

Μετεκπαιδευτικά μαθήματα ΕΜΕ

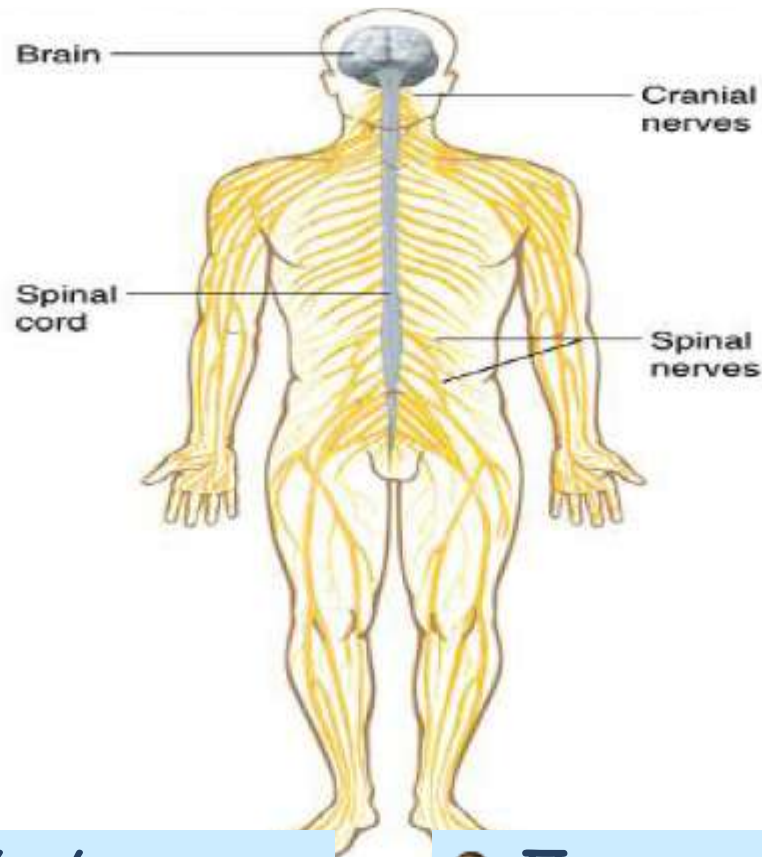
Λοιμώξεις ΚΝΣ

(Κεντρικού Νευρικού Συστήματος)

Βακτηριακή μηνιγγίτιδα, τέτανος, αλλαντίαση

DR Ελένη Αλεξάνδρου - Αθανασούλη
Διευθύντρια Μικροβιολογικού Τμήματος
Νοσ. Παιδων «Αγία Σοφία»

Νευρικό Σύστημα



● Κεντρικό νευρικό σύστημα

- Εγκέφαλος
- Νωτιαίος Νωτιαίος

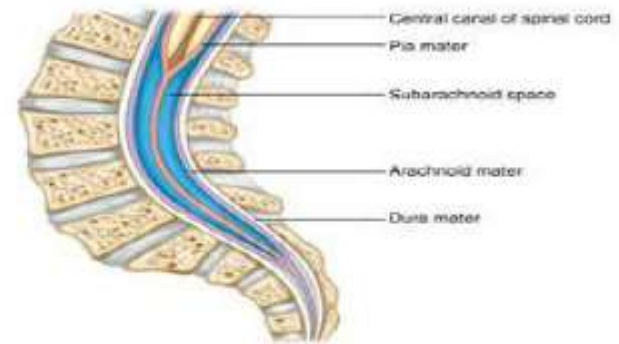
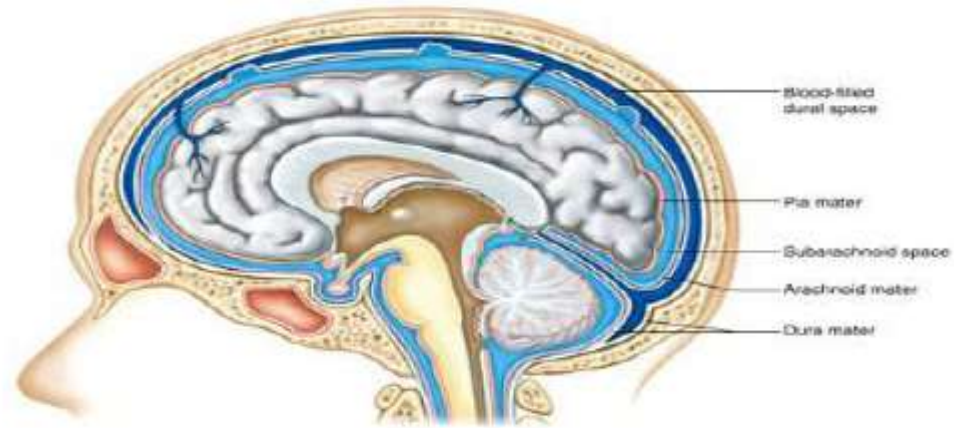
● Περιφερικό νευρικό σύστημα

- Εγκεφαλικά νεύρα
- Νωτιαία νεύρα

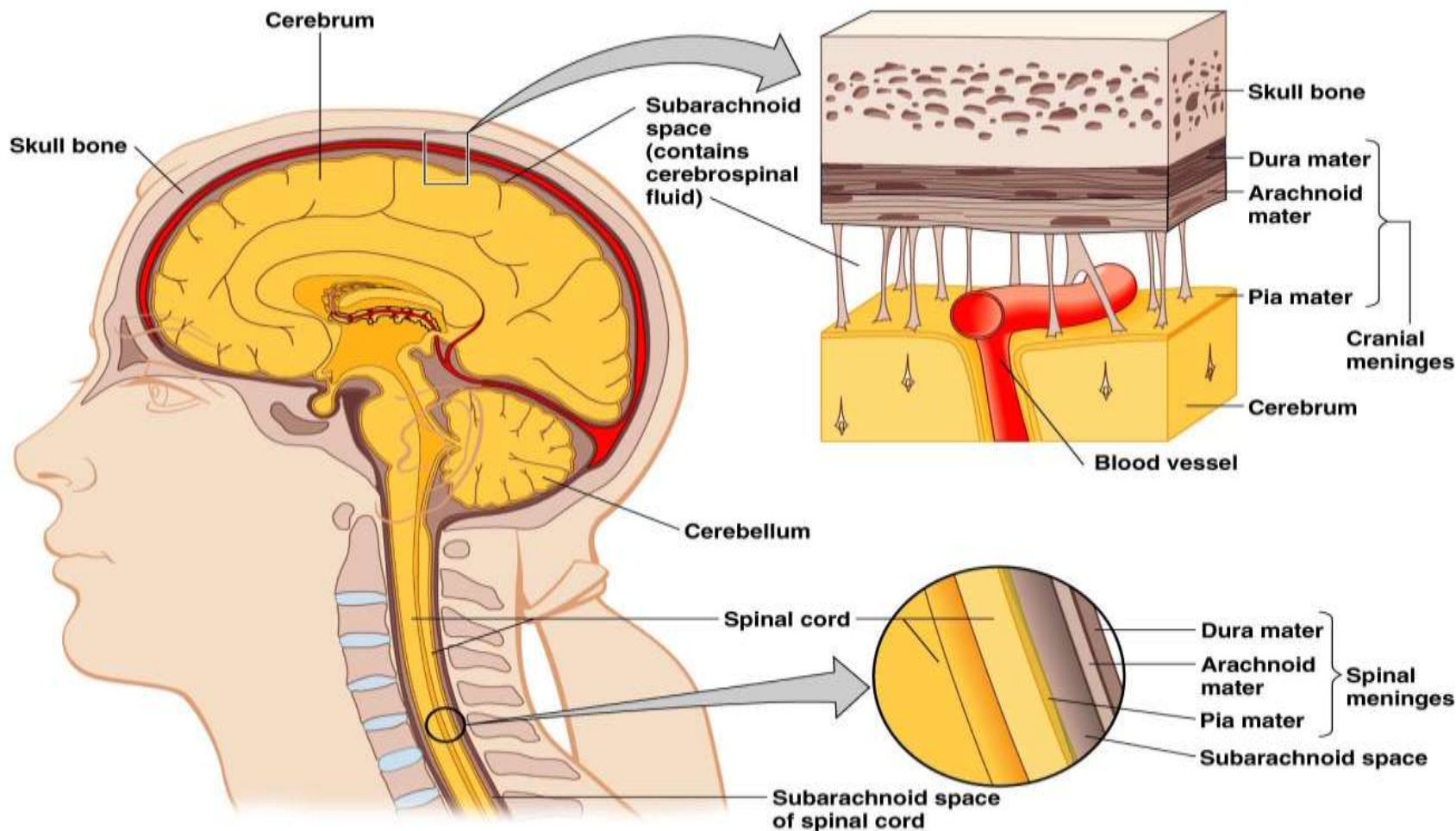
Κεντρικό Νευρικό Σύστημα (ΚΝΣ)

- Εγκέφαλος
- Νωτιαίος μυελός
- Νευρώνες
- Μήνιγγες (σκληρά, αραχνοειδής, χοριοειδής)
- Εγκεφαλονωτιαίο υγρό
- Αιματοεγκεφαλικός φραγμός

Copyright © The McGraw-Hill Companies, Inc. Permission required for reproduction or display.



Οι μήνιγγες και το εγκεφαλονωτιαίο υγρό (ΕΝΥ) αιματοεγκεφαλικός φραγμός: ενδοθήλιο αγγείων



Θέσεις λοίμωξης

Υπαραχνοειδής χώρος

Υποσκληρίδιος χώρος

Επισκληρίδιος χώρος

Λοιμώξεις Κεντρικού Νευρικού Συστήματος

- Μηνιγγίτιδα (βακτηριακή, άσηπτη, οξεία, χρόνια, μετατραυματική, μετεγχειρητική)
- Εγκεφαλίτιδα
- Μηνιγγοεγκεφαλίτιδα
- Εγκεφαλικό απόστημα και άλλες εντοπισμένες λοιμώξεις
- Λοιμώξεις, μέσω τοξινών που δρουν στο ΚΝΣ:
τέτανος αλλαντίαση διφθερίτιδα
- Άλλες λοιμώξεις ΚΝΣ

Άλλες λοιμώξεις του ΚΝΣ

Από:

- Prions (σπογγώδης εγκεφαλοπάθεια)
- Εμφυτεύματα παροχέτευσης του ΕΝΥ (Shunts)
- Νευροχειρουργικές επεμβάσεις
- Τραύμα του ΚΝΣ
- Νευροτρόπους ιούς:

πολιομυελίτιδας,
λύσσας,
έρπης ζωστήρ,
HTLV-1,
αρμποϊοί

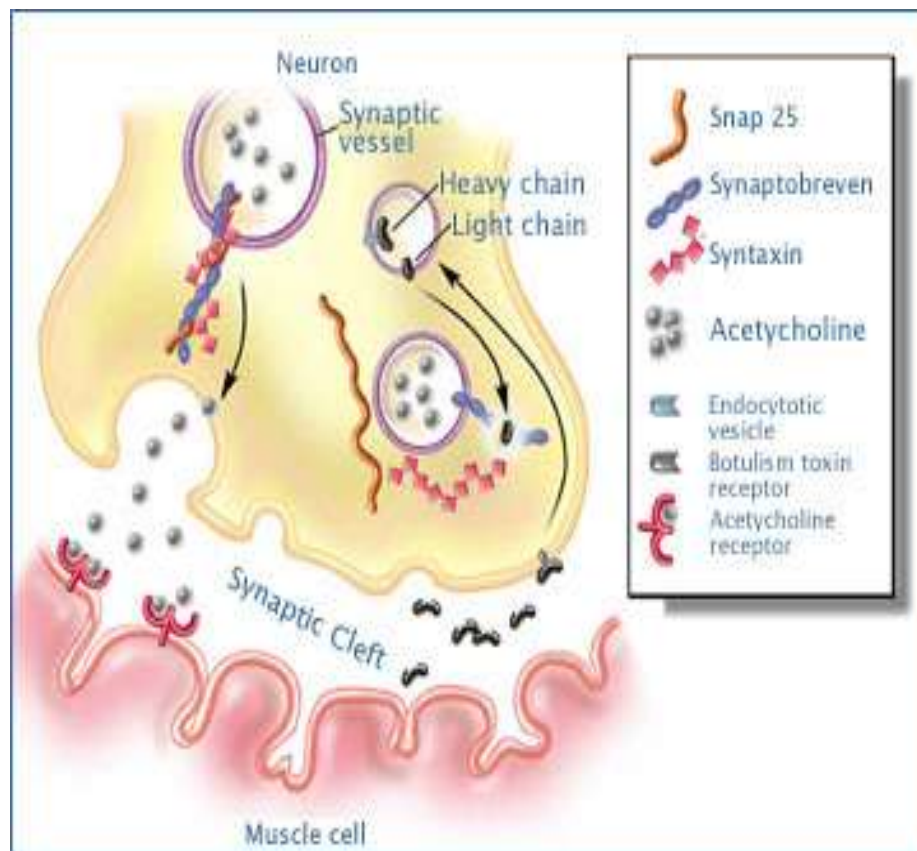
Λοιμώξεις Κεντρικού Νευρικού Συστήματος

- Μηνιγγίτιδα (βακτηριακή, άσηπτη, οξεία, χρόνια, μετατραυματική, μετεγχειρητική)
- Εγκεφαλίτιδα
- Μηνιγγοεγκεφαλίτιδα
- Εγκεφαλικό απόστημα και άλλες εντοπισμένες λοιμώξεις
- Λοιμώξεις, μέσω τοξινών που δρουν στο ΚΝΣ:
τέτανος αλλαντίαση διφθερίτιδα
- Άλλες λοιμώξεις ΚΝΣ

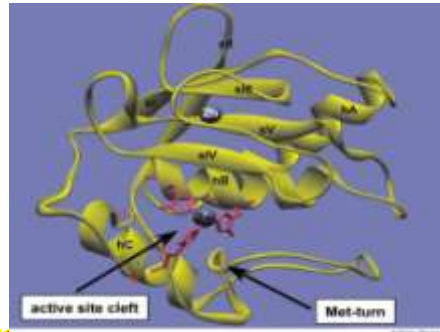
Λοιμώξεις του ΚΝΣ μέσω τοξινών (τοξικώσεις)

τέτανος

αλλαντίαση



Λοιμώξεις του ΚΝΣ μέσω τοξινών (τοξικώσεις)



- Τέτανος

- ΤΕΤΑΝΟΣΠΑΣΜΙΝΗ

Δείχνει τροπισμό στα ανασταλτικά κύττα-ρα του ΚΝΣ

- Ακαμψία,  σπασμοί



- Αλλαντίαση

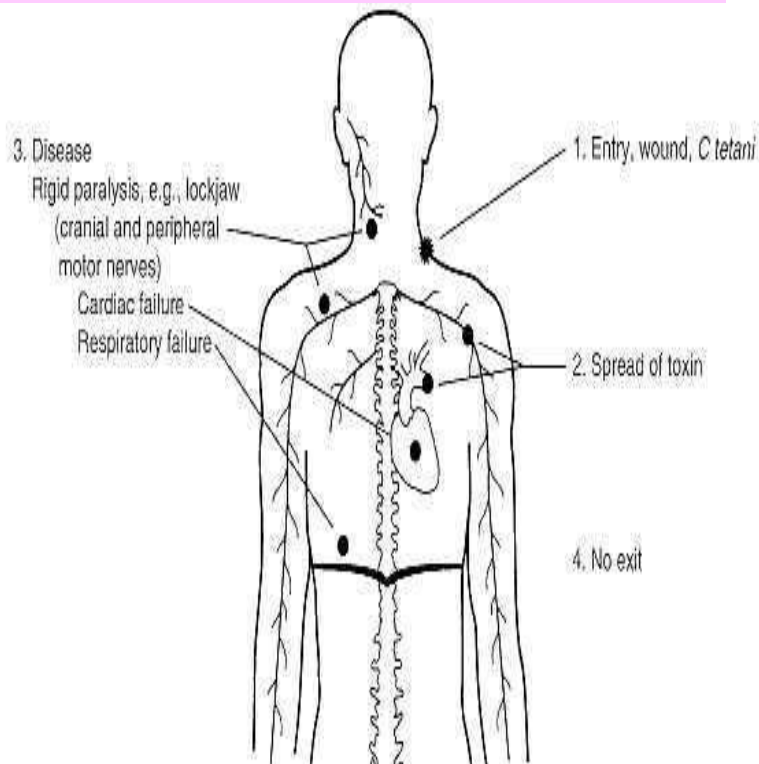
- ΒΟΤΟΥΛΙΝΙΚΗ ΤΟΞΙΝΗ

Προσβάλλει κυρίως τις περιφερικές νευρομυικές & τις αυτόνομες συνάψεις

- Εξασθένηση,  χαλαρή παράλυση

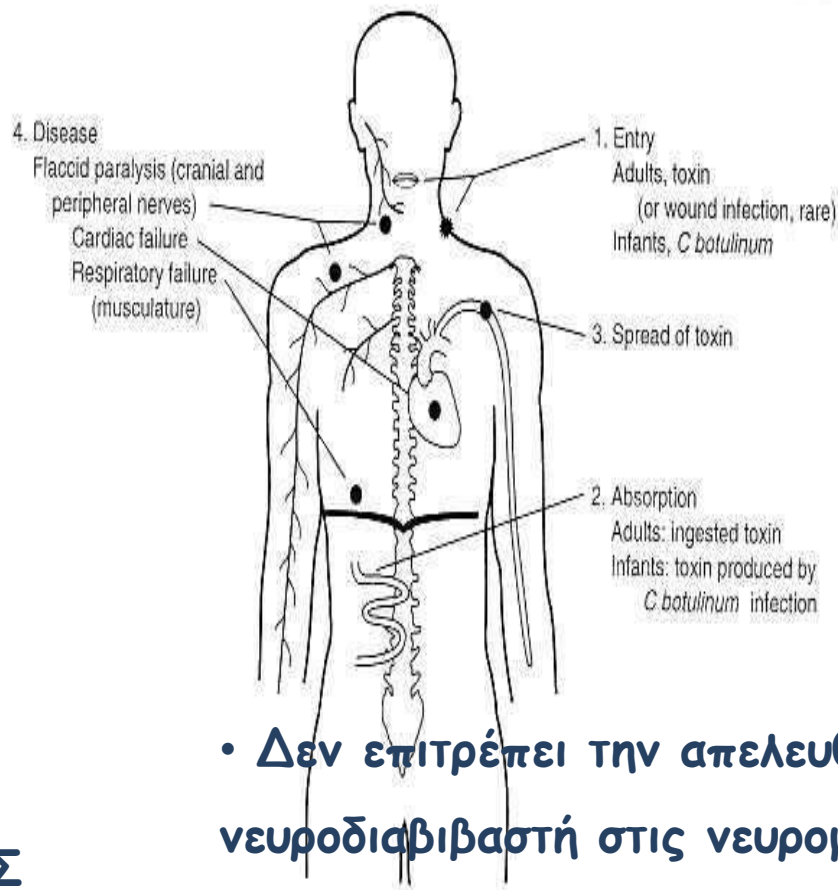


Τετανοσπασμίνη



- Στόχοι διάφορα σημεία στο ΚΝΣ:
- Νωτιαίος μυελός και εγκέφαλος
- Απολήξεις περιφερικών νεύρων, ΑΝΣ
- (επί μακρόν διέγερση οδηγεί σε υπερτονία)
- Ελάχιστη θανατηφόρος δόση 2.5 ng/kg ΒΣ
- Μεταλλοπρωτεΐνάση εξαρτώμενη από Zinc

Βοτουλινική τοξίνη



- Δεν επιτρέπει την απελευθέρωση νευροδιαβιβαστή στις νευρομυικές συνάψεις
- Πεπτιδάση εξαρτώμενη από Zn

Τέτανος

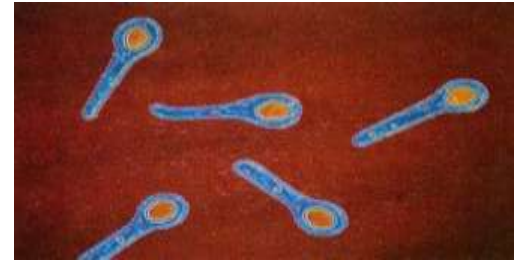
- Θνητότητα: Άλλοτε 40 - 78 %, σήμερα [ΗΠΑ] 10 %
- Χρόνος επώσης: 3-21 ημέρες & από την 4^η-14^η μέρα γέννησης στον νεογνικό τέτανο
- Οπισθότονος & Σαρδώνειος γέλωτας: από ↑ ακαμψία (υπερτονία)



Τέτανος

Clostridium tetani

- Θερμοανθεκτικό (επιβιώνει σε 121 C για 10 - 15')
- Ανθεκτικό σε αντισηπτικά και σε χημικές ουσίες π.χ. φαινόλες



- ❖ Gram (+) βακτηρίδιο, **υποχρεωτικά αναερόβιο**, σπορογόνο
- ❖ Σπόροι υπάρχουν παντού στο χώμα
- ❖ Βλαστικές μορφές στο γαστρεντερικό Σ ανθρώπων & ζώων
- ❖ Πύλη εισόδου βαθιά τραύματα (επίσης σε χρήστες ηρωίνης IV, & ο ομφάλιος λώρος σε υποανάπτυκτες χώρες, αλλά & οποιαδήποτε ΛΣΔ
- ❖ Εκεί αναπτύσσεται και απελευθερώνει την **τετανοσπασμίνη** που δρά στις νευρομυϊκές συνάψεις μπλοκάρωντας τις οδούς χαλάρωσης των μυών

Κλινικές μορφές τετάνου

- Εντοπισμένος: συνεχείς μυϊκοί σπασμοί στο σημείο τραυματισμού
- Κεφαλικός: μαζί με μέση ωτίτιδα σχετιζόμενη με τραυματισμό στο κεφάλι
- Γενικευμένος: (80% των περιπτώσεων) τρισμός γνάθου, ↑ αρτηριακή πίεση, εφιδρώσεις, πυρετός, επεισοδιακή ταχυκαρδία, σπασμοί
- Νεογνικός: συνήθως σε νεογνά που δεν έχουν παθητική ανοσία και παρουσιάζουν λοίμωξη του ομφαλίου λώρου

Η εργαστ διερεύνηση δεν κρίνεται χρήσιμη. Η διάγνωση βασίζεται μόνο στα κλινικά σημεία και συμπτώματα

Αλλαντίαση

C. botulinum



- ❖ Gram (+) βακτηρίδιο, **υποχρεωτικά αναερόβιο**, σπορογόνο
 - ❖ Η τοξινική δράση οφείλεται στη βοτουλινική τοξίνη.
 - ❖ Η βοτουλινική (A - G) τοξίνη εμποδίζει την απελευθέρωση ακετυλοχολίνης στις νευρομυικές συνάψεις προκαλώντας **χαλαρή παράλυση**
- Θνητότητα από τύπο A: 60 - 70 % ενώ από τύπο B: 25 %
- Τύποι C & D: σε ζώα
- Τύπος E: σε θαλάσσια & λιμναία ιζήματα

Αλλαντίαση. Κλινικές μορφές

- Τροφογενής: Από βρώση τροφών όπου έχουν βλαστήσει οι σπόροι & έχουν αναπτυχθεί μικρ/σμοί που παράγαν τοξίνη. **Συχνότερη μορφή**
- Τραυματική: λοίμωξη τραύματος, όπου ο μικρ/σμός παράγει τοξίνη που διασπείρεται μέσω της κυκλοφορίας. **Πολύ σπάνια μορφή**
- Νεογνική: Η λοίμωξη δημιουργείται στον πεπτικό Σ των νεογνών, όπου ο μικρ/σμός τον αποικίζει & παράγει τοξίνη. **Συχνά από μέλι**
- Αναπνευστική: (Βιοτρομοκρατία) από τρόφιμα, ή από εισπνοή
- Ακαθορίστου αιτίας: ηγή άγνωστη, συνήθως από εντερικό αποικισμό με in vivo παραγωγή τοξίνης. **Συνήθως κατόπιν χειρουργείου.**

Αλλαντίαση

- Έναρξη συμπτωμάτων: τροφογενής: 8-36 h μετά την πρόσληψη τοξίνης, μόλυνση με σπόρους: 4-14 μέρες, εισπνοή 12 h-3 μέρες
- Διάρκεια: 2 ώρες - 14 μέρες μετά την εισαγωγή στην κυκλοφορία
- Αρχικά συμπτώματα: αδιαθεσία, ζάλη, ξηροστομία, ναυτία, έμετος
- Μετά τη νευρολογική διαταραχή: θάμβος οράσεως, διπλωπία, δυσφαγία, δυσαρθρία, προοδευτική εξασθένηση των σκελετικών μυών, προϊούσα απνευστική ανεπάρκεια, συμμετρική κατιούσα χαλαρή παράλυση



Χαρακτηριστική απουσία πυρετού , αισθητικών διαταραχών, προσβολής ΚΝΣ

Αλλαντίαση. Εργαστηριακές εξετάσεις

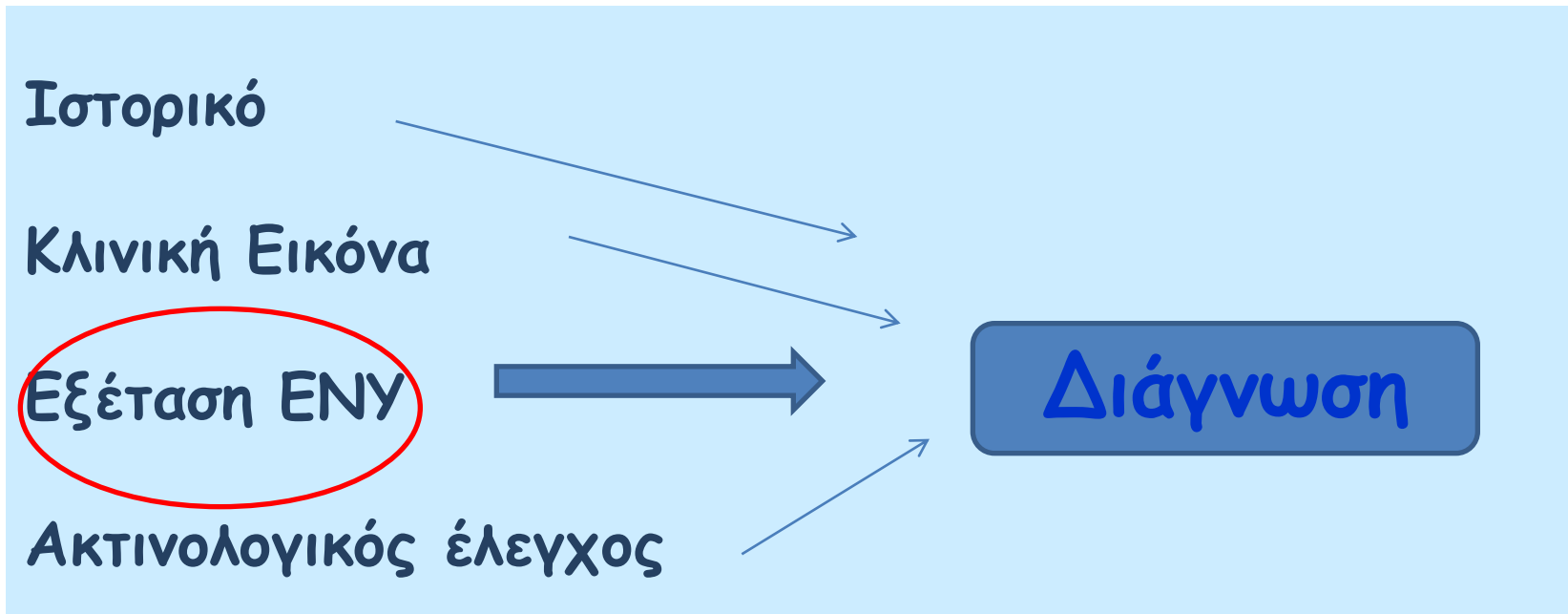
1. Αναζήτηση βοτουλινικής τοξίνης σε: ορό, εμέσματα, γαστρικό υγρό, κόπρανα, ύποπτες τροφές
2. Απομόνωση *C. botulinum* στα κόπρανα ή τροφές
3. Ενδοπεριτοναϊκή έκχυση ορού σε πειραματόζωο
4. Επί υποψίας αναπνευστικής μορφής αναζήτηση τοξίνης σε ρινικό επίχρισμα ή σε BAL

Η εξέταση ENY & οι αιματολογικές εξετάσεις ρουτίνας:κ.φ.

Λοιμώξεις Κεντρικού Νευρικού Συστήματος

- Μηνιγγίτιδα (βακτηριακή, άσηπτη, οξεία, χρόνια, μετατραυματική, μετεγχειρητική)
- Εγκεφαλίτιδα
- Μηνιγγοεγκεφαλίτιδα
- Εγκεφαλικό απόστημα και άλλες εντοπισμένες λοιμώξεις
- Λοιμώξεις, μέσω τοξινών που δρουν στο ΚΝΣ:
τέτανος αλλαντίαση διφθερίτιδα
- Άλλες λοιμώξεις ΚΝΣ

Διαγνωστική προσπέλαση μηνιγγίτιδας



- Μικροβιολογική εξέταση ΕΝΥ και απομόνωση του παθογόνου μικροοργανισμού

Ορισμός μηνιγγίτιδας - Κλινική περιγραφή-

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

ΕΝΥ. Ένα «πολύτιμο» δείγμα

- ❑ Η επανάληψη της λήψης του δείγματος είναι ΕΞΑΙΡΕΤΙΚΑ ΔΥΣΚΟΛΗ και σε μερικές περιπτώσεις ΑΔΥΝΑΤΗ ιδιαίτερα σε ασθενείς μικρής ηλικίας (βρέφη, παιδιά)
- ❑ Η ορθή λήψη, συντήρηση και αποστολή του ΕΝΥ είναι καθοριστική για το αποτέλεσμα της ανάλυσης
- ❑ Πρέπει να τηρούνται ευλαβικά οι διαδικασίες λήψης και αποστολής δειγμάτων

● Μικροβιολογική εξέταση ΕΝΥ
και απομόνωση του παθογόνου
μικροοργανισμού

"Gold Standard"

Πολύ μεγάλη διαγνωστική αξία για την
έγκαιρη και σωστή αντιμετώπιση του
ασθενή

Χρόνος λήψης ΕΝΥ

- Λήψη ΕΝΥ: Κατά προτίμηση πριν την αντιμικροβιακή θεραπεία

!! εφ'όσον είναι δυνατόν

- Συγχρόνως πρέπει να λαμβάνεται

και αιμοκαλλιέργεια



Τρόπος λήψης του ΕΝΥ

● Οσφυονωτιαία παρακέντηση

Ιδανική διαδικασία αντισηψίας:

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

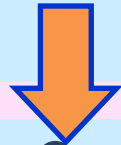


- Εισαγωγή της ειδικής βελόνας στο O3-O4 ή O4-O5, ή O5 -I1 και αργή λήψη του ΕΝΥ σε 3-4 αποστειρωμένα σωληνάκια που κλείνουν ερμητικά με πώμα.

Διαδοχική αρίθμηση των σωληναρίων

ΑΠΟΣΤΟΛΗ ΤΟΥ ΕΝΥ ΣΤΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ

Αποστολή στο Εργαστήριο **χωρίς καθυστέρηση** σε πλαστικό σακουλάκι μαζί με σχετικό παραπεμπτικό **ΕΝΗΜΕΡΩΣΗ ΤΟΥ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟΥ**



- ✓ στοιχεία του ασθενή
- ✓ ημερομηνία και ώρα λήψης δείγματος
- ✓ θέση λήψης δείγματος (π.χ. ΟΝΠ, Shunt)
- ✓ σύντομο ιστορικό ή πιθανή διάγνωση
- ✓ φαρμακευτική αγωγή



Αποστολή δείγματος ΕΝΥ στο Εθνικό κέντρο αναφοράς μηνιγγίτιδας

- ❑ Δείγμα 0,5-1 ml μη-φυγοκεντρημένου ΕΝΥ αποστέλλεται **ΑΜΕΣΑ** στο Κέντρο Αναφοράς μηνιγγίτιδας σε καλά πωματιζόμενο, αποστειρωμένο και ασφαλές σωληνάριο μεταφοράς. Αν το υλικό είναι πολύ αιματηρό και υπάρχει κίνδυνος να πήξει, να τοποθετηθεί σε σωληνάριο με EDTA
- ❑ Σε περίπτωση που το δείγμα δεν μπορεί να αποσταλεί άμεσα, φυλάσσεται στην κατάψυξη
- ❑ *Αποστέλλεται και δείγμα αίματος (σε EDTA)*

Τρόπος διατήρησης του ΕΝΥ

ΤΟ ΔΕΙΓΜΑ ΠΡΕΠΕΙ ΝΑ ΕΞΕΤΑΣΤΕΙ ΑΜΕΣΩΣ ΚΑΤΑ ΠΡΟΤΕΡΑΙΟΤΗΤΑ (σε θάλαμο βιολογικής ασφάλειας)

Φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου έως ότου ολοκληρωθεί η μικροβιολογική εξέταση ($\leq 24h$)

Επίσης δείγμα φυλάσσεται στην κατάψυξη (για PCR) και στο ψυγείο για άλλες εξετάσεις (π.χ. αντισώματα για ιούς)

Διαχείριση δειγμάτων ΕΝΥ

➤ 1'ο σωληνάριο: βιοχημική εξέταση



➤ 2'ο >> : μέτρηση κυττάρων & μικροβιολογική εξέταση

➤ 3'ο >> : αποστολή για μοριακές τεχνικές

ή αν αποσταλούν δύο σωληνάρια

● το **διαυγέστερο** για μέτρηση κυττάρων & το άλλο για καλ/α
(η βιοχημική εξέταση από το υπερκείμενο τους)

●

Διαχείριση δειγμάτων ΕΝΥ

➤ αν αποσταλεί **μόνο ένα** σωληνάριο με μικρή ποσότητα ΕΝΥ γίνεται **→** συνεννόηση για την προτεραιότητα των εξετάσεων



➤ Συνήθως **ακολουθείται η σειρά:**

μέτρηση κυττάρων & άμεσο,

γλυκόζη,

καλλιέργεια,

πρωτεΐνη

Παραλαβή & φυσική εξέταση ΕΝΥ

Σημειώνουμε τον αριθμό των σωληναρίων καθώς:

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

& τέλος τους φυσικούς χαρακτήρες:

✓ **όψη** *φυσιολογικά: διαυγές σαν από καθαρότατο νερό*
μη φυσιολογική όψη: οπαλίζον, θολερό



✓ **χρώμα** *φυσιολογικά: άχρωμο*
μη φυσιολογικό χρώμα: ροδόχρουν, αχνό κίτρινο, ξανθοχρωματικό, αιμορραγικό

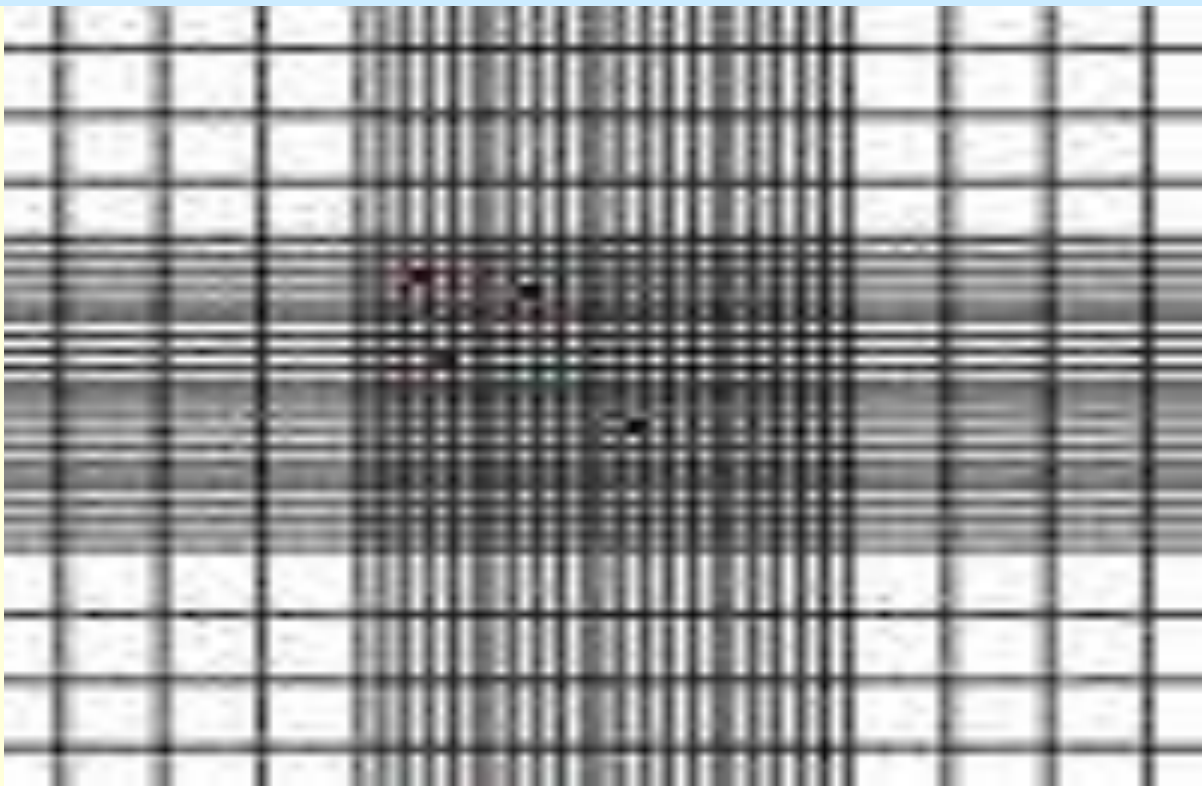


Συνήθειες μεταβολές φυσικών χαρακτήρων ΕΝΥ

- ✓ **Θολερότης:**
 - * **Λευκοκύτταρα > 200/μl**
 - * **ερυθροκύτταρα > 400/μl**
 - * **μικροοργανισμοί > 10⁵ /μl**
 - * **σκιαγραφικές ουσίες, λιποκύτταρα**
- ✓ **Ξανθοχρωμία:**
 - * **αυξημένο λέυκωμα (>100 mg/dl)**
 - * **ιστορικό τραυματικής ΟΝΠ**
 - * **υπαραχνοειδής ή ενδοκρανιακή αιμορ**
 - * **ίκτερος (χολερυθρίνη ορού >6 mg/dl)**
 - * **καρωτενοειδή, μελάνωμα, rifampicin**
- ✓ **Πήγμα ινικής:** **πρωτεΐνη > 150 mg/dl**
- ✓ **Αραχνοειδές πήγμα στην επιφάνεια:** **φυματιώδης μηνιγγίτις**
- ✓ **Παχύρευστο ΕΝΥ:** **βαρειά μηνιγγίτιδα,**
↑ αριθμός κρυπτοκόκκων

Μέτρηση κυττάρων ΕΝΥ

- ✓ Φυσιολογικά λευκοκύτταρα /μl+ΕΝΥ: 0-30 (νεογνά)
0-20 (παιδιά) 0- 10 (ενήλικες)
- ✓ Φυσιολογικά ερυθρά /μl ΕΝΥ: 0-10
- ✓ Εξετάζεται αυτούσιο ΕΝΥ - Καλή ανάδευση
- ✓ Σε πλάκα Neubauer
- αριθμός κυττάρων/μl=κύτταρα σε 1 μεγάλο τετράγωνο x 10



Καταμετρική
πλάκα Neubauer

Μέτρηση κυττάρων σε αιμορραγικό ΕΝΥ

✓ Αιμορραγικό ΕΝΥ

- Μέτρηση λευκοκυττάρων κατόπιν επεξεργασίας με οξεικό οξύ (υπολογισμός αραιώσης)
- Διόρθωση αριθμού λευκοκυττάρων:



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

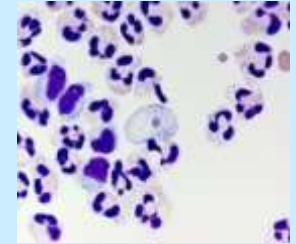
Αριθμός λευκών ΕΝΥ = μετρηθέντα λευκά - πρόσθετα λευκά
ή
αφαιρούμε 1 λευκό αιμοσφαίριο για κάθε 700 ερυθρά

Παρουσία αίματος στο ΕΝΥ

Στοιχεία	Τραυματικό αίμα	Υπαραχ αιμορ
Ξανθοχρωμία	όχι	ναί
Πήγμα	Πολύ πιθανό	όχι
Όψη	Αιματηρό το 1ο δείγμα	Αιματηρά όλα τα δείγματα
Μικροσκοπική μορφή	Συνήθως όχι οδοντωτά	Οδοντωτά ερυθρά

Καθορισμός τύπου κυττάρων

- ✓ Φυσιολογικός τύπος κυττάρων: λεμφοκύτταρα ή μονοπύρνα



Καθορισμός λευκοκυτταρικού τύπου

- Σε μεγάλο αριθμό λευκοκυττάρων/μl (αυτούσιο ENY)
 - Ξηρά χρώση (May Grünvald- Giemsa)
 - Έμβιος χρώση (toluidine/methylene/Nile blue)
- Σε μικρό αριθμό λευκοκυττάρων /μl
κυτταροφυγοκέντρηση (1200στρ 5-10')

Συνήθεις μεταβολές κυττάρων ΕΝΥ & τύπος κυττάρων

Μικροβιακή μηνιγγίτις	> 1000/μl ★	Πολυμορφοπύρρηνα >50 %
Ιογενής ή άσηπτος	< 500	Αρχικά πολυμορφοπύρρηνα & έπειτα λεμφοκύτταρα
Μηκυτιασική	αυξημένα	λεμφοκύτταρα
Φυματιώδης	10 - 1000	Αρχικά πολυμορφοπύρρηνα & έπειτα λεμφοκύτταρα

★ Χαμηλός αριθμός λευκ/τάρων δεν αποκλείει την μικροβιακή μηνιγγίτιδα (νεογνική μηνιγγίτις, μηνιγγιτιδοκοκκική μηνιγγίτις, λιστερίωση)

Βιοχημική εξέταση ΕΝΥ

- ✓ Γλυκόζη
- ✓ Λεύκωμα
- Χλωριούχα
- Γαλακτικό οξύ
- Γαλακτική δεϋδρογενάση

Η βιοχημική εξέταση του ΕΝΥ γίνεται από το υπερκείμενο φυγοκεντρηθέντος δείγματος

Βιοχημική εξέταση ΕΝΥ- Γλυκόζη (GL)

- ✓ Γλυκόζη (Φ.Τ.): 50-60 % της γλυκόζης αίματος
- Νεογνά: 34 -119 mg /dl
- Ενήλικες: 40 - 80 mg /dl

● Λίγο πριν την ΟΝΤΠ συνιστάται να μετράται η GL αίματος

Μέθοδος προσδιορισμού: Οξειδάσης της γλυκόζης

Βιοχημική εξέταση ENY- Γλυκόζη (GL)

- Σε οξεία μικροβ μηνιγ/δα η GL μειώνεται λόγω:
 - ✓ $\hat{\text{I}}$ κατανάλωσης από τα κύτταρα & τους μικροοργανισμούς που υπάρχουν στο ENY
 - ✓ και διάσπασης από τα γλυκολυτικά ένζυμα των κυττάρων
- Μειώνεται σε 50% των περιπτώσεων
- GL ENY/GL ορού < 0.4 σε 60 % των ασθενών με οξεία μικρ μηνιγ/δα

Ευαισθησία 60 %

Ειδικότητα 96%

Βιοχημική εξέταση ΕΝΥ- Λεύκωμα

- ✓ (Φ.Τ):Νεογνά: 15-170, Ενήλικες: 15-50 mg/dl
- 80 % προέρχεται από το πλάσμα, 20 % συντίθεται ΕΡ
- λιγότερο στις κοιλίες
- κυρίως λευκωματίνη

● Προσδιορισμός Λευκώματος

- ✓ Χρωματομετρικές (πυρογαλόλης)
- ✓ Θολομετρικές μέθοδοι (θειοσουλφοσαλικιλικού οξέος)

- ✓ Διόρθωση τιμής λευκώματος σε αιμορραγικό ΕΝΥ
- Αφαίρεση 1 mg/dl λευκώματος για κάθε 1000 ερυθρά/μl

Βιοχημική εξέταση ΕΝΥ- Λεύκωμα

- Σε μικροβιακή μηνιγγίτιδα: συνήθως >150 mg/dl
- Μπορεί να είναι φυσιολογικό
 - στα αρχικά στάδια μικροβιακής μηνιγγίτιδας
 - σε 10 % των ασθενών με μικροβιακή >>
 - σε 20 % >> >> με μηνιγγιτιδοκοκκική >>
- *Μικρότερη ειδικότητα*

Διαφοροδιαγνωστική προσέγγιση μηνιγγίτιδας από ανάλυση ΕΝΥ

	Λευκά	Γλυκόζη	Πρωτεΐνη
Φυσιολογικά	<10 (70% ΛΕΜΦ)	GI ΕΝΥ/Glorού: <0.6	20 - 50 mg/dl
Μικροβιακή μηνιγγίτις	↑↑↑ (ΠΛΜ υπερτερούν)	GI ΕΝΥ/ Glorού: <0.4 ↓↓↓	↑↑↑ Αυξημένο
Άσηπτος μηνιγγίτις	↑ (αρχικά ΠΛΜ, αργότερα ΛΕΜΦ)	Φυσιολογ έως λίγο χαμηλή ↓	φυσιολογική ή ελαφρά ↑
Φυματιώδης μηνιγγίτις	↑ (αρχικά ΠΛΜ, αργότερα ΛΕΜΦ)	Χαμηλή (<50 mg/dl) ↓↓	↑↑ Αυξημένη (>100 mg/dl)

Ευρήματα ΕΝΥ σε νεογνά και παιδιά

	Φυσιολογικό παιδί	Φυσιολογικό νεογνό	Μικροβιακή μηνιγγίτις	Ιογενής
Λευκοκύτταρα/μl	0-10	0-30	>1000	100 -500
ΠΛΜ (%)	0	2-3	80 -95	<40
Γλυκόζη (mg/dl)	40 -50 ΕΝΥ/ορός:0.6	32-121	<40 ΕΝΥ/ορός:<0.4	30 -70
Πρωτεΐνη (mg/dl)	20 -30	19-149	>100	50-100

Ευρήματα ΕΝΥ σε νεογνά και παιδιά

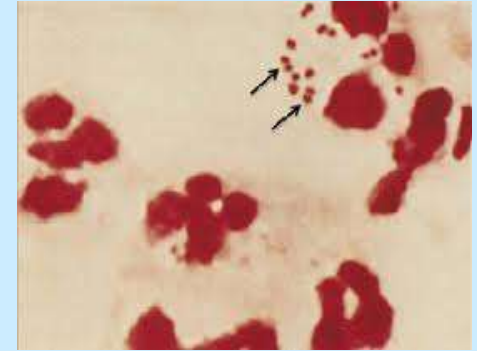
	Φυσιολογικό παιδί	Φυσιολογικό νεογνό	Μικροβιακή μηνιγγίτις	Ιογενής
Λευκοκύτταρα/μl	0-10	0-30	>1000	100 -500
ΠΛΜ (%)	0	2-3	80 -95	<40
Γλυκόζη (mg/dl)	40 -50 ΕΝΥ/ορός:0.6	32-121	<40 ΕΝΥ/ορός:<0.4	30 -70
Πρωτεΐνη (mg/dl)	20 -30	19-149	>100	50-100

ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΕΞΕΤΑΣΗ ΕΝΥ

- ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΚΗ (άμεσο)
- ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ
- ΑΝΑΖΗΤΗΣΗ ΜΙΚΡ/ΚΩΝ ΑΝΤΙΓΟΝΩΝ

Άμεσο παρασκεύασμα ΕΝΥ

● Γίνεται σε όλα τα δείγματα ΕΝΥ



✓ Χρωματισμένο παρασκεύασμα

* Χρώση κατά Gram

* κατά Ziehl - Nielsen ή Kinyoun

* Αρνητική χρώση (india ink)

* Φθορίζουσα χρώση (από 10^4)

✓ Νωπό παρασκεύασμα (για παράσιτα)

Άμεσο παρασκεύασμα ΕΝΥ (κατά Gram χρώση)

- Ταχεία και φθνή εξέταση
- Θετική σε 60 - 90 % των μηνιγγιτίδων γενικά
- Αν έχει προηγηθεί χορήγηση αντιβιοτικού
Ευαισθησία: 40 - 60 %
- Η ευαισθησία της χρώσης κατά Gram εξαρτάται:
 - ✓ από τη συγκέντρωση των μικροβίων στο ΕΝΥ
- Ευαισθησία όταν $K \leq 10^3$ 25%, ενώ όταν $\geq 10^5$ 97 %
- ✓ από το είδος του μικροοργανισμού

Ευαισθησία άμεσου ΕΝΥ (Gram) ανάλογα του μικροοργανισμού

❖ Πνευμονιοκοκκική μηνιγγίτις 90 %



❖ Μηνιγγίτις από *H. influenzae type b* 85 %



❖ Μηνιγγιτιδοκοκκική μηνιγγίτις 75 %



❖ Μηνιγγίτις από *L. monocytogenes* 50 %

❖ Μηνιγγίτις από Gram (-) βακτηρίδια 30 - 50 %



❖ Μυκητιασική μηνιγγίτις 20 - 70 %



Τεχνική άμεσου παρασκευάσματος ΕΝΥ για Gram

- **Κυτταροφυγοκέντρηση** (1200 στροφές 5 -10')
- **Εναλλακτικά φυγοκέντρηση**
✓ τεχνική παχείας σταγόνας
- **Ιδιαίτερη φροντίδα**
 - ✓ επιμελής ανασύσταση του ιζήματος
 - ✓ καθαρό πλακάκι
 - ✓ φυσικό στέγνωμα
 - ✓ μονιμοποίηση με μεθανόλη



Αν υπάρχει πήγμα ινικής → ομογενοποίηση & άμεσο

ΚΥΤΤΑΡΟΦΥΓΟΚΕΝΤΡΟΣ

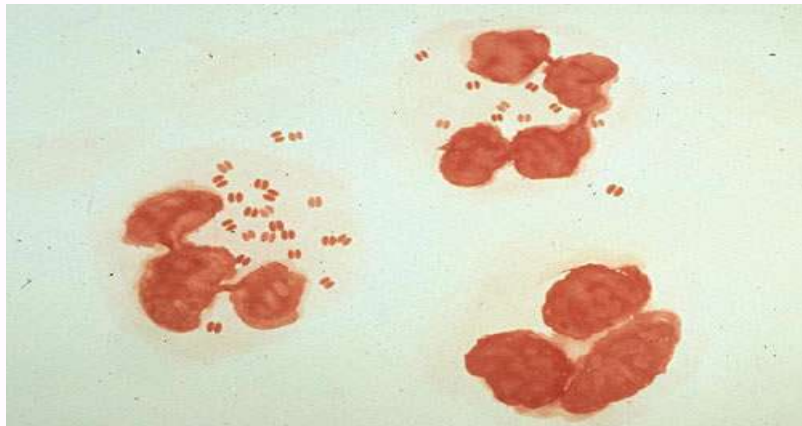


Όργανο που επιτρέπει τη συγκέντρωση & εναπόθεση των κυττάρων που βρίσκονται στο ΕΝΥ, σε μια περιορισμένη περιοχή μιας αντικειμενοφόρου πλάκας

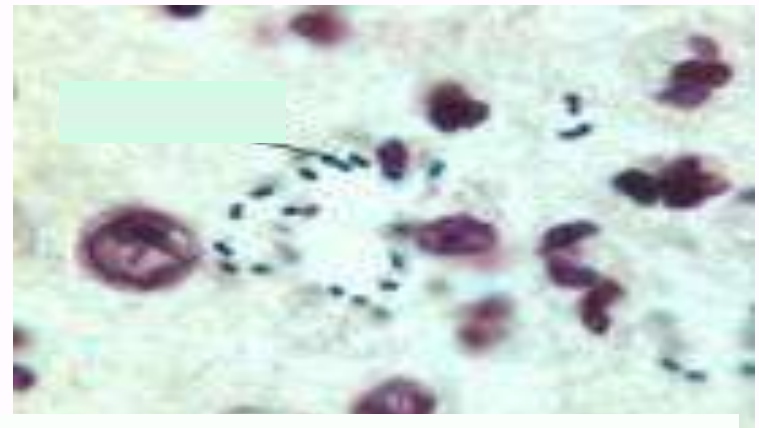
Η κυτταροφυγοκέντρηση αυξάνει x 100 φορές την ευαισθησία

Άμεσο παρασκεύασμα - Gram χρώση

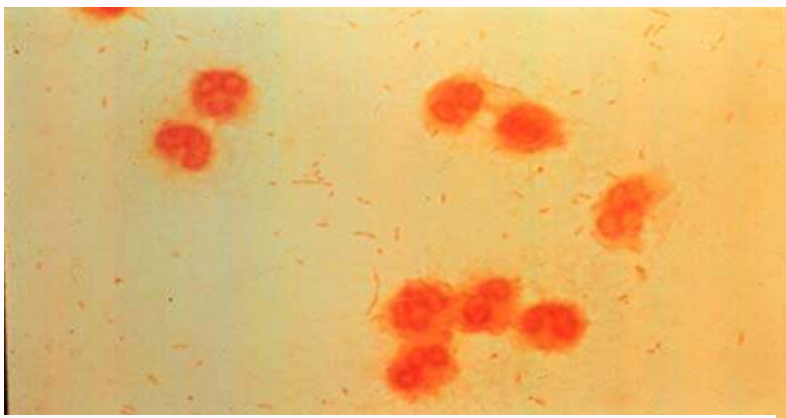
ΑΜΕΣΗ & ΥΠΕΥΘΥΝΗ ΕΝΗΜΕΡΩΣΗ ΤΗΣ ΚΛΙΝΙΚΗΣ



Gram (-) διπλόκοκκοι



Gram (+) διπλόκοκκοι



Gram (-) κοκκοβακτηρίδια



Gram (+) βακτηρίδια

Καλλιέργεια ΕΝΥ

- Αν ο όγκος δείγματος είναι $> 0.5 \text{ ml}$ \rightarrow συμπύκνωση
- ✓ Φυγοκέντρηση ΕΝΥ $1500g \times 15'$
- Αν ο όγκος δείγματος είναι $\leq 0.5 \text{ ml}$
- ✓ δεν χρειάζεται φυγοκέντρηση
- Αν το δείγμα είναι ελάχιστο
- ✓ προσθέτουμε 0.5 ml ζωμό μέσα στο σωληνάριο

Τεχνική καλλιέργειας ΕΝΥ

- Ανασύσταση του ιζήματος σε όγκο 0.5ml
 - Προσεκτική «αποκόλληση» από τα τοιχώματα
 - Εμβολιασμός στα τρυβλία από 1-2 σταγόνες
 - Άπλωμα αφού στεγνώσει η σταγόνα
-
- ✓ Σοκολατόχρωμο άγαρ
 - ✓ Αιματούχο άγαρ
- } 4 -7 ημέρες, 35⁰-37⁰,
5 % CO₂, καθημερινή επισκόπηση
- ✓ Κατά περίπτωση:
 - ✓ Θρεπτικός ζωμός (BHI ή TSB)
 - ✓ Ζωμός Sabouraud (εξετάζεται καθημερινά για 4 -7 ημέρες)
 - ❖ Εάν υπάρχει πήγμα ινικής → ομογενοποίηση και να περιλαμβάνεται στο inoculum

Αξιολόγηση καλλιέργειας ΕΝΥ

Συνήθη μικροβιακά αίτια οξείας μηνιγγίτιδας κατά ηλικία

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

Καλλιέργεια ΕΝΥ: Ευαισθησία: 75 - 85 % Ειδικότητα: 100 %
Αν έχει προηγηθεί χορήγηση αντιβιοτικού Ευαισθησία: < 50 %

Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase chain reaction) (PCR)

Μεθοδολογία Multiplex PCR

(N.meningitis, S.pneumoniae, H.influenzae)

- όπου αντενδείκνυται να γίνει ΟΝΠ
- μέθοδος εκλογής για μικρόβια που είναι δύσκολο να καλλιεργηθούν

Αξιολόγηση της μεθόδου Multiplex PCR σε 425 κλινικά δείγματα (ΕΣΔΥ)

Μικροοργαν	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

ΑΠΑ= αρνητική προγνωστική αξία ΘΠΑ= θετική προγνωστική αξία

Αξιολόγηση άμεσου (Gram), καλλιέργειας & PCR (για *Nm* και *S.pneumo*) σε 37 ασθενείς με επιβεβαιωμένη διάγνωση

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

Αξιολόγηση άμεσου (Gram), καλλιέργειας & PCR (για *Nm* και *S. pneumoniae*) σε 37 ασθενείς με επιβεβαιωμένη διάγνωση

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

Αξιολόγηση άμεσου (Gram), καλλιέργειας & PCR (για *Nm* και *S.pneumo*) σε 37 ασθενείς με επιβεβαιωμένη διάγνωση

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

Αξιολόγηση άμεσου (Gram), καλλιέργειας & PCR (για *Nm* και *S. pneumoniae*) σε 37 ασθενείς με επιβεβαιωμένη διάγνωση

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

Αξιολόγηση άμεσου (Gram), καλλιέργειας & PCR (για *Nm* και *S. pneumoniae*) σε 37 ασθενείς με επιβεβαιωμένη διάγνωση

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

Καλλιέργεια για *M. tuberculosis*

- Σε οξεία μηνιγγίτιδα ζητούνται σπάνια καλλιέργειες για οξεάντοχα
- Ελάχιστος όγκος δείγματος 2 ml
- Ευαισθησία καλλιέργειας: 30% (επί ογκου=10 ml)
- >> άμεσου : (Ziehl - Nielsen) 15 - 25 %
- Συνιστώμενη μέθοδος : PCR (ευαισθ : 100 %)

Μυκητιασικές μηνιγγίτιδες

- *Cryptococcus neoformans* ENY 98%
- Ευαισθησία κρυπτοκοκκικού Ag: { αίμα 100 %
- >> άμεσου (india ink): 50 - 75%
- σε ασθενείς με AIDS & κρυπτοκοκκική μηνιγγίτιδα: 88 %



- *Coccidioides immitis* Ευαισθησία καλλιέργειας ENY: 30%
- Ορολογικές: Ευαισθησία: 100 %
- *Histoplasma capsulatum* (καλλιέργεια αίματος/μυελού)

Ταυτοποίηση & αντιβιογράμμα

- Σε θετική καλλιέργεια: Gram χρώση και ανάλογα **ΤΑΥ-ΤΟΠΟΪΗΣΗ** με τις συμβατικές μεθόδους του Εργαστηρίου
- **Καθορισμός οροτύπου ή ορομάδος** για *H. influenzae* και *N. meningitis* αντίστοιχα
- **Αντιβιογράμμα** (σύμφωνα με CLSI) όταν αναπτυχθεί:
 - *S. pneumoniae*
 - *S. aureus* ή άλλοι σταφυλόκοκκοι
 - Εντεροβακτηριακό
 - Αζυμωτικό Gram (-) βακτηρίδιο
 - Εντερόκοκκος

Αντιβιογράμμα για *H. influenzae*, *Listeria*, *S. agalactiae* και *N. meningitidis*

- *H. Influenzae*: β - λακταμάση
- εάν είναι αρνητική → προσδιορισμός MIC penicilline ή ampicillin
- MIC στα αντιβιοτικά που χρησιμοποιούνται για την θεραπεία

- *Listeria*, *S. agalactiae* και *N. meningitidis*:
- προσδιορισμός MIC penicillin
- εάν βρεθεί μη ευαίσθητο στέλεχος, έλεγχος σε εργαστήριο αναφοράς

Απάντηση - Ενημέρωση κλινικής

Γενική εξέταση ΕΝΥ

φυσικοί χαρακτήρες
αριθμός λευκοκυττάρων/μl
αριθμός ευθροκυττάρων/μl
γλυκόζη
Λεύκωμα

Καλλιέργεια ΕΝΥ

Καμμία ανάπτυξη μικροοργανισμών ή το είδος που αναπτύχθηκε

Αντιβιογράμμα



Τιμή πανικού !!
(εντός 1 h)

Η επικοινωνία καθώς και η προκαταρκτική και τελική ενημέρωση της κλινικής αποτελούν εξαιρετικής σπουδαιότητας εργασία η οποία πρέπει να γίνεται άμεσα και υπεύθυνα

Μέθοδοι ανίχνευσης μικροβιακών αντιγόνων

Ανίχνευση μικροβιακών αντιγόνων στο ΕΝΥ

- ✓ Latex
- ✓ Επισυγκόληση σταφυλοκόκκου
- ✓ Ανάστροφη ανοσοηλεκτοφόρηση

Ευαισθησία μεθόδων ανίχνευσης μικροβιακών Ag

Μέθοδος	<i>H.influen- zae type b</i>	<i>S. pneu- moniae</i>	<i>Streptococ group B</i>	<i>N. meningitidis</i>
Επισυγκόλληση σταφυλ	85 (66-100)	76 (59 – 93)	72 (61.5 – 87)	67 (50 – 78)
Latex Bactigen Directigen Wellcogen	88.3 (82-94)	87.3 (81-100)	88 (73 -100)	61.7 (55-74)

Ανίχνευση μικροβιακών αντιγόνων

Δεν συνιστάται σε ρουτίνα

Γίνεται κατόπιν συνεννόησης με την κλινική σε περιπτώσεις όπως:

- ✓ Ασθενείς με ανοσοκαταστολή
- ✓ Προηγούμενη χορήγηση αντιβιοτικού
- ✓ Αυξημένος αριθμός λευκών & αρνητική Gram
 - Ευαισθησία γενικά 33%

Άλλες παράμετροι για τη διάγνωση μικροβιακής μηνιγγίτιδας

- Γαλακτικό οξύ (> 4.2 mmol/l: μικρ μηνιγ), (<3 mmol/l : ιογ μηνιγ)
- LDH [LD4, LD5]: μικροβ μην), [LD1, LD2]: ιογεν μην)
- TNFα, Ιντερλευκίνη 1β , 2 & 6
- Προκαλσιτονίνη ορού (ευαισθησία & ειδικότητα 100%)
- CRP ENY ή ορού (ευαισθησία 96 % ειδικότητα 93 %, ΑΠΑ 99%)
- Αέριος υγρή χρωματογραφία ENY
- Limulus test ENY
- sTREM-1
- Μοριακές τεχνικές (PCR,, MLST, MLVA)



● Μικροβιολογική εξέταση ΕΝΥ
και απομόνωση του παθογόνου
μικροοργανισμού

"Gold Standard"

Πολύ μεγάλη διαγνωστική αξία για την
έγκαιρη και σωστή αντιμετώπιση του
ασθενή