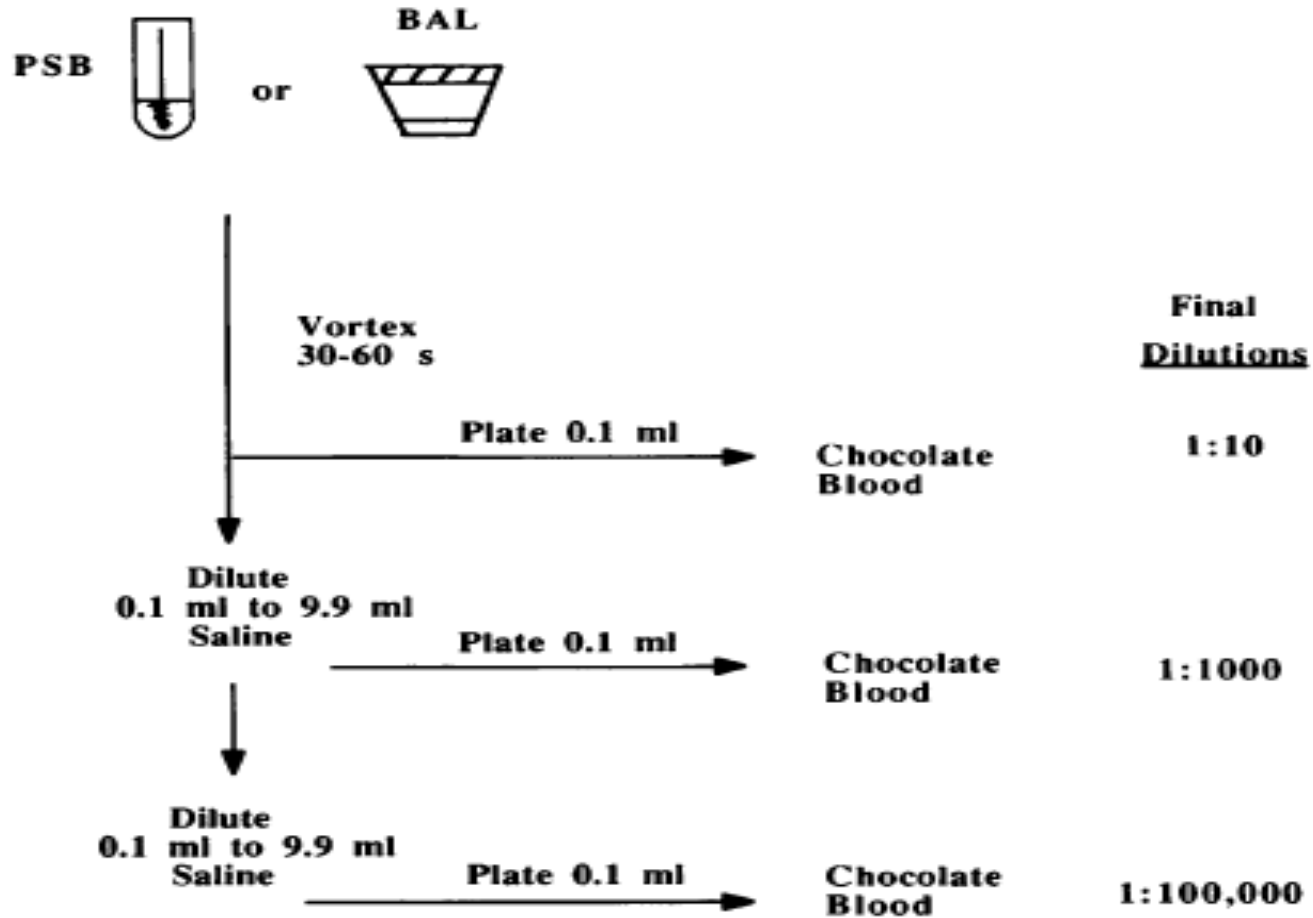
- Εισαγωγή διπλού «τηλεσκοπικού» καθετήρα μέσω του βρογχοσκοπίου
- Ο εσωτερικός καθετήρας που καταλήγει στη βούρτσα προωθείται δια μέσου του εξωτερικού καθετήρα (ειδικότητα 95%)
- Όταν η βούρτσα φθάσει σε ορατή ενδοβρογχική αλλοίωση, συλλέγονται οι εκκρίσεις του βρόγχου (0,01ml-0.001ml)
- Εμβαπτίζεται σε 1 ml Φ.Ο. ή 1 ml Brain Heart Infusion broth

Προστατευμένη βούρτσα

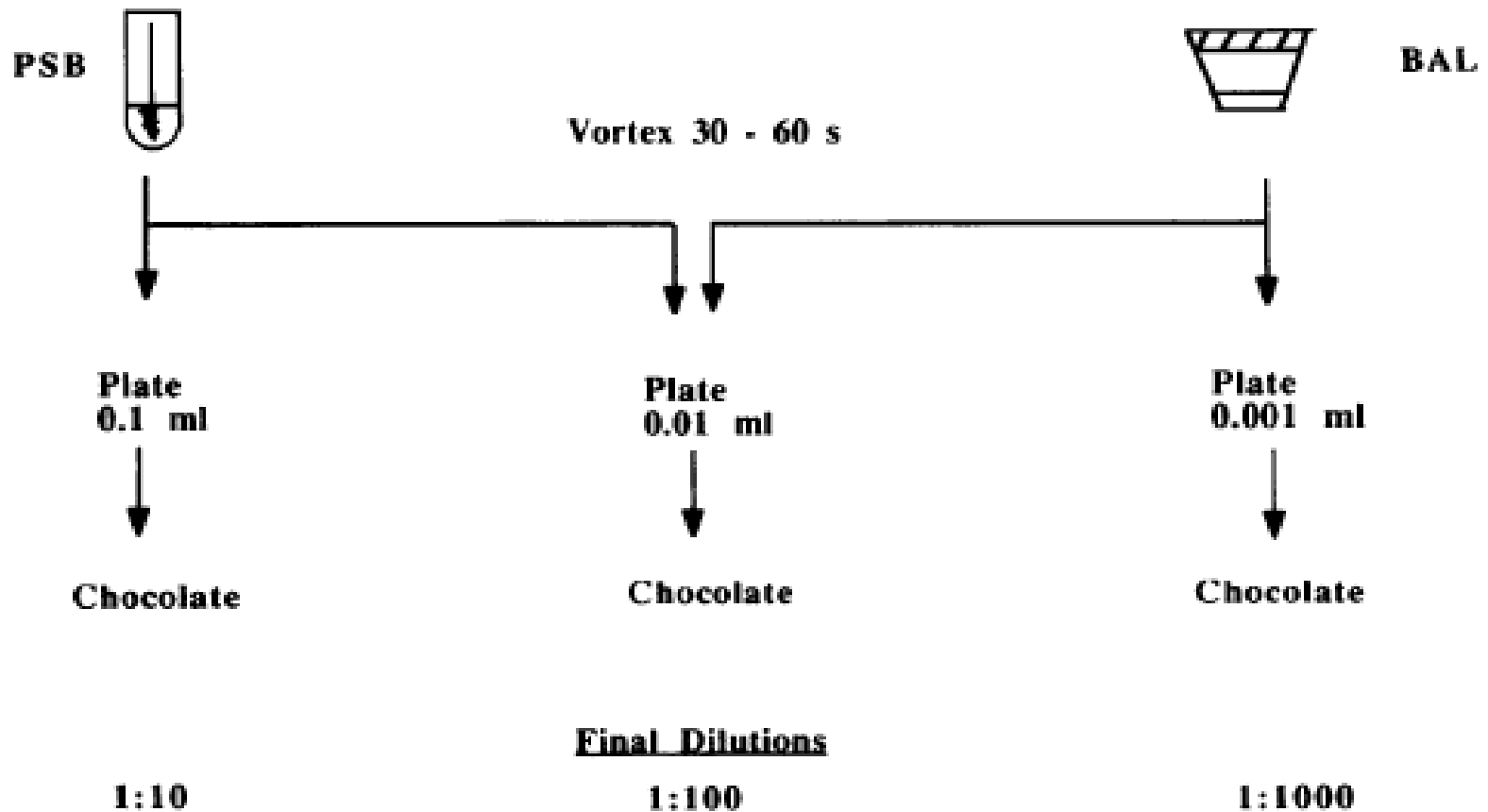


Τοποθετείται σε 1ml αποστειρωμένου φ. ορού ή Ringer's lactate. Μεταφέρεται αμέσως στο εργαστήριο

Μεθοδολογία κ/ας BAL/PBS



Μεθοδολογία κ/ας BAL/PBS



Αξιολόγηση ποσοτικής καλλιέργειας σε «επεμβατικά δείγματα»



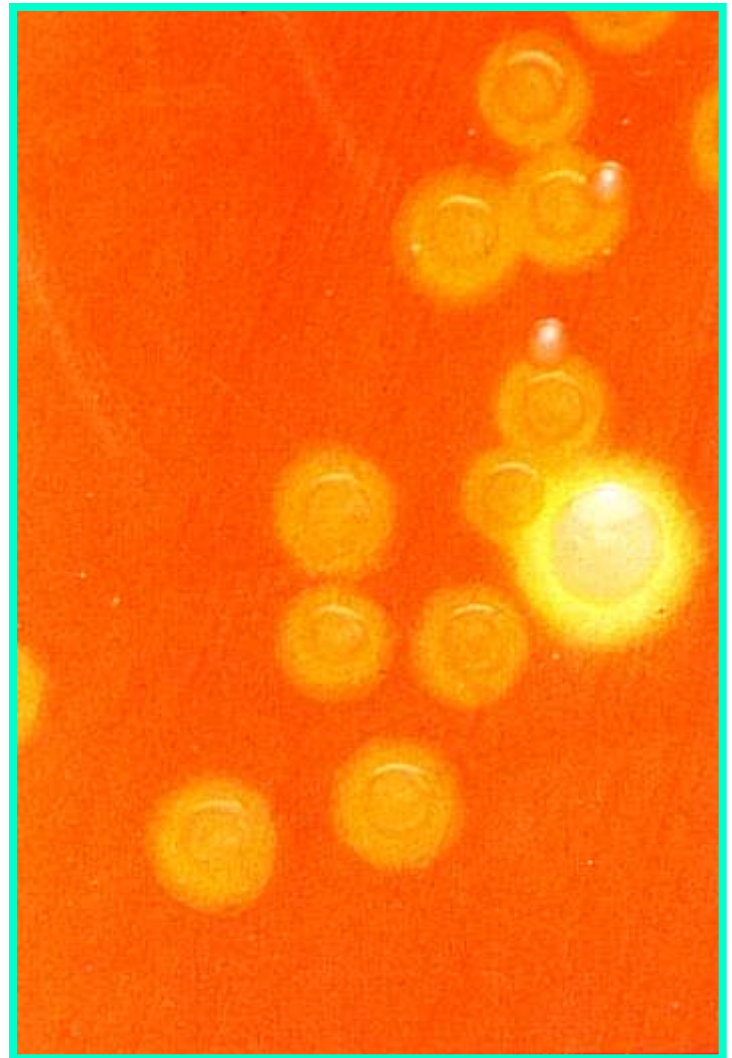
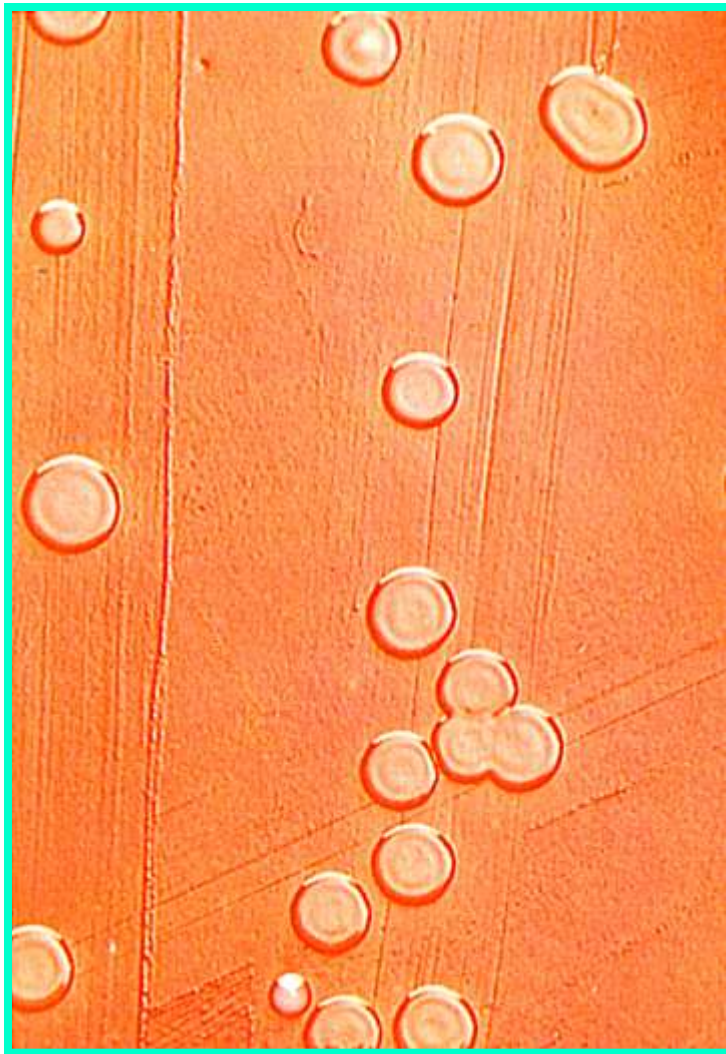
- Ποσοτική καλλιέργεια-ενδεικτικές τιμές για λοίμωξη:
 - Τραχειοβρογχικές εκκρίσεις $\geq 10^6$ cfu/mlcfu
 - Βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα (BAL) $\geq 10^4$ cfu/ml
 - Προστατευμένη βούρτσα (PSB) $\geq 10^3$ cfu/ml

Θρεπτικά υλικά αερόβιας και αναερόβιας κ/ειας

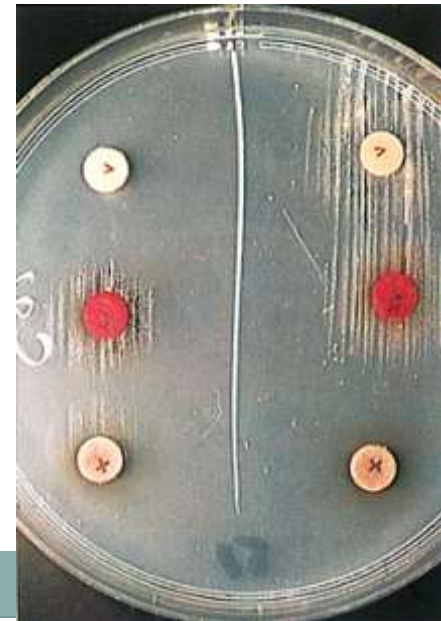
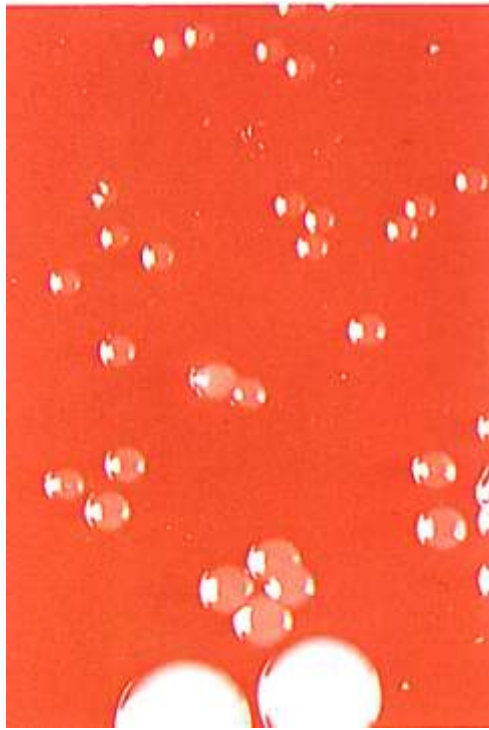
Πίνακας 3. Θρεπτικά υλικά για αερόβια και αναερόβια καλλιέργεια.

Αερόβια Καλλιέργεια	Αναερόβια Καλλιέργεια
Αιματούχο άγαρ	Αιματούχο άγαρ* με βιταμίνη Κ (1 μg/ml) & αιμίνη (5 μg/ml)
MacConkey άγαρ	Bacteroides Bile Esculin (BBE) άγαρ*
Σοκολατόχρωμο άγαρ	Καναμυκίνη**-vancomycin(KVA) αιμολυμένο αιματούχο άγαρ *για χρωματισμένες αποικίες <i>Prevotella</i> και <i>Bacteroides</i> sp.
Sabouraud άγαρ	Phenylethyl alcohol (PEA) αιματούχο άγαρ *προβάτου
	Θειογλυκολικός ζωμός ή Cooked meat ζωμός για α/α

Μορφολογία αποικιών *S. pneumoniae*



**Haemophilus
influenzae**



Ταχείες δοκιμασίες ανίχνευσης αντιγόνων



- **Δοκιμασίες ανίχνευσης αντιγόνων στα ούρα**
 - Legionella pneumophila*
 - Streptococcus pneumoniae*
- **Δοκιμασίες ανίχνευσης αντιγόνων σε δείγματα αναπνευστικού**
 - Influenza A και B*
 - RSV*
 - Para-influenza* -*Human metapneumovirus 1-4*
 - Adenoviruses*

Ανίχνευσης Ag *Legionella pneumophila*



- **Ευαισθησία σε μη φυγοκεντρημένα ούρα**
 - **Ευαισθησία 60-95%**
 - **Ειδικότητα 99%**
- **Ευαισθησία μετά φυγοκέντρωση:**
 - **Αύξηση κατά 10-20%**
- **Αντιγόνα που δεν ανιχνεύονται:**
 - **L.pneumophila οροομάδα 2-16**
 - **Λοιπά Legionella species**

Ανίχνευση αντιγόνου πνευμονιοκόκκου



- **Τεστ ανοσοχρωματογραφίας (ICT) έχει αναπτυχθεί για την ανίχνευση του αντιγόνου PnC του *S.pneumoniae* στα ούρα PnC=κοινό Ag σε όλους τους οροτύπους πνευμονιοκόκκου.**
- **Ταχεία διάγνωση της πνευμονιοκοκκικής πνευμονίας στους ενήλικες**

ΟΡΟΛΟΓΙΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΑΤΥΠΗΣ ΠΝΕΥΜΟΝΙΑΣ



- Ανιχνεύονται στον ορό αντισώματα έναντι του *M. pneumoniae*, των *C. pneumoniae*, της *Legionella spp* και ιών τόσο στην οξεία φάση όσο και στη φάση ανάρρωσης.
- Η διάγνωση τίθεται εάν υπάρχει 4πλασιασμός του τίτλου των IgG ή (IgG και IgM) αντισωμάτων κατά την διάρκεια της λοίμωξης σε δύο δείγματα ορού με μεσοδιάστημα 7-10 ημερών ή εμφάνιση IgM αντισωμάτων.

Μοριακές τεχνικές



- RT-PCR χρησιμοποιείται για την ανίχνευση του *S. pneumoniae* με πολλαπλασιασμό του *ply* γονιδίου.
- Η ευαισθησία και η ειδικότητα σε δείγματα πτυέλων ανέρχεται σε 90% και 80% αντίστοιχα σε σύγκριση με τη χρώση Gram των πτυέλων και τις καλλιέργειες αίματος.
- RT-PCR εφαρμόζεται στην ανίχνευση της *Legionella* με πολ/σμό του *mip* γονιδίου ενώ για τον *H.influenzae*, *S. pyogenes*, *M. pneumoniae*, *C. Pneumoniae* γίνεται πολ/σμός των αντίστοιχων 16s rRNA με ειδικότητα/ ευαισθησία >95%.

Διάγνωση των λοιμώξεων στο εργαστήριο κλινικής μικροβιολογίας

Ασθενής

Κλινική Διαφορική Διάγνωση

Επιλογή και συλλογή κατάλληλων κλινικών δειγμάτων για την αναζήτηση ύποπτων μικροβιακών παραγόντων

Ορολογικές μέθοδοι:
Διαγνωστικοί τίτλοι Abs
ή
ορομεταστροφή

Άμεση αναζήτηση:
-Ειδικές χρώσεις
-Αναζήτηση Ags
-Αναζήτηση τοξινών
-Μοριακές μέθοδοι

Καλλιέργεια: -Ταυτοποίηση με:
-βιοχημικές αντιδράσεις,- με ειδικούς αντιορούς ή δοκιμασίες ανοσοφθορισμού,-ή με μοριακές τεχνικές.
Δοκιμή ευαισθησίας στα αντιβιοτικά

Ευχαριστώ