

ΘΑ ΧΟΡΗΓΗΣΟΥΝ  
ΜΟΡΙΑ  
ΣΥΝΕΧΙΖΟΜΕΝΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ  
ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗΣ  
(C.M.E. CREDITS)



Υποβολή Περιλήψεων μέχρι

Παρασκευή 12 Ιανουαρίου 2007



ΕΤΗΣΙΟ **33<sup>ο</sup>**  
**Πανελλήνιο Ιατρικό**  
ΣΥΝΕΔΡΙΟ

ΑΘΗΝΑ - ΜΑΪΟΣ 2007

ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ: ΙΑΤΡΙΚΗ ΕΤΑΙΡΕΙΑ ΑΘΗΝΩΝ, Μαγνήσιου 23, 115 28 ΑΘΗΝΑ  
ΤΗΛ: 210 7211845, FAX: 210 7215082, E-mail: [iea@mednet.gr](mailto:iea@mednet.gr), <http://www.mednet.gr>

ΔΙΜΗΝΙΑΙΑ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΗ ΕΚΔΟΣΗ



ΔΙΟΙΚΗΤΙΚΟ ΣΥΜΒΟΥΛΙΟ  
ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ  
ΕΤΑΙΡΕΙΑΣ  
ΓΙΑ ΤΗ ΔΙΕΤΙΑ 2005-2007

Πρόεδρος: Ε. Παπαφράγκας  
Αντιπρόεδρος: Ε. Μαλάμου-Λαδά  
Γενικός Γραμματέας: Α. Πάγκαλη  
Ειδικός Γραμματέας: Γ. Κατσάνης  
Ταμίας: Χ. Κούτσια  
Σύμβουλοι: Κ. Τζανέτου  
Α. Τσακρής

ΓΡΑΜΜΑΤΕΙΑ ΕΤΑΙΡΕΙΑΣ  
“ASCENT”, Βασ. Σοφίας 77, 115 21 Αθήνα  
Τηλ.: 210-72.47.906, Fax: 210-7246180

[www.hms.org.gr](http://www.hms.org.gr)

ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΕΚΔΟΣΗΣ

Δ. Αδρακτά	Α. Κωστούλα
Σ. Αλεξίου	Α. Κωτσοβίλη
Ε. Αναστασίου	Σ. Λεβειδιώτου
Α. Αρσένη	Ν.Ι. Λεγάκης
Γ. Αρσένης	Ε. Μαλάμου
Α. Αυλάμη	Α. Μανιάτης
Ν. Βαδάτσι	Γ. Μαργαρίτη
Ν. Βακάλης	Α. Μεντής
Μ. Βάρλα	Κ. Μοίρας
Α. Βατόπουλος	Α. Μπεθιμούτη
Ε. Βογιατζάκης	Ε. Μπουσινάκου
Π. Γολεμάτη	Α. Πάγκαλη
Β. Δαλαΐνα	Ο. Πανάρα
Β. Δανηλίδης	Ε. Παπαφράγκας
Γ. Δημητράκοπουλος	Χ. Παλαστεριάδη
Ζ. Ζουλιέν	Ε. Παππά
Ε. Καδά	Ε. Παρασκάκη
Β. Καλαποθάκη	Β. Πετροχείλου
Α. Κανσουζίδου	Α. Ρουμειώτου
Σ. Καρτάλη	Α. Σταυροπούλου
Μ. Κατελανή	Χ. Τσάνταλη
Γ. Κατσάνης	Ι. Τσελέντης
Β. Κοκκίνου	Σ. Τζανετής
Χ. Κοντού	Κ. Τζανέτου
Υ. Κουμαντάκη	Α. Τσακρής
Γ. Κουπάρη	Μ. Φουσοπούλου
Ε. Κουσκούνη	Ι. Φραγκάκη
Χ. Κούτσια	Ε. Φραγκούλη
Τ. Κρεμαστινού	

ΔΙΕΥΘΥΝΤΕΣ ΣΥΝΤΑΞΗΣ  
Γ. ΚΑΤΣΑΝΗΣ, Κ. ΤΖΑΝΕΤΟΥ

ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΗ ΑΛΛΗΛΟΓΡΑΦΙΑ ΠΕΡΙΟΔΙΚΟΥ: “ΔΕΛΤΙΟΝ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΕΤΑΙΡΕΙΑΣ”  
“ASCENT”, Βασ. Σοφίας 77, 115 21 Αθήνα, Τηλ.: 210-72.47.906, Fax: 210-7246180

ΕΤΗΣΙΑ ΣΥΝΔΡΟΜΗ ΕΣΩΤΕΡΙΚΟΥ: 30,00 Ευρώ. Οι συνδρομές αποστέλλονται με ταχυδρομική επιταγή στη διεύθυνση:  
“ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΕΤΑΙΡΕΙΑ”, ASCENT Χ. ΚΟΥΤΣΙΑ, ΒΑΣ. ΣΟΦΙΑΣ 77, 11521 ΑΘΗΝΑ

ΕΚΔΟΤΕΣ: Γ. ΚΑΤΣΑΝΗΣ, Κ. ΤΖΑΝΕΤΟΥ

ΔΙΑΦΗΜΙΣΕΙΣ: Π. ΓΕΩΡΓΑΚΑΚΟΣ, ΤΥΡΙΝΘΟΥ 30, 165 61 ΑΝΩ ΓΛΥΦΑΔΑ, ΤΗΛ.: 210 9646750-210 9618193,  
FAX: 210 9640163.

ΣΥΝΔΡΟΜΕΣ: Εταιρειών (90,00 Ευρώ), Εξωτερικού (150 US\$) και Κύριου (45 Ευρώ) αποστέλλονται με ταχυδρομική επιταγή  
στη διεύθυνση: Π. ΓΕΩΡΓΑΚΑΚΟΣ, Τυρίνθου 30, 165 61 Α. Γλυφάδα

ΕΚΤΥΠΩΣΗ: “ΤΕΧΝΟΓΡΑΜΜΑ” - ΤΗΛ.: 210 60.00.643, FAX: 210 6002295, e-mail: [techn@hol.gr](mailto:techn@hol.gr)

ISSN 0438-9573

Ι Δ Ι Ο Κ Τ Η Τ Η Σ Π Ε Ρ Ι Ο Δ Ι Κ Ο Υ : Ε Λ Λ Η Ν Ι Κ Η Μ Ι Κ Ρ Ο Β Ι Ο Λ Ο Γ Ι Κ Η Ε Τ Α Ι Ρ Ε Ι Α



**BOARD OF THE  
GREEK SOCIETY OF  
MICROBIOLOGY  
FOR THE YEARS 2005-2007**

*President:* E. Papafrangas  
*Vice President:* E. Malamou-Lada  
*Secretary General:* A. Pagali  
*Secretary:* G. Katsanis  
*Treasurer:* C. Koutsia  
*Members:* K. Tzanetou  
A. Tsakris

**SOCIETY SECRETARIAT**  
"ASCENT", 77 Vas. Sofias Ave,  
GR-115 21 Athens, Greece  
Tel.: +30210-72.47.906,  
Fax: +30210-7246180

[www.hms.org.gr](http://www.hms.org.gr)

**ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΕΚΔΟΣΗΣ**

D. Adracta	E. Kouskouni
S. Alexiou	C. Koutsia
E. Anastassiou	T. Kremastinou
A. Antoniadis	N. Legakis
A. Arseni	S. Levidiotou
G. Arsenis	E. Malamou
A. Avlami	A. Maniatis
A. Bethimouti	G. Margariti
E. Bossinakou	A. Mentis
V. Dalaina	C. Miras
V. Danielides	A. Pagali
G. Dimitrakopoulos	O. Paniara
M. Foustoukou	E. Papafrangas
E. Fragouli	C. Papasteriadi
J. Frangaki	E. Pappa
P. Golemati	V. Petrochilou
G. Joullien	A. Roumeliotou
E. Kada	A. Stavropoulou
V. Kalapothaki	A. Tsakris
A. Kansouzidou	C. Tsantali
S. Kartali	J. Tselentis
M. Katelani	S. Tzanetis
G. Katsanis	K. Tzanetou
V. Kokkinou	N. Vakalis
C. Kontou	M. Varla
A. Kostoula	A. Vatopoulos
A. Kotsovili	N. Vavatsi
Y. Koumantaki	E. Vogiatzakis
G. Koupari	

**EDITORS**

G. KATSANIS, K. TZANETOU

**MAILING ADDRESS OF JOURNAL:** "ACTA MICROBIOLOGICA HELLENICA"  
G. KATSANIS, K. TZANETOU, "ASCENT", 77 VAS. SOFIAS AVE, GR-115 21 ATHENS, GREECE,  
TEL.: +30210 7247906, Fax: +30210 7246180

**ANNUAL SUBSCRIPTIONS:** ABROAD 150 USD, CYPRUS 30 CY  
P. GEORGAKAKOS, 30 TYRINTHOU Str., GR-165 61 A. GLYFADA, GREECE.  
TEL.: +30210 9646750-9618193, FAX: +30210 9640163

ISSN 0438-9573

INTERNET: <http://www.mednet.gr/iatrotek>  
<http://www/iatriki.gr>

ACTA  
MICROBIOLOGICA  
HELLENICA

BIMONTHLY JOURNAL  
OF THE  
GREEK SOCIETY OF  
MICROBIOLOGY



Contents

ORIGINAL PAPERS

<i>D. PAPAVENTSIS, N. SIAFAKAS, P. MARKOULATOS, V. SOPIDOU, C. ECONOMOU, S. LEVIDIOTOU - STEFANOY: Environmental surveillance of enteroviruses circulation - effects in public health .....</i>	22
<i>M. CHORIANOPOULOU, M. KANELLOPOULOU, S. CHATZOPOULOU, G.L. DAIKOS, S. LABROPOULOS, N.I. LEGAKIS: Environment colonization of a newly established intensive care unit .....</i>	36
<i>P. KARKALOUSOS, D. VOURTSIS, L. TSOUKALAS, M. ANTONIOU: Comparison of quality control requirements of four biochemical analyzers with the use of OPSpecs diagrams and the critical systematic errors .....</i>	42
<i>M. CHORIANOPOULOU, A. TSELENI-KOTSOVILI, P. TASIOS, E. PAPAFRAGAS, S. LABROPOULOS, N.I. LEGAKIS: Incidence of appearance of infections in a newly established internal care unit .....</i>	54
<b>BOOK REVIEW .....</b>	58
<b>INSTRUCTIONS TO AUTHORS .....</b>	59

VOLUME  
51  
NUMBER  
1  
JANUARY  
FEBRUARY  
2006

ΔΕΛΤΙΟΝ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ  
ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ  
ΕΤΑΙΡΕΙΑΣ

ΔΙΜΗΝΙΑΙΑ  
ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΗ  
ΕΚΔΟΣΗ



Περιεχόμενα

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΕΣ ΕΡΓΑΣΙΕΣ

<i>Δ. ΠΑΠΑΒΕΝΤΣΗΣ, Ν. ΣΙΑΦΑΚΑΣ, Π. ΜΑΡΚΟΥΛΑΤΟΣ, Β. ΣΟΠΙΔΟΥ, Κ. ΟΙΚΟΝΟΜΟΥ, Σ. ΛΕΒΕΙΔΙΩΤΟΥ-ΣΤΕΦΑΝΟΥ: Περιβαλλοντική παρακολούθηση της κυκλοφορίας των εντεροϊών – Επιπτώσεις στη Δημόσια Υγεία</i> .....	22
<i>Μ. ΧΩΡΙΑΝΟΠΟΥΛΟΥ, Μ. ΚΑΝΕΛΛΟΠΟΥΛΟΥ, Σ. ΧΑΤΖΟΠΟΥΛΟΥ, Γ.Α. ΔΑΙΚΟΣ, Σ. ΛΑΜΠΡΟΠΟΥΛΟΣ, Ν.Ι. ΛΕΓΑΚΗΣ: Αποικισμός του περιβάλλοντος σε νεοϊδρυθείσα μονάδα εντατικής θεραπείας</i> .....	36
<i>Π. ΚΑΡΚΑΛΟΥΣΟΣ, Δ. ΒΟΥΡΤΣΗΣ, Α. ΤΣΟΥΚΑΛΑΣ, Μ. ΑΝΤΩΝΙΟΥ: Σύγκριση των απαιτήσεων ποιότητας τεσσάρων διοχημικών αναλυτών με τη χρήση διαγραμμάτων OPSpecs και του ανώτερου επιτρεπτού συστηματικού σφάλματος</i> .....	42
<i>Μ. ΧΩΡΙΑΝΟΠΟΥΛΟΥ, Α. ΤΣΕΛΕΝΗ-ΚΩΤΣΟΒΙΛΗ, Π. ΤΑΣΙΟΣ, Ε. ΠΑΠΑΦΡΑΓΚΑΣ, Σ. ΛΑΜΠΡΟΠΟΥΛΟΣ, Ν.Ι. ΛΕΓΑΚΗΣ: Συχνότητα εμφάνισης λοιμώξεων σε νεοϊδρυθείσα μονάδα εντατικής θεραπείας</i> .....	54
<b>ΒΙΒΛΙΟΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ</b> .....	58
<b>ΟΔΗΓΙΕΣ ΓΙΑ ΤΟΥΣ ΣΥΓΓΡΑΦΕΙΣ</b> .....	59

ΤΟΜΟΣ  
51  
ΤΕΥΧΟΣ  
1  
ΙΑΝΟΥΑΡΙΟΣ  
ΦΕΒΡΟΥΑΡΙΟΣ  
2006

## Περιβαλλοντική παρακολούθηση της κυκλοφορίας των εντεροϊών – Επιπτώσεις στη Δημόσια Υγεία

Δ. Παπαβέντσης,<sup>1,2,3</sup> Ν. Σιαφάκας,<sup>1</sup> Π. Μαρκουλάτος,<sup>1</sup> Β. Σοπίδου,<sup>2</sup> Κ. Οικονόμου,<sup>2</sup> Σ. Λεβειδιώτου-Στεφάνου<sup>3</sup>

Παρουσιάζουμε μια νέα προσέγγιση για την ταυτοποίηση εντεροϊών στο περιβάλλον. Υλικό της μελέτης μας ήταν δείγματα μη επεξεργασμένων αστικών λυμάτων. Οι ιοί προσροφήθηκαν σε μεμβράνες νιτρικής κυτταρίνης, απομονώθηκαν με μια νέα τεχνική (VIRADEN) και ταυτοποιήθηκαν με Ανάστροφη Μεταγραφή-Αλυσιδωτή Αντίδραση της Πολυμεράσης (RT-PCR), με ανάλυση πολυμορφισμού (RFLP) και προσδιορισμό της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας (sequencing) τμήματος της VP1 γενωμικής περιοχής. Μελετήσαμε 42 στελέχη εντεροϊών. Η αρχική γενετική ταξινόμηση με τη χρήση της περιοριστικής ενδονουκλεάσης HpaII, έδειξε ότι όλοι οι ιοί ανήκαν στην ίδια γενετική υποομάδα non-rolio εντεροϊών. Ο προσδιορισμός των αντίστοιχων οροτύπων μετά την ανάγνωση των γενετικών αλληλουχιών απέδειξε ως επικρατέστερο ορότυπο τον ιό Coxsackie B4 (33 στελέχη, 79%). Οκτώ στελέχη (19%) ταυτοποιήθηκαν ως ιοί Coxsackie B1, ενώ ένα στέλεχος αναγνωρίστηκε ως ιός Echovirus 7 (2%). Παρατηρήθηκε ότι στελέχη του ίδιου οροτύπου παρουσίαζαν μεγάλη ομοιότητα βάσεων στην VP1 περιοχή. Η φυλογενετική ανάλυση αποκάλυψε ότι τα απομονωθέντα στελέχη, παρουσιάζουν εξελικτική συγγένεια με στελέχη που έχουν απομονωθεί στην Ευρώπη, στη Βόρειο Αφρική και στη Μέση Ανατολή, υποδεικνύοντας πιθανή επιδημιολογική συσχέτιση. Συμπερασματικά, η τεχνική που αναπτύχθηκε αποτελεί μία πολλά υποσχόμενη προσέγγιση για την περιβαλλοντική επιτήρηση της κυκλοφορίας των εντεροϊών και μπορεί να συμβάλλει στην προστασία της Δημόσιας Υγείας. Η RFLP ανάλυση με την HpaII είναι αποτελεσματική για την αρχική κατάταξη σε γενετικές υποομάδες, ενώ η τεχνική που περιλαμβάνει sequencing τμήματος της VP1 είναι κατάλληλη για τον προσδιορισμό του οροτύπου.

ΔΕΛΤΙΟΝ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΕΤΑΙΡΕΙΑΣ 2006, 51 (1): 22-35

Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Λάρισα,<sup>1</sup> Τμήμα Βασικών Ιατρικών Μαθημάτων, Σ.Ε.Υ.Π., Τ.Ε.Ι. Αθήνας, Αιγάλεω,<sup>2</sup> Τμήμα Μικροβιολογίας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Ιωάννινα<sup>3</sup>

Η παρούσα ερευνητική εργασία παρουσιάστηκε ως Ελεύθερη Ανακοίνωση στα πλαίσια του 2ου Εθνικού Συνεδρίου Κλινικής Μικροβιολογίας - 8ου Πανελληνίου Συνεδρίου Νοσοκομειακών Λοιμώξεων & Υγιεινής, Αθήνα 24-26/2/2005

## Εισαγωγή

Οι εντεροϊοί είναι οι συχνότερα ανιχνευόμενοι ιοί στο περιβάλλον. Κατά προσέγγιση, 140 ιοί είναι δυνατό να απομονωθούν στο νερό και στα αστικά λύματα.<sup>1</sup> Το γένος των εντεροϊών, το οποίο είναι το σημαντικότερο της οικογένειας των Picornaviridae από την άποψη της παθογένειας στον άνθρωπο,<sup>2,3</sup> περιλαμβάνει 65 ανοσολογικά διακριτούς οροτύπους, που κατατάσσονται σε 5 γενετικές υποομάδες (Human Enterovirus Species A-D και Poliovirus).<sup>4</sup> Αποτελούνται από τους πολιοϊούς (PV, 3 ορότυποι), Coxsackie A ιούς (CAV, 23 ορότυποι), Coxsackie B ιούς (CBV, 6 ορότυποι), Echo ιούς (ECV, 28 ορότυποι) και τους εντεροϊούς (ENV) 68-71 και 73. Οι κλινικές εκδηλώσεις και οι νόσοι που προκαλούνται από τους εντεροϊούς ποικίλλουν σημαντικά από την ασυμπτωματική λοίμωξη και το κοινό κρυολόγημα, έως θανατηφόρες περιπτώσεις μηνιγγίτιδας, εγκεφαλίτιδας και πολιομυελίτιδας. Η λοίμωξη του κεντρικού νευρικού συστήματος (ΚΝΣ) είναι συχνή και προκαλείται από πολλούς διακριτούς οροτύπους. Η άσηπτη μηνιγγίτιδα είναι η συχνότερα αναφερόμενη εκδήλωση.<sup>2</sup> Άλλες λιγότερο συχνές εκδηλώσεις από το ΚΝΣ περιλαμβάνουν την εγκεφαλίτιδα, το σύνδρομο Guillain-Barré, την παράλυση και την αταξία.<sup>2</sup> Εξίσου σημαντικές είναι οι λοιμώξεις του μυοκαρδίου, από τη στιγμή μάλιστα που οι εντεροϊοί αποτελούν τη συχνότερη αιτία οξείας μυοκαρδίτιδας και εμπλέκονται επίσης στην παθογένεια της διατακτικής καρδιομυοπάθειας (ειδικά οι ορότυποι CBV 1-5), η οποία αποτελεί και τη συχνότερη νόσο της καρδιάς που απαιτεί μεταμόσχευση.

Οι εντεροϊοί εισέρχονται στον ανθρώπινο οργανισμό με την κοπρανοστοματική οδό, πολλαπλασιάζονται στο γαστρεντερικό σύστημα, και τελικά απορρίπτονται στο περιβάλλον με τα κόπρανα. Παρόλο που ανευρίσκονται σε νερά που έχουν μολυνθεί από λύματα, η υδατογενής μετάδοση των εντεροϊών, έχει επιβεβαιωθεί περιστασιακά, λόγω του ότι οι λοιμώξεις που μεταδίδονται υδατογενώς είναι στην πλειοψηφία τους υποκλινικές.<sup>1</sup>

Προγράμματα περιβαλλοντικής επιτήρησης έχουν χρησιμοποιηθεί με επιτυχία στο παρελθόν για την παρακολούθηση και καταγραφή της κυ-

κλοφορίας των ιών του γαστρεντερικού συστήματος στο γενικό πληθυσμό. Η περιβαλλοντική επιτήρηση μπορεί να συμβάλλει στον εντοπισμό της εστίας, στην εκτίμηση της έκτασης και διάρκειας της επιδημικής κυκλοφορίας των πολιοϊών, στη συσχέτιση στελεχών / οροτύπων με την κλινική εικόνα και είναι σε θέση να οδηγήσει σε ασφαλή συμπεράσματα για τους τρόπους μετάδοσης και βιολογικής εξέλιξης των εντεροϊών. Οι μέθοδοι που έχουν χρησιμοποιηθεί έως τώρα για την ανίχνευση στα επεξεργασμένα και μη επεξεργασμένα λύματα παρουσιάζουν σημαντικούς περιορισμούς, κυρίως λόγω της φύσης του δείγματος που εξετάζεται. Τα μη επεξεργασμένα λύματα συνήθως περιέχουν οργανικά συστατικά σε υψηλές συγκεντρώσεις, τα οποία εμποδίζουν είτε την προσρόφηση στις μεμβράνες, είτε τον πολλαπλασιασμό σε κυτταρικές σειρές. Επιπλέον, μεγάλο ποσοστό των ιών βρίσκονται στα στερεά σωματίδια των λυμάτων, με αποτέλεσμα την ανεπαρκή έκλουσή τους, γεγονός που οδηγεί σε σημαντικούς τεχνικούς περιορισμούς.

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η ανάπτυξη και εφαρμογή μιας νέας μεθόδου ανίχνευσης και ταυτοποίησης εντεροϊών στο περιβάλλον και η κατάδειξη της χρησιμότητάς της για την περιβαλλοντική παρακολούθηση της κυκλοφορίας των εντεροϊών. Οι εντεροϊοί που μελετήσαμε συγκεντρώθηκαν και απομονώθηκαν από μη επεξεργασμένα αστικά λύματα χρησιμοποιώντας την τεχνική VIRADEN (ακρωνύμιο των λέξεων Virus Adsorption Enumeration), η οποία περιλαμβάνει προσρόφηση και καταμέτρηση των ιών σε μεμβράνες νιτρικής κυτταρίνης. Αρχικά, τα απομονωθέντα στελέχη, με τη χρήση του ενζύμου περιορισμού HpaII, κατατάχθηκαν σε γενετικές υποομάδες με βάση το προφίλ περιορισμού της 5'-UTR περιοχής του γενώματος των εντεροϊών.<sup>6</sup> Ακολούθως, προσδιορίστηκε με τεχνικές μοριακής βιολογίας ο ορότυπος των στελεχών. Ειδικότερα, τμήμα του γενώματος που κωδικοποιεί τη δομική πρωτεΐνη VP1 ενισχύθηκε με Ανάστροφη Μεταγραφή-Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (RT-PCR) και στη συνέχεια προσδιορίστηκε η αλληλουχία των νουκλεοτιδίων με ανάλογη τεχνική προσδιορισμού γενετικών αλληλουχιών (sequencing).<sup>7</sup>

## Υλικό και Μέθοδοι

### Υλικό – περιβαλλοντικά δείγματα

Μελετήθηκαν 2 δείγματα μη επεξεργασμένων αστικών λυμάτων, τα οποία προέρχονταν από το σταθμό επεξεργασίας αποβλήτων της πόλης της Λευκωσίας στην Κύπρο.

### Συλλογή δειγμάτων

Δύο δείγματα μη επεξεργασμένων λυμάτων, όγκου 1 λίτρο το καθένα συλλέχθηκαν σε κάθε δειγματοληψία. Η συλλογή πραγματοποιήθηκε από προσωπικό του σταθμού επεξεργασίας τις πρώτες πρωινές ώρες, οπότε και παρατηρείται η αιχμή της εισόδου λυμάτων.<sup>5</sup> Η μεταφορά των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε σε αποστειρωμένους συλλέκτες με διωτικό πάμα σε θερμοκρασία 4 °C. Τα δείγματα μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο την ημέρα της συλλογής.

### Μέθοδοι

#### Μέθοδος VIRADEN

### Κύτταρα, υλικά και αντιδραστήρια

Χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά Buffalo Green Monkey (BGM). Τα κύτταρα αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό υλικό Eagle's Minimum Essential Medium με Earle's salts (MEM, Gibco™, Invitrogen, Paisley, UK) που περιείχε 5% ορό εμβρύου μοσχαριού (fetal bovine serum, FBS), 2 mM L-glutamine, 26.8 mM NaHCO<sub>3</sub>, 100 U/ml πενικιλίνη και 100 µg/ml στρεπτομυκίνη.

Για την επικάλυψη των τρυβλίων (standard plaque assay) χρησιμοποιήθηκε το Medium 199 με Earle's salts (Gibco™) συμπληρωμένο με 2% ορό εμβρύου μοσχαριού, 26.8 mM NaHCO<sub>3</sub>, 100 U/ml πενικιλίνη, και 100 mg/ml στρεπτομυκίνη. Το υλικό αυτό προετοιμάστηκε ως ένα διάλυμα διπλής συγκέντρωσης και αναμίχθηκε πριν από τη χρήση με ίσο όγκο 2% κεκαθαρισμένο άγαρ (Oxoid, Hampshire, United Kingdom).

Τόσο στο θρεπτικό υλικό, όσο και στο μέσο που χρησιμοποιήθηκε για την επικάλυψη των τρυβλίων προστέθηκαν επιπλέον αντιβιοτικά: πενικιλίνη (100 U/ml), στρεπτομυκίνη (100 mg/ml), γενταμυκίνη (50 mg/ml), νυστατίνη (50 mg/ml) και κεφταζιδίμη (20 mg/ml).

### Προ-φίλτρα και φίλτρα μεμβράνης

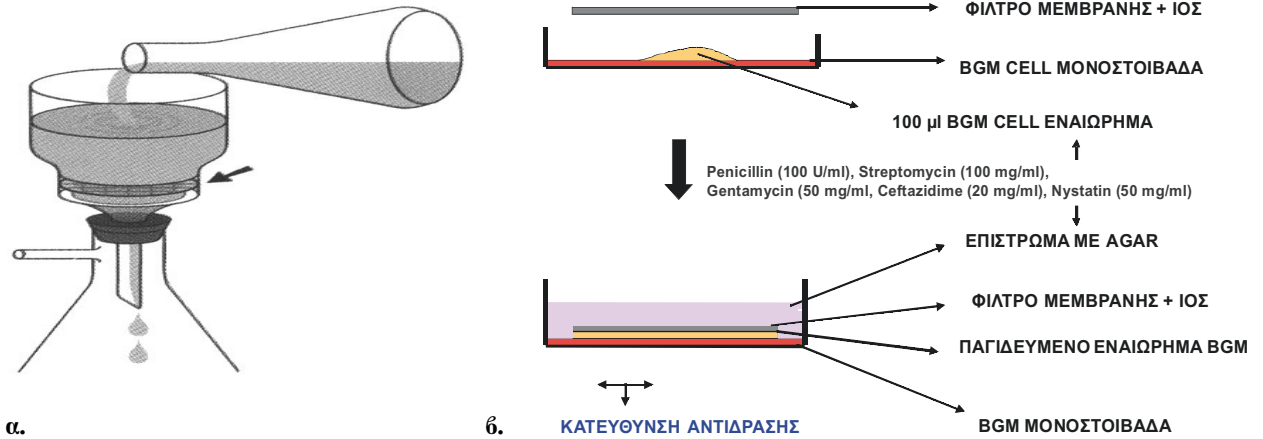
Τα διαλυμένα στερεά σωματίδια και το μικροδιακό φορτίο των λυμάτων απομακρύνθηκε από τα δείγματα με τη χρήση ειδικών φίλτρων (0,22 µm-pore-size, syringe-driven hydrophilic Polyether Sulphonate (PES) filter units, SLGP R25 LS, Millipore Corp.), όπως έχει ήδη περιγραφεί από τους Mocé-Llivina et al.<sup>8</sup> Για την απομόνωση και συγκέντρωση των ιών από τα δείγματα, χρησιμοποιήθηκαν φίλτρα νιτρικής κυτταρίνης με μέγεθος πόρου 3 µm και διάμετρο 47 mm (Millipore, Bedford, MA).

### Προσορόφηση των ιών στις μεμβράνες και ανίχνευση με τη μέθοδο VIRADEN

Αρχικά, οι ιοί προσροφήθηκαν στα ειδικά φίλτρα νιτρικής κυτταρίνης με τη χρήση της μεθόδου VIRADEN, όπως αυτή έχει περιγραφεί προηγουμένως.<sup>9</sup> Συνοπτικά, στο αρχικό δείγμα προστέθηκε MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O σε τελική συγκέντρωση 0,05 M MgCl<sub>2</sub>. Ακολούθησε διήθηση με φίλτρο νιτρικής κυτταρίνης διαμέτρου 47 mm και πόρου 3 µm σε μία ταχύτητα ροής, η οποία ποτέ δεν ξεπερνούσε τα 200 ml ανά min (Εικ. 1α). Στη συνέχεια, η μεμβράνη ξεπλενόταν με 100 ml στείρου 0,05 M MgCl<sub>2</sub>.

Στο τελικό στάδιο, οι προσροφημένοι στην μεμβράνη ιοί ανιχνεύτηκαν και καταμετρήθηκαν πάνω σε ένα μονόστιβο επιθήλιο BGM κυττάρων ως ακολούθως (Εικ. 1β). Αρχικά, απορριπτόταν το θρεπτικό υλικό ενός διαμέτρου 60 mm τρυβλίου όπου είχε αναπτυχθεί μονόστιβο επιθήλιο. Στη συνέχεια, τοποθετούνταν στο κέντρο του τρυβλίου 100 µl εναιωρήματος BGM cells σε θρεπτικό υλικό MEM συμπληρωμένο με αντιβιοτικά, το οποίο περιείχε  $1,75 \pm 0,25 \times 10^7$  κύτταρα ανά ml. Η μεμβράνη με τους προσροφημένους ιούς, τοποθετούνταν ανάποδα πάνω στο πλούσιο εναιώρημα και το μονόστιβο επιθήλιο των κυττάρων. Στο τελευταίο στάδιο, 5 ml του μέσου για την επικάλυψη των τρυβλίων ρίπτονταν αργά στο κέντρο της μεμβράνης και αφηνόταν να διασκορπιστεί σε ολόκληρο το τρυβλίο. Η διαδικασία εκτελούνταν υπό άσπτες συνθήκες. Το άγαρ αφηνόταν να στερεοποιηθεί προστατευμένο από το φως και τα τρυβλία επωάζονταν στους 37 °C παρουσία 5% CO<sub>2</sub> σε σχετική υγρασία πάνω από 80% για 48

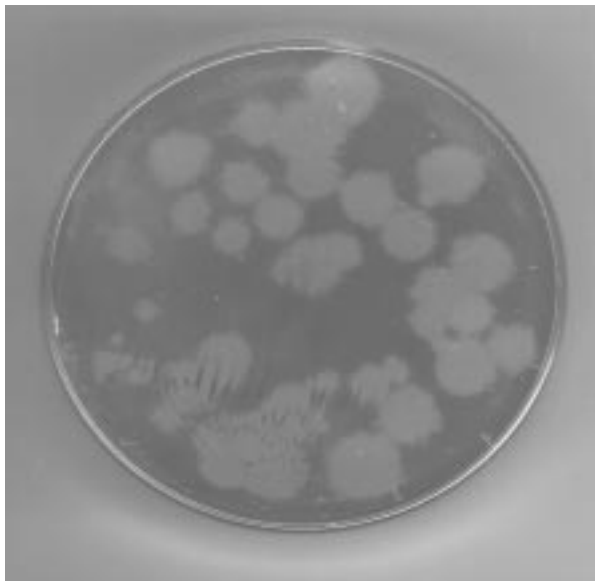




**Εικόνα 1. α.** Σχηματική αναπαράσταση τεχνικής VIRADEN: αρχικά το δείγμα περνά μέσω φίλτρου 20 µm που δεν κατακρατεί τους ιούς. **β.** Εφαρμογή της μεθόδου VIRADEN στο μονόστιβο BGM επιθήλιο (προσαρμογή από Papageorgiou et al., 2000).

έως 72 ώρες. Μετά την επώαση, τόσο το άγαρ όσο και η μεμβράνη αφαιρούνταν προσεκτικά με μία σπάτουλα. Το τρυβλίο ξεταξόταν προσεκτικά για την αναζήτηση κυτταροπαθογόνου δράσης (cytopathogenic effect, CPE) επί του μονόστιβου επιθηλίου με τη μορφή πλακών (Εικ. 2). Από κάθε πλάκα, γινόταν δειγματοληψία υλικού με τη χρήση 3-4 µl στείρου απεσταγμένου νερού και απο-

στερωμένης πιπέτας. Το υλικό αυτό χρησιμοποιούνταν στη συνέχεια για να επιμολύνει εκ νέου BGM κύτταρα σε δίσκους κυτταροκαλλιέργειών 24 θέσεων. Η ανάμιξη υλικού από διαφορετικές πλάκες αποφεύγονταν συστηματικά. Τα τελικά προϊόντα, δηλαδή οι επιμολυσμένες κυτταρικές καλλιέργειες, αποθηκεύονταν στους  $-20^{\circ}\text{C}$  μέχρι την περαιτέρω επεξεργασία και εξέτασή τους.



**Εικόνα 2.** Παρατήρηση πλακών επί του μονόστιβου BGM επιθηλίου μετά από χρώση με 0,1% κρυσταλλικό ιώδες.

## Εκχύλιση RNA

Η εκχύλιση του ιικού RNA πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο που έχει περιγραφεί από τους Casas et al.<sup>10</sup> και εφαρμόστηκε κατευθείαν στα τελικά προϊόντα της VIRADEN. Η τεχνική της εκχύλισης του RNA περιλάμβανε τη χρήση ενός ρυθμιστικού διαλύματος, το οποίο περιείχε θειοκυανιούχο γουανιδίνη (GuSCN). Ειδικότερα, σε 100 µl τελικού προϊόντος της VIRADEN προστίθεντο 400 µl ρυθμιστικού διαλύματος GuSCN. Μετά την προσθήκη 50 µg κατεψυγμένου γλυκογόνου, το μείγμα επώαζονταν για 20 min σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια, 500 µl ισοπροπανόλης ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) προστίθεντο και ακολουθούσε δεύτερη επώαση σε πάγο για 20 min. Το μείγμα φυγοκεντρούνταν σε 14,000xg για 10 min στους  $4^{\circ}\text{C}$ , το υπερκείμενο απορρίπτονταν και το ίζημα ξεπλένονταν με 1 ml αιθανόλης 70%. Η φυγοκέντρηση σε 14,000xg για 10 min στους  $4^{\circ}\text{C}$  επαναλαμβάνονταν, και το υπερκείμενο απορρίπτο-

ταν εκ νέου. Το ίζημα αφήνονταν να στεγνώσει στους 70 °C για 5 min και τελικά διαλύονταν σε 50 µl δις-απεσταγμένου νερού. Η επάρκεια της χρησιμοποιούμενης μεθόδου εκχύλισης του RNA και η παρουσία αναστολέων της ενίσχυσής του σε κάθε δείγμα ελέγχονταν με τη χρήση εκκινητών α-τουμπουλίνης.<sup>11</sup>

### Ανάστροφη Μεταγραφή–Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (RT-PCR)

Το RNA που απομονώθηκε μετατράπηκε σε συμπληρωματικό cDNA με τη βοήθεια της Ανάστροφης Μεταγραφής. Αρχικά, 40 μονάδες αναστολέα RNase (Promega Corporation, Madison, WI), 2 µl d(N)<sub>9</sub> εκκινητών (50 pmol/µl) (Takara, Japan) και 5 µl εκχυλισμένου ιικού RNA από κάθε δείγμα αναμιγνύονταν και θερμαίνονταν στους 70 °C για 5 λεπτά. Τα σωληνάκια τοποθετούνταν άμεσα στον πάγο και 5 µl RT 5x ρυθμιστικού διαλύματος, 5 µl dNTPs 10 mM, 100 μονάδες RTase M-MuLV (Promega Corporation) και 6,5 µl RNase-ελεύθερου αποστειρωμένου νερού (Sigma Aldrich) προστίθεντο σε κάθε σωληνάριο, φτιάχνοντας ένα συνολικό μείγμα αντίδρασης 25 µl. Αυτό το μείγμα επωάζονταν στους 37 °C για 1 ώρα και η άνοδος της θερμοκρασίας στους 95 °C για 5 λεπτά απενεργοποιούσε την M-MuLV RTase. Το παραγόμενο cDNA ενισχυόταν με αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR), χρησιμοποιώντας ένα μείγμα αντίδρασης 50 µl ανά σωληνάριο το οποίο περιείχε 5 µl 10x PCR ρυθμιστικό διάλυμα, 5 µl dNTPs 10 mM, 2 µl MgCl<sub>2</sub> 50 mM (φτιάχνοντας τελική συγκέντρωση MgCl<sub>2</sub> 2 mM), 32,6 µl RNase-ελεύθερο νερό, 2 μονάδες Taq Πολυμεράση (BIOTAQ, Moscow, Russia), 5 µl cDNA,

και 2 µl από καθένα από τα δύο ζεύγη εκκινητών, είτε το ζεύγος UC<sub>53</sub> και UG<sub>52</sub> (20 pmol/tube), ή 292 και 222 (50 pmol/tube). Σαράντα κύκλοι αποδιάταξης (94 °C, 10 sec), διαχωρισμού (42 °C, 30 sec) και επέκτασης (74 °C, 10 sec), ακολουθούμενοι από επώαση 15 λεπτών στους 78 °C ώστε να ολοκληρωθεί η επέκταση των εκκινητών, εκτελούνταν σε ένα Θερμικό Κυκλοποιητή Perkin-Elmer 9600 Thermal Cycler. Δέκα µl από κάθε ενισχυμένο προϊόν αναλύονταν με ηλεκτροφόρηση σε γέλη αгарόζης 2,5% (Gibco BRL, ultra pure agarose, electrophoresis grade), που περιείχε 1 µg/µl βρωμιούχο αιθίδιο (ethidium bromide in Tris-Boric acid-EDTA (TBE) buffer). Τα προϊόντα της ενίσχυσης εν συνεχεία γίνονταν ορατά με τη χρήση του UV transilluminator FOTO/PHORESIS I, FOTODYNE (Hartland, WI).

Επιλέξαμε τα εκκινητικά μόρια UC<sub>53</sub> (anti-sense), με την αλληλουχία 5'-TTGTCCACCATAAC-CAGCCA-3' (θέσεις 583-601 στο γένωμα του ιού CAV9, στέλεχος αναφοράς "Griggs") και UG<sub>52</sub> (sense), με την αλληλουχία 5'-CAAGCACTTC-TGTTTCCCCGG-3', (θέσεις 167-187 στο γένωμα του ιού CAV9, στέλεχος αναφοράς "Griggs") ως ομόλογα σε συγκεκριμένες περιοχές εντός της πολύ διατηρημένης περιοχής 5'-UTR.<sup>12-14</sup> Επιπλέον, τα εκκινητικά μόρια 292 (sense), με την αλληλουχία 5'-MIGCIGYIGARACNGG-3' (θέσεις 2612-2627 στο γένωμα του στελέχους αναφοράς PV1 reference strain Mahoney) και 222 (anti-sense), με την αλληλουχία 5'-CICCIGGIGGIAYRWAC-AT-3' (θέσεις 2969-2951 στελέχους αναφοράς PV1 reference strain Mahoney) χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση τμήματος του γονιδίου που κωδικοποιεί την καψιδική πρωτεΐνη VP1<sup>15,16</sup> (Πίν. 1). Αυτοί οι εκκινητές δίνουν προϊόν σε ύψος κατά

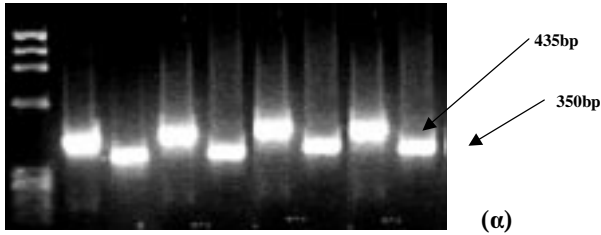
**Πίνακας 1.** Ολιγονουκλεοτιδικοί εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στην Ανάστροφη Μεταγραφή – Αλυσιδωτή αντίδραση της Πολυμεράσης (RT-PCR)

Εκκινητής	Αλληλουχία*	Θέση**
UG52	5' CAAGCACTTCTGTTCCTCCCCGG 3'	162-182
UC53	5' TTGTCCACCATAACCAGCCA 3'	577-595
292	5' MIGCIGYIGARACNGG 3'	2612-2627
222	5' CICCIGGIGGIAYRWACAT 3'	2969-2951

\*I, deoxyinosine

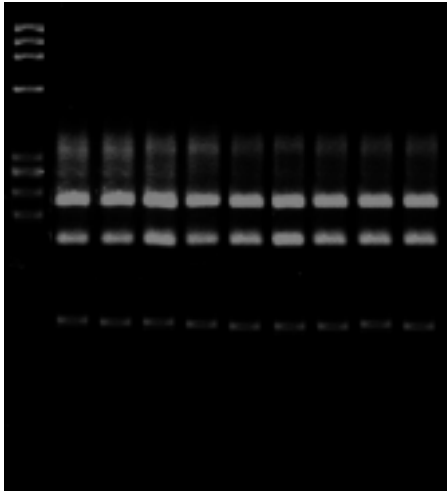
\*\*Σχετική θέση στο γένωμα του ιού Sabin 1 (strain Ls-c,2ab) για τα μόρια UG52/UC53 (Georgopoulou & Markoulatos 2001) και του πολιοϊού οροτύπου 1, Mahoney strain για τα μόρια 292/222 (Oberste et al. 2003)

M



(α)

M



(β)

**Εικόνα 3. α.** Αντιπροσωπευτικά αποτελέσματα προϊόντων ενίσχυσης με τα εκκινητικά μόρια  $UG_{52}/UC_{53}$  (435bp) και 292/222 (350bp). **β.** Αντιπροσωπευτικά αποτελέσματα της RFLP ανάλυσης των προϊόντων της RT-PCR με τα εκκινητικά μόρια  $UC_{53}/UG_{52}$  για στελέχη εντεροϊών που απομονώθηκαν. Χρησιμοποιήθηκε η περιοριστική ενδονουκλεάση HpaII (περισσότερες λεπτομέρειες στο κείμενο). Όλα τα απομονωθέντα στελέχη ανήκαν στην ίδια γενετική υποομάδα, με προφίλ περιορισμού αποτελούμενο από 4 τμήματα με μήκος νουκλεοτιδίων 213, 149, 55 και 18, αντίστοιχα. Η ένδειξη M αντιστοιχεί στο μάρτυρα μοριακού βάρους (Φx174 HaeIII-generated restriction fragments, Gibco BRL).

προσέγγιση 350 ζευγών βάσεων (Εικ. 3α). Όλες οι διαδικασίες και τεχνικές εκτελούνταν υπό συνθήκες που περιορίζαν τον κίνδυνο επιμόλυνσης με “εξωγενές” γενετικό υλικό.

**Αρχική ταυτοποίηση, με μελέτη του πολυμορφισμού των προϊόντων της RT-PCR με τα εκκινητικά μόρια  $UC_{53}/UG_{52}$  (Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis, RFLP)**

Με δεδομένη την πληροφορία ότι, η ανάλυση της 5'-UTR γενωμικής περιοχής με το ένζυμο περιορισμού HpaII ταξινομεί με ακρίβεια τόσο τα στελέχη αναφοράς όσο και τα “άγρια” στελέχη εντεροϊών σε 5 διακριτές γενετικές υποομάδες, χωρίς να παρατηρείται ενδο-οροτυπική ποικιλομορφία στους παραγόμενους με το ένζυμο HpaII αplotύπους,<sup>6</sup> προχωρήσαμε σε μία αρχική ανάλυση των προϊόντων της RT-PCR με τα εκκινητικά μόρια  $UC_{53}/UG_{52}$ . Χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο περιορισμού HpaII (New England Biolabs, Beverly, MA). Εν συντομία, 1 μl του κατάλληλου 10x ρυθμιστικού διαλύματος, 20 μονάδες του ενζύμου περιορισμού (2 μl) και 1 μl απεσταγμένου, RNase-ελεύθερου αποστειρωμένου νερού (Sigma Aldrich) προστέθηκαν σε 6 μl από καθένα από τα προϊόντα της RT-PCR με τα μόρια  $UC_{53}/UG_{52}$ , που αφορούσαν στα απομονωθέντα με τη μέθοδο VIRADEN στελέχη εντεροϊών. Ο τελικός όγκος του μείγματος ήταν 10 μl. Εν συνεχεία, τα δείγματα επώαστηκαν στους 37 °C για 2 ώρες και τα προϊόντα υποβλήθηκαν σε ηλεκτροφόρηση σε gel υψηλής ανάλυσης αραρόξης 3% (Metaphor FMC Bioproducts, Rockland ME) που περιείχε 1 μg/μl βρωμιούχο αιθίδιο. Τα προϊόντα έγιναν ορατά με τη χρήση του UV transilluminator FOTO/PHORESIS I, FOTODYNE (Hartland, WI). Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν με τη βοήθεια του λογισμικού GelPro Analyzer software (Media Cybernetics, Silver Spring, MD).

**Προσδιορισμός νουκλεοτιδικών αλληλουχιών (Sequencing) και φυλογενετική ανάλυση των προϊόντων της RT-PCR με τα εκκινητικά μόρια 292/222**

Λόγω του γεγονότος ότι δεν είναι δυνατό να υπάρξει άμεση συσχέτιση μεταξύ της γενωμικής περιοχής 5'-UTR και του οροτύπου των εντεροϊών,<sup>6</sup> αποκτήθηκε επιπρόσθετα η νουκλεοτιδική αλληλουχία τμήματος της VP1. Με τον τρόπο αυτό προσδιορίστηκαν οι ορότυποι, σύμφωνα με το μοντέλο το οποίο έχει προταθεί από τους Oberste et al.<sup>7,16</sup> Η VP1 γενωμική περιοχή περιλαμβάνει σημαντικούς επιτόπους ειδικούς για τον ορότυπο. Τα προϊόντα ενίσχυσης των στελεχών της VIRADEN με τα εκκινητικά μόρια 292/222 εκχυλίστηκαν με τη χρήση του NucleoSpin® Extr-

act Isolation Kit (MACHEREY-NAGEL, Düren, Germany) και στη συνέχεια έγινε προσδιορισμός της αλληλουχίας των βάσεων από τη Macrogen Inc. (Seoul, Korea). Η ταυτότητα του οροτύπου κάθε στελέχους προσδιορίστηκε με βάση τη σύγκριση της αλληλουχίας του τμήματος της VP1 με αντίστοιχες αλληλουχίες όλων των ανθρώπινων εντεροϊών, που έχουν κατατεθεί και είναι διαθέσιμες στη βάση δεδομένων GenBank, με τη χρήση του λογισμικού προγράμματος BLAST έκδοση 2.2.8 (διαθέσιμο στην ηλεκτρονική διεύθυνση <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).<sup>17,18</sup>

Η φυλογενετική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με βάση την ανά ζεύγος σύγκριση των αλληλουχιών τμήματος της VP1 των στελεχών που απομονώθηκαν με τις αντίστοιχες, τμηματικές αλληλουχίες της VP1 στελεχών αναφοράς και “αγρίων” στελεχών εντεροϊών του ανθρώπου του ίδιου οροτύπου, που είναι επίσης διαθέσιμες στη βάση δεδομένων GenBank, με τη βοήθεια του λογισμικού ClustalW<sup>19</sup> (διαθέσιμο στην ηλεκτρονική διεύθυνση [www.ebi.ac.uk/ClustalW](http://www.ebi.ac.uk/ClustalW)). Οι κωδικοί πρόσβασης (accession numbers) όλων των γενετικών αλληλουχιών που αποκτήθηκαν σε αυτή ή σε προγενέστερες μελέτες και χρησιμοποιήθηκαν για τη φυλογενετική σύγκριση παρατίθενται στους πίνακες 2 και 3. Η κατασκευή των φυλογενετικών δέντρων πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό ClustalX (έκδοση 1.8.3), χρησιμοποιώντας τα αρχεία ευθυγράμμισης (alignment files) που αποκτήθηκαν από την ανάλυση με το λογισμικό ClustalW. Τα δένδρογράμματα, όπου απεικονίζονται οι φυλογενετικές σχέσεις ανάμεσα στα στελέχη σχεδιάστηκαν σε μορφή PHYLIP χρησιμοποιώντας το λογισμικό TreeView software, έκδοση 3.0. Το λογισμικό αυτό αποκτήθηκε από το διαδικτυακό τόπο του Πανεπιστημίου της Γλασκώβης στην ηλεκτρονική διεύθυνση <http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/rod/html>.

### Αποτελέσματα

Απομονώθηκαν συνολικά 42 στελέχη εντεροϊών με την τεχνική VIRADEN. Στον πίνακα 2 παρουσιάζονται τα απομονωθέντα στελέχη, η HpaII γενετική υποομάδα στην οποία ανήκουν, ο προσδιορισθείς με sequencing ορότυπος, το επί της εκατό ποσοστό (%) ομοιότητας των βάσεων του RNA και οι αριθμοί πρόσβασης στη διεθνή βάση

δεδομένων GENBANK, όπου έχουν κατατεθεί οι πρωτότυπες αλληλουχίες του γενετικού υλικού.

Όλοι οι ιοί προκάλεσαν κυτταροπαθογόνο δράση στο μονόστιβο επιθήλιο των BGM κυττάρων, γεγονός το οποίο υποδηλώνει την παρουσία δυναμικά λοιμογόνων στελεχών. Τα αναμενόμενα προϊόντα ενίσχυσης μήκους κατά προσέγγιση 435 νουκλεοτιδίων με το ζεύγος εκκινητικών μορίων UC<sub>53</sub>/UG<sub>52</sub> και 350 νουκλεοτιδίων με το ζεύγος εκκινητικών μορίων 292/222 παρήχθησαν με επιτυχία (Εικ. 3α). Τέλος, η ενίσχυση των στελεχών με ειδικούς εκκινητές α-τουμπουλίνης έδωσε θετικά αποτελέσματα, αποδεικνύοντας τόσο την εκχύλιση επαρκούς ποσότητας RNA, όσο και τον περιορισμό της δράσης αναστολέων της PCR.

Αντιπροσωπευτικά αποτελέσματα της RFLP ανάλυσης με την περιοριστική ενδονουκλεάση HpaII, για την αρχική ταξινόμηση των στελεχών που απομονώθηκαν σε γενετικές υποομάδες παρουσιάζονται στην εικόνα 3β. Όλα τα απομονωθέντα στελέχη ανήκαν στην ίδια γενετική υποομάδα εντεροϊών, με προφίλ περιορισμού 4 τμημάτων με μήκος 213, 149, 55 και 18 νουκλεοτίδια, αντίστοιχα. Αυτή η γενετική υποομάδα περιλαμβάνει 38 διακριτούς οροτύπους της ομάδας Human Enterovirus Species B, που έχουν ήδη περιγραφεί λεπτομερώς,<sup>6</sup> και κατά συνέπεια έγινε μία πρώτη, αρχική υπόθεση σε σχέση με την πιθανή ομάδα οροτύπων στους οποίους ανήκαν τα απομονωθέντα στελέχη.

Οι προσδιορισθείσες αλληλουχίες τμήματος της VP1 γενωμικής περιοχής των απομονωθέντων στελεχών συγκρίθηκαν φυλογενετικά με διαθέσιμες αλληλουχίες στη βάση δεδομένων GenBank και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα 2. Το εύρος αποτελεσμάτων ταύτισης των προσδιορισθέντων αλληλουχιών σε σχέση με τις αλληλουχίες στελεχών αναφοράς και “αγρίων” στελεχών εντεροϊών που έχουν ήδη καταγραφεί κυμάνθηκε μεταξύ 82 και 98%. Η δεύτερη υψηλότερη βαθμολογία ταύτισης ήταν σε όλες τις περιπτώσεις μικρότερη από 70%. Όπως συνέβη και με την ανάλυση πολυμορφισμού, παρατηρήθηκε ότι όλα τα απομονωθέντα στελέχη ανήκαν στην ίδια γενετική υποομάδα που περιλαμβάνει non-polio εντεροϊούς. Ειδικότερα, ταυτοποιήθηκαν 33/42 CBV4 (79%), 8/42 CBV1 (19%) και 1/42 Echovirus 7 (2%). Επιπρόσθετα, όλα τα στελέχη του ίδιου οροτύπου παρουσίαζαν υψηλό ποσοστό ομοιότητας

**Πίνακας 2.** Ταυτοποίηση απομονωθέντων εντεροϊών

<i>A/α (συν.)</i>	<i>Απομονωθέν στέλεχος εντεροϊών</i>	<i>ΗραΠ γενετική υπομάδα</i>	<i>Ταυτοποίηση οροτύπου με sequencing</i>	<i>% ποσοστό ομοιότητας βάσεων RNA</i>	<i>Αριθμοί πρόσβασης GENBANK</i>
1	J1	I	CBV1	82%	AY 634232
2	J2	I	CBV1	83%	AY 634233
3	J3	I	CBV4	95%	AY634234
4	J4	I	CBV4	94%	AY634235
5	J5	I	CBV4	93%	AY634236
6	J6	I	CBV4	93%	AY634237
7	J7	I	CBV4	93%	AY634238
8	J8	I	CBV4	93%	AY634239
9	J9	I	CBV4	93%	AY634240
10	J10	I	CBV4	95%	AY634241
11	J11	I	CBV4	93%	AY634242
12	J12	I	CBV4	93%	AY634243
13	J13	I	CBV4	95%	AY634244
14	J14	I	CBV4	94%	AY634245
15	J15	I	Echo7	82%	AY634246
16	J16	I	CBV4	96%	AY634247
17	J17	I	CBV4	96%	AY634248
18	J18	I	CBV4	93%	AY634249
19	J19	I	CBV4	95%	AY634250
20	J20	I	CBV4	93%	AY634251
21	J21	I	CBV4	93%	AY634252
22	J22	I	CBV4	95%	AY634253
23	F1	I	CBV1	94%	AY634254
24	F2	I	CBV4	95%	AY634255
25	F3	I	CBV4	96%	AY634256
26	F5	I	CBV4	96%	AY634257
27	F6	I	CBV4	93%	AY634258
28	F7	I	CBV1	95%	AY634259
29	F8	I	CBV4	93%	AY634260
30	F9	I	CBV1	83%	AY634261
31	F10	I	CBV4	95%	AY634262
32	F12	I	CBV4	94%	AY634263
33	F13	I	CBV4	95%	AY634264
34	F14	I	CBV4	96%	AY634265
35	F15	I	CBV4	96%	AY634266
36	F16	I	CBV1	84%	AY634267
37	F17	I	CBV1	83%	AY634268
38	F18	I	CBV4	94%	AY634269
39	F19	I	CBV1	82%	AY634270
40	F21	I	CBV4	93%	AY634271
41	F22	I	CBV4	93%	AY634272
42	F23	I	CBV4	93%	AY634273

**Πίνακας 3.** Κωδικοί πρόσβασης (accession numbers) γενετικών αλληλουχιών στελεχών αναφοράς και άλλων στελεχών εντεροϊών που χρησιμοποιήθηκαν για τη φυλογενετική ανάλυση

Ορότυπος	Στέλεχος	Κωδικός πρόσβασης
<b>CBV4</b>	JVB	X05690
	P234pak92	AF160018
	Pk1pak92	AF160019
	BE00-117	AF521311
	48112fin98	AF160025
	9128net93	AF160021
	10199	AY373132
	10198	AY373131
	10197	AY373130
	10196	AY373129
	10195	AY373128
	10194	AY373127
	10193	AY373126
	10192	AY373125
	10191	AY373124
	10190	AY373123
<b>ECV7</b>	e7no	AF295462
	e7th	AY342733
	echo7	AY036578
	e7Bai	E7241447
	e7ob	AF081324
	E7Lin	AF465516
<b>CBV1</b>	JAPAN	M16560
	P-2264/CB1/Kanagawa/2003	AB162736
	P-2199/CB1/Kanagawa/2003	AB162733
	P-2240/CB1/Kanagawa/2003	AB162735
	04-29NGC1	AB167989
	P-2200/CB1/Kanagawa/2003	AB162734
	P-2346/CB1/Kanagawa/2003	AB162737
	10159	AY373092
	10165	AY373098

των αλληλουχιών της VP1 περιοχής ένζυμο HpaII προέδλεψε τη γενετική υποομάδα όλων των απομονωθέντων κλινικών στελεχών. Πιο συγκεκριμένα, όλα τα απομονωθέντα στελέχη παρουσίασαν προφίλ περιορισμού ταυτόσημο με το προφίλ περιορισμού της ομάδας εντεροϊών που περιείχε τα αντίστοιχα στελέχη του ίδιου ορότυπου.

Τέλος, η φυλογενετική σύγκριση των απομονωθέντων στελεχών με στελέχη αναφοράς και “άγρια” στελέχη, απέδειξε τη με βάση τον ορότυπο κατάταξη των στελεχών σε διακριτές ομάδες (Εικ. 4). Τα απομονωθέντα στελέχη, παρουσίασαν μεγαλύτερη εξελικτική σχέση με στελέχη

εντεροϊών που έχουν απομονωθεί σε άλλες περιοχές της Ευρώπης, της Ασίας, της Βορείου Αφρικής και της Μέσης Ανατολής (Εικ. 4), υποδεικνύοντας την πιθανή επιδημιολογική συσχέτισή τους. Συγκεκριμένα, οι ορότυποι των ιών CBV συσχετίζονταν εξελικτικά με παρόμοια στελέχη που απομονώθηκαν στο Βέλγιο από το 1999 έως το 2002<sup>20</sup> και ειδικότερα τα στελέχη ιών CBV4 συσχετίζονταν με στελέχη του ίδιου ορότυπου που έχουν απομονωθεί τις τέσσερις τελευταίες δεκαετίες στη Γαλλία, τη Φιλανδία, τη Ρουμανία, τη Δανία, τη Βόρειο Αμερική και το Πακιστάν.<sup>21</sup>

## Συζήτηση

Η περιβαλλοντική επιδημιολογική παρακολούθηση έχει χρησιμοποιηθεί με επιτυχία για την εκτίμηση της έκτασης και διάρκειας της επιδημικής κυκλοφορίας των εντεροϊών στον ανθρώπινο πληθυσμό.<sup>22,23</sup> Ο έλεγχος των λυμάτων έχει αποδειχθεί χρήσιμο εργαλείο για την ανίχνευση “αγρίων” στελεχών πολιοϊών στο γενικό πληθυσμό, περισσότερο από ότι η ίδια η επιδημιολογική καταγραφή της οξείας παράλυσης (acute flaccid paralysis, AFP).<sup>24</sup> “Αγρία” στελέχη πολιοϊών απομονώθηκαν στα λύματα, ενώ την ίδια στιγμή δεν ήταν δυνατό να απομονωθούν από ασθενείς με οξεία παράλυση.<sup>25-27</sup>

Η περιβαλλοντική επιτήρηση των εντεροϊών μπορεί επίσης να αποδειχθεί χρήσιμη για την παρακολούθηση της αποτελεσματικότητας των εμβολιασμών κατά της πολιομυελίτιδας και την ανίχνευση της επαναισιογωγής των “αγρίων” στελεχών σε πληθυσμούς και κοινότητες που προηγουμένως είχε επιβεβαιωθεί η εκρίζωσή τους.<sup>28,29</sup> Όλα τα παραπάνω υποδεικνύουν τη σημασία της περιβαλλοντικής παρακολούθησης για την πρόληψη και αντιμετώπιση πιθανών επιδημιών με εντεροϊούς.

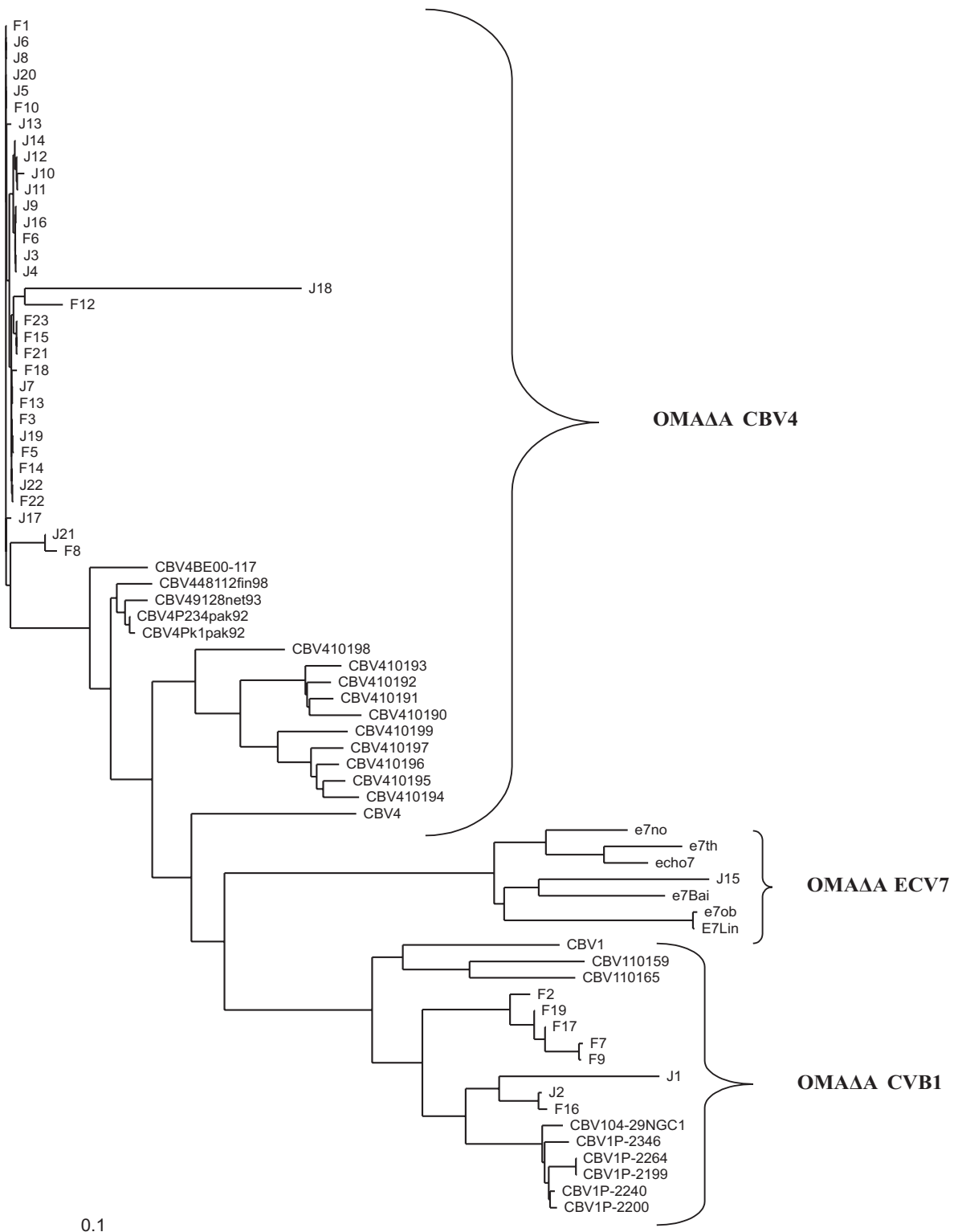
Η ύπαρξη μιας αποτελεσματικής μεθόδου αποτελεί προαπαιτούμενο για την περιβαλλοντική επιδημιολογική καταγραφή της κυκλοφορίας των εντεροϊών. Στην παρούσα μελέτη επιχειρήσαμε να συμβάλλουμε στο στόχο της ανάπτυξης ενός τέτοιου συστήματος επιτήρησης, με το σχεδιασμό και την εφαρμογή μιας απλής, οικονομικής και αποτελεσματικής μεθόδου για την ανίχνευση και ταυτοποίηση λοιμογόνων εντεροϊών στα αστικά λύματα. Χρησιμοποιήσαμε τη μέθοδο VIRADEN (προσρόφηση σε μεμβράνες νιτριικής κυτταρίνης και άμεση καλλιέργεια σε κυτταρικές σειρές) και την τεχνική της RT-PCR. Οι εντεροϊοί καθώς αναπτύχθηκαν πάνω στη μεμβράνη, σχημάτισαν πλάκες σε ένα μονόστιβο επιθήλιο. Εξ όσων γνωρίζουμε, αυτή είναι η μοναδική μέθοδος, με την οποία οι εντεροϊοί παράγουν πλάκες απευθείας από τη μεμβράνη (την περιοχή προσρόφησης του ιού), χωρίς να χρειάζεται έκλουση. Για τη μέθοδο αυτή δεν απαιτείται ειδικός εξοπλισμός ή ειδικές διαδικασίες απολύμανσης, ενώ τα απομονωθέντα στελέχη από τα περιβαλλοντικά δείγματα μπορούν να ταυτοποιηθούν εντός ολίγων ημερών από

τη στιγμή της δειγματοληψίας. Επιπρόσθετα, και άλλες κυτταρικές σειρές εκτός από τη σειρά των BGM κυττάρων, μπορούν να χρησιμοποιηθούν πάνω στις μεμβράνες νιτριικής κυτταρίνης, ενώ είναι δυνατό σε τέτοια φίλτρα να προσροφηθούν και άλλοι ιοί πλην των εντεροϊών. Με αυτόν τον τρόπο, η μέθοδος υπό παρουσίαση πιθανότατα μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση και τον χαρακτηρισμό μεγάλου φάσματος ιών με τη χρήση διαφορετικών κυτταρικών σειρών.<sup>9</sup>

Σε προγενέστερες μελέτες έχει αναφερθεί η ανίχνευση εντεροϊών με RT-PCR σε περιβαλλοντικά δείγματα με αρνητικές κυτταροκαλλιέργειες, υποδεικνύοντας ότι οι κυτταροπαθογόνοι ιοί αποτελούν ένα μόνο μικρό τμήμα του πληθυσμού των εντεροϊών που υπάρχουν στο υδατικό περιβάλλον.<sup>23,24,30</sup> Ωστόσο, ο συνδιασμός ενίσχυσης με κυτταροκαλλιέργεια και ταυτοποίησης με RT-PCR παραμένει η πιο ευαίσθητη μέθοδος για την ανίχνευση εντερικών ιών σε σχέση με κάθε μέθοδο χωριστά.<sup>23,30</sup> Οι κυτταροκαλλιέργειες έχουν επίσης το πλεονέκτημα της ενίσχυσης του χαμηλού συνήθως ιικού φορτίου των περιβαλλοντικών δειγμάτων και του περιορισμού της δράσης των ανασταλτικών για την RT-PCR παραγόντων. Επιπλέον, πιστεύουμε ότι, παρόλο που ένα θετικό αποτέλεσμα της RT-PCR με αρνητική κυτταροκαλλιέργεια αναφέρεται στην ανίχνευση γενετικού υλικού ενός άθικτου ιικού καψιδίου, αυτό που έχει πραγματικά σημασία από κλινική / επιδημιολογική άποψη είναι η ανίχνευση κυτταροπαθογόνων και κατ' επέκταση, λοιμογόνων και δυνητικά επικίνδυνων για τη δημόσια υγεία ιών.

Ο προσδιορισμός τμήματος της αλληλουχίας του γονιδίου που κωδικοποιεί την καψιδική πρωτεΐνη VP1, έδωσε πολύ καλά αποτελέσματα όσον αφορά στον ορότυπο των απομονωθέντων στελεχών, αποδεικνύοντας πρώτα από όλα, την αποτελεσματικότητα του συγκεκριμένου συστήματος προσδιορισμού του οροτύπου. Σε δεύτερο επίπεδο, αποδείχθηκε ότι οι κυτταροκαλλιέργειες ήταν αμιγείς και καθεμιά περιείχε ένα μόνο κλώνο του ιού. Οι Thoelen et al.<sup>20</sup> έχουν περιγράψει ένα παρόμοιο σύστημα ταξινόμησης με βάση την 5'-UTR γενωμική περιοχή των εντεροϊών, προτείνοντας ότι η αξία της 5'-UTR για τον καθορισμό του οροτύπου και την επιδημιολογική διερεύνησή τους δεν πρέπει να υποτιμάται.

Ενδιαφέρον επίσης εύρημα της παρούσας με-



**Εικόνα 4.** Φυλογενετικό δένδρο όπου απεικονίζονται οι εξελικτικές σχέσεις μεταξύ των απομονωθέντων περιβαλλοντικών στελεχών και των στελεχών αναφοράς ή άλλων κλινικών στελεχών. [CBV4: ιός Coxsackie B ορότυπος 4, CBV1: ιός Coxsackie B ορότυπος 1, ECV7: ιός Echo ορότυπος 7, για επεξήγηση κωδικών περιβαλλοντικών στελεχών και στελεχών αναφοράς, βλέπε πίνακες 2 και 3]



λέτης αποτελεί το γεγονός ότι τα απομονωθέντα στελέχη επιδεικνύουν υψηλότερα ποσοστά ομοιότητας στο τμήμα της VP1 γενωμικής περιοχής με στελέχη εντεροϊών που έχουν απομονωθεί σε περιοχές της Ευρώπης, της Βορείου Αμερικής, της Μικράς Ασίας,<sup>20,21</sup> της Βορείου Αφρικής και της Μέσης Ανατολής<sup>31</sup> (Εικ. 4), υποδεικνύοντας την πιθανή επιδημιολογική συσχέτιση όλων αυτών των στελεχών. Η περιοχή μας δρίσκεται γεωγραφικά στο σταυροδρόμι ανάμεσα στην Ευρώπη, τη Μέση Ανατολή και τη Βόρειο Αφρική και ήταν πράγματι πολύ ενδιαφέρον το γεγονός ότι η μοριακή ανάλυση των περιβαλλοντικής προέλευσης στελεχών της παρούσας μελέτης μας έδωσε στοιχεία σχετικά με την πιθανή εισαγωγή των εντεροϊών αυτών μέσω ατόμων που ταξιδεύουν ανάμεσα σε αυτές τις περιοχές.

Συμπερασματικά, ο συνδυασμός των τεχνικών προσρόφησης σε μεμβράνες νιτρικής κυτταρίνης, κυτταροκαλλιέργειας, ανίχνευσης με RT-PCR και προσδιορισμού οροτύπου με καθορισμό γενετικής αλληλουχίας τμήματος της VP1, αποτελεί μια πολλά υποσχόμενη προσέγγιση για την περιβαλλοντική επιτήρηση της κυκλοφορίας των εντεροϊών.

Η ανάλυση με RFLP, μπορεί να θεωρηθεί εξίσου σημαντική για την αρχική ταξινόμηση των στελεχών. Η εφαρμογή σε μόνιμη βάση ενός τέτοιου συστήματος περιβαλλοντικής επιδημιολογικής παρακολούθησης και καταγραφής των λοιμώξεων από εντεροϊούς στην Ελλάδα, θα έχει οπωσδήποτε θετικές επιπτώσεις στην κατεύθυνση της προστασίας της Δημόσιας Υγείας.

### ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Οι συγγραφείς θα ήθελαν να ευχαριστήσουν ιδιαίτερα τον Δρ. Γ. Παπαγεωργίου, υπεύθυνο του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας – Ιολογίας Ύδατος του Γενικού Χημείου του Κράτους της Κύπρου, για την πολύτιμη προσφορά του στη συλλογή και αρχική επεξεργασία των δειγμάτων.

Η παρούσα ερευνητική εργασία συγχρηματοδοτήθηκε κατά 75% από την Ευρωπαϊκή Ένωση και κατά 25% από το Ελληνικό Δημόσιο στο πλαίσιο του Επιχειρησιακού Προγράμματος Εκπαίδευσης και Αρχικής Επαγγελματικής Κατάρτισης (ΕΠΕΑΕΚ) - Αρχιμήδης.

### SUMMARY

#### **Environmental surveillance of circulation of enteroviruses - public health effects**

D. PAPAVENTSIS<sup>1,2,3</sup> N. SIAFAKAS,<sup>1</sup> P. MARKOULATOS,<sup>1</sup> V. SOPIDOU,<sup>2</sup> C. ECONOMOU,<sup>2</sup> S. LEVIDIOTOU - STEFANOY<sup>3</sup>

Department of Biochemistry and Biotechnology, University of Thessalia, Larisa,<sup>1</sup> Department of Basic Medical Lessons, Technological Scientific Institute of Athens, Egaleo,<sup>2</sup> Department of Microbiology, Medical School, University of Ioannina, Ioannina,<sup>3</sup> Greece

**Objective:** This study presents a new approach for the molecular “serotyping” of enteroviruses concentrated and isolated from urban sewage. **Method:** Samples were collected from the Nicosia Sewage Treatment Plant in Cyprus. Viruses were adsorbed on cellulose nitrate membrane filters, isolated from the membrane filter using the VIRADEN method and identified by RT-PCR, followed by 5'-UTR RFLP analysis and partial sequencing of the VP1 protein coding region. **Results:** In total, 42 enteroviruses were isolated. Initial sub-grouping based on HpaII restriction profile showed that all isolates belonged to the same genetic sub-cluster of non-polio enteroviruses. Partial VP1 sequencing revealed that isolates belonged to serotypes CBV4 (33 isolates, 79%), CBV1 (8 isolates, 19%) and Echovirus 7 (1 isolate, 2%). All isolates of the same serotype had highly similar VP1 sequences. The HpaII digests predicted the genetic sub-cluster in all cases. Finally, phylogenetic analysis revealed that the isolates correlate with strains of the same serotype isolated during the last four decades in

Europe, Asia, Northern Africa and the Middle East, implying a possible epidemiological relationship. **Conclusions:** In conclusion, the results confirm that this methodology is highly promising for environmental surveillance of enterovirus circulation and epidemiology. 5'-UTR RFLP analysis with *HpaII* is useful for initial sub-classification, while partial VP1 sequencing is efficient for molecular serotyping.

ACTA MICROBIOLOGICA HELLENICA 2006, 51 (1): 22-35

## Βιβλιογραφία

- Rusin P, Enriquez C, Johnson D, Gerba C. Enteric viruses. In: Maier R, Pepper I, Gerba C. (Eds.) *Environmental Microbiology*, 1<sup>st</sup> edition. Academic Press, London, 2000:472-484
- Melnick JL. Enteroviruses: Polioviruses, coxsackieviruses, echoviruses and newer enteroviruses. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, Chanock RM, Melnick JL, Monath TP, Roizman B, Straus SE (Eds.) *Virology*, 3<sup>rd</sup> edition. Lippincott-Raven, Philadelphia, 1996 :655-712
- Stanway G. Structure, function and evolution of picornaviruses. *J Gen Virol* 1990, 71:2483-2501
- King AMQ, Brown F, Christian P, Hovi T, Hyypid T, Knowles NJ, Lemon SM, Minor PD, Palmenberg AC, Skern T, Stanway G. Picornaviridae. In: Van Regenmortel MHV, Fauquet CM, Bishop DHL, Calisher CH, Carsten EB, Estes MK, Lemon SM, Maniloff J, Mayo MA, McGeoch DJ, Pringle CR, Wickner RB (Eds.) *Virus taxonomy. Seventh Report of the International Committee for the Taxonomy of Viruses* ed. New-York, San Diego: Academic Press, 2000: 657-673
- Anonymous. *Guidelines for environmental surveillance of poliovirus circulation*. World Health Organization, Department of Vaccines and Biologicals, Geneva, Switzerland, 2003
- Siafakas N, Markoulatos P, Vlachos C, Stanway G, Tzanakaki G, Kourea-Kremastinou J. Molecular sub-grouping of enterovirus reference and wild-type strains into distinct genetic clusters using a simple RFLP assay. *Mol Cel Probes* 2003, 17:113-123
- Oberste MS, Maher K, Kilpatrick DR, Flemister MR, Brown BA, Pallansch MA. Typing of human enteroviruses by partial sequencing of VP1. *J Clin Microbiol* 1999, 37:1288-1293
- Mocé-Llivina L, Jofre J, Muniesa M. Comparison of polyvinylidene fluoride and polyether sulphonate membranes in filtering viral suspensions. *J Virol Methods* 2003, 109:99-101
- Papageorgiou GT, Mocé-Llivina L, Christodoulou CG, Lucena F, Akkelidou D, Ioannou E, Jofre J. A simple methodological approach for counting and identifying cytopathogenic viruses adsorbed to cellulose nitrate membrane filters. *Appl Environ Microbiol* 2000, 66:194-198
- Casas I, Powell L, Klapper PE, Cleator GM. New method for the extraction of viral RNA and DNA from cerebrospinal fluid for use in the polymerase chain reaction assay. *J Virol Methods* 1995, 53:25-36
- Markoulatos P, Georgopoulou A, Siafakas N, Plakokefalos E, Tzanakaki G, Kourea-Kremastinou J. Laboratory diagnosis of common herpesvirus infections of the central nervous system by a multiplex PCR assay. *J Clin Microbiol* 2001, 39:4426-4432
- Siafakas N, Georgopoulou A, Markoulatos P, Spyrou N. Isolation of polioviruses and other enteroviruses in South Greece between 1994 and 1998. *J Clin Lab Anal* 2000, 14:157-163
- Georgopoulou A, Markoulatos P, Spyrou N, Vakalis N, Bei TA, Vamvakopoulos NC. High sequence divergence in the 5' non-coding region of reference Coxsackie B and ECHO viral strains and clinical isolates revealed by restriction fragment length polymorphism analysis. *Mol Cell Probes* 2001, 15:317-327
- Siafakas N, Georgopoulou A, Markoulatos P, Spyrou N, Stanway G. Molecular detection and identification of an enterovirus during an outbreak of aseptic meningitis. *J Clin Lab Anal* 2001, 15:87-93
- Oberste MS, Maher K, Kilpatrick DR, Pallansch MA. Molecular evolution of the human enteroviruses: Correlation of serotype with VP1 sequence and application to picornavirus classification. *J Virol* 1999, 73: 1941-1948
- Oberste MS, Nix WA, Maher K, Pallansch MA. Improved molecular identification of enteroviruses by RT-PCR and amplicon sequencing. *J Clin Virol* 2003, 26:375-377
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Meyers EW, Lip-

- man DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 1990, 251:403-410
18. Altschul SF, Madden TL, Schäffer A, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 1997, 25:3389-3402
  19. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ, Clustal W. Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 1994, 22:4673-4680
  20. Thoelen I, Moes E, Lemey P, Mostmans S, Wolants E, Lindberg AM, Vandamme AM, Van Ranst M. Analysis of the serotype and genotype correlation of VP1 and the 5' noncoding region in an epidemiological survey of the human enterovirus B species. *J Clin Microbiol* 2004, 4:963-971
  21. Mulders MN, Salminen M, Kalkkinen N, Hovi T. Molecular epidemiology of coxsackievirus B4 and disclosure of the correct VP1/2A<sup>pro</sup> cleavage site: Evidence for high genomic diversity and long-term endemicity of distinct genotypes. *J Gen Virol* 2000, 81:803-812
  22. Pallin R, Wyn-Jones AP, Place BM, Lightfoot NF. The detection of enteroviruses in large volume concentrates of recreational waters by the polymerase chain reaction. *J Virol Methods* 1997, 67:57-67
  23. Shieh YS, Baric RS, Sobsey MD. Detection of low levels of enteric viruses in metropolitan and airplane sewage. *Appl Environ Microbiol* 1997, 63:4401-4407
  24. Grabow WO, Botma KL, De Villiers JC, Clay CG, Erasmus B. Assessment of cell culture and polymerase chain reaction procedures for the detection of polioviruses in wastewater. *Bull World Health Organ* 1999, 77:973-980
  25. Bottinger M, Herrstrom E. Isolation of polioviruses from sewage and their characteristics: Experience over two decades in Sweden. *Scand J Infect Dis* 1992, 24:151-155
  26. Metcalf TG, Melnick JL, Estes MK. Environmental virology: From detection of virus in sewage and water by isolation to identification by molecular biology-a trip of over 50 years. *Annu Rev Microbiol* 1995, 49:461-487
  27. Van der Avoort HG, Reimerink JH, Ras A, Mulders MN, van Loon AM. Isolation of epidemic poliovirus from sewage during the 1992-3 type 3 outbreak in the Netherlands. *Epidemiol Infect* 1995, 114:481-491
  28. Patriarca PA. Polio outbreaks: A tale of torment. *Lancet* 1994, 344:630-631
  29. Cochi SL, Hull HF, Ward NA. To conquer poliomyelitis forever. *Lancet* 1995, 345:1589-1590
  30. Puig M, Jofre J, Lucena F, Allard A, Wadell G, Girones G. Detection of adenoviruses and enteroviruses in polluted waters by nested PCR amplification. *Appl Environ Microbiol* 1994, 60:2963-2970
  31. Yang CF, Naguib T, Yang SJ, Nasr E, Jorba J, Ahmed N, Campagnoli R, van der Avoort H, Shimizu H, Yoneyama T, Miyamura T, Pallansch M, Kew O. Circulation of endemic type 2 vaccine-derived poliovirus in Egypt from 1983 to 1993. *J Virol* 2003, 77:8366-8377

## Αποικισμός του περιβάλλοντος σε νεοϊδρυθείσα μονάδα εντατικής θεραπείας

Μ. Χωριανοπούλου,<sup>1</sup> Μ. Κανελλοπούλου,<sup>2</sup> Σ. Χατζοπούλου, Γ.Α. Δαϊκος, Σ. Λαμπρόπουλος,<sup>1</sup> Ν.Ι. Λεγάκης<sup>3</sup>

Ο σκοπός αυτής της εργασίας είναι να μελετηθεί ο αποικισμός του περιβάλλοντος χώρου σε μία νεοϊδρυθείσα Μονάδα Εντατικής Θεραπείας (ΜΕΘ). Ελήφθησαν καλλιέργειες από τα κάγκελα των κρεβατιών, τα αμπού, τα monitors, τους νιπτήρες και τις δρύσες της ΜΕΘ, καθώς και από το έμπυχο υλικό της ΜΕΘ (χέρια και φάρυγγα του ιατρο-νοσηλευτικού, βουβώνα και μασχάλη ασθενών). Τα αποτελέσματα συνοψίζονται παρακάτω. Από τα κάγκελα των κρεβατιών των ασθενών απομονώθηκε *A. baumannii* σε ποσοστό 3,1%, *K. pneumoniae* σε ποσοστό 3,11%, *P. aeruginosa* σε ποσοστό 2,0% και *E. cloacae* σε ποσοστό 1,0% των καλλιεργειών. Τα αμπού δρέθηκε να είναι αποικισμένα με *Fusarium* σε ποσοστό 7,1%. Στα monitors υπήρχε διαφοροποίηση στον αποικισμό τους και στην πλειοψηφία των περιπτώσεων ο μικροοργανισμός ήταν ο ίδιος με αυτόν που αποίκιζε το αναπνευστικό του ασθενούς. Από τους νιπτήρες και τις δρύσες της ΜΕΘ ελήφθησαν 55 καλλιέργειες. Οι επτά από αυτές ανέπτυξαν *A. lawffii*, ποσοστό 13% επί των καλλιεργειών. Τα χέρια του ιατρο-νοσηλευτικού προσωπικού ήταν αποικισμένα σε ποσοστό 19,2%, με κυριότερο εκπρόσωπο το *E. cloacae* (7%) και ακολουθούσαν *P. fluorescens* / *Putida* (5,3%), *A. baumannii* (3,5%), ενώ η *S. maltophilia* και ο υφομύκητας *Fusarium*, απομονώθηκαν σε ποσοστό 1,7% έκαστος. Στη βουβωνική περιοχή υπερείχε το *E. coli* με ποσοστό 10,2% και η *P. aeruginosa* με ποσοστό 7,7% και ακολουθούσαν ο *Proteus sp* (5,1%) το *E. cloacae* (3,0%) και η *K. pneumoniae* (1,8%). Στον αποικισμό της μασχάλης υπερερούσε η *K. pneumoniae* με ποσοστό 21% και ακολουθούσε η *P. aeruginosa* με ποσοστό 16%. Αξίζει να σημειωθεί ότι ο φάρυγγας του ιατρο-νοσηλευτικού προσωπικού ήταν αποικισμένος σε ποσοστό 7,4% από παθογόνους μικροοργανισμούς της ΜΕΘ όπως *E. cloacae*, *E. coli*, *E. aerogenes* και *A. baumannii*.

ΔΕΛΤΙΟΝ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΕΤΑΙΡΕΙΑΣ 2006, 51 (1): 36-41

## Εισαγωγή

Η ανάπτυξη μικροοργανισμών στο περιβάλλον ευνοείται από την ύπαρξη σ' αυτό διαφόρων σωμάτων που περιέχουν υγρασία και διάφορες θρεπτικές ουσίες, όπως πρωτεΐνες οργανικής ύλης, που μπορεί να προέρχονται από την απόπτωση ανθρωπίνων κυττάρων, ή ρύπανση από διάφορα βιολογικά υλικά.<sup>1,2</sup> Ο αέρας δεν αποτελεί περιβάλλον αναπτύξεως μικροβίων· μικροβιακά κύτταρα μολύνουν τον αέρα τυχαία ή σπόροι μυκήτων διασπείρονται σ' αυτόν. Πολλά παθογόνα μεταδίδονται μέσω του αέρα γιατί βρίσκονται σε σωματίδια σκόνης ή στα σταγονίδια σάλιου.

Εκτός από τους σπόρους των μυκήτων, που διασπείρονται φυσικά, παθογόνοι μικροοργανισμοί εμφανίζονται στον αέρα σε συσχέτιση με δύο τύπους σωματιδίων: τα υπολείμματα των σταγονιδίων εκπνοής που εξατμίζονται (πυρήνες σταγονιδίων) και τα πολύ μεγαλύτερα σωματίδια σκόνης. Αυτοί οι δύο τύποι σωματιδίων διαφέρουν πολύ από την άποψη της πηγής τους, της συμπεριφοράς καθιζήσεως, της σημασίας τους στη νόσο και των μεθόδων που πρέπει να χρησιμοποιηθούν για τη μέτρηση και τον έλεγχό τους. Και οι μεταφερόμενοι με τη σκόνη και οι μεταφερόμενοι στους πυρήνες των σταγονιδίων μικροοργανισμοί χάνουν τη διωσιμότητά τους στον αέρα.<sup>6-8</sup> Η παρουσία πληθυσμών με διαφορετικά ποσοστά θανάτου αντανακλά πιθανώς διαφορές στα μικρο-περιβάλλοντα των σωματιδίων μάλλον παρά γενετικές διαφορές των μικροοργανισμών.<sup>3</sup> Τα ποσοστά θανάτου επηρεάζονται εξαιρετικά από την υγρασία και τη θερμοκρασία του αέρα και υπάρχουν μεγάλες διαφορές στα ποσοστά θανάτου μεταξύ διαφορετικών ειδών μικροοργανισμών. Γενικά, οι μικροοργανισμοί που είναι φυσιολογικά αερομεταφερόμενοι (π.χ. *Mycobacterium tuberculosis*) είναι περισσότερο ανθεκτικοί σε αδρανοποίηση από τους μικροοργανισμούς που φυσιολογικά μεταφέρονται με το νερό (π.χ. *E. coli*).<sup>9</sup>

## Υλικό και μέθοδος

A) Για τη μελέτη του αποικισμού του περιβάλλοντος στη νεοϊδρυθείσα ΜΕΘ ελήφθησαν συνολικά 422 καλλιέργειες από το περιβάλλον της ΜΕΘ, τόσο από τον άψυχο περιβάλλοντα χώρο, όσο και από το έμψυχο υλικό (προσωπικό, ασθενείς). Οι

καλλιέργειες λαμβάνονταν κυκλικά ανά τακτά χρονικά διαστήματα τους τρεις πρώτους μήνες λειτουργίας της νεοϊδρυθείσας ΜΕΘ. Η λήψη των καλλιεργειών γινόταν με αποστειρωμένο δαμβασκοφόρο στυλεό εμποτισμένο με στείρο διάλυμα φυσιολογικού ορού. Αμέσως μετά γινόταν επίστρωση σε αιματούχο άγαρ και επώαση στους 37 °C. Ακολουθούσε ανακαλλιέργεια και ταυτοποίηση των μικροοργανισμών.

- I) Για τη μελέτη του αποικισμού του άψυχου περιβάλλοντος χώρου, ελήφθησαν καλλιέργειες από το παρακάτω άψυχο υλικό:
- α) από τα κάγκελα των κρεβατιών των ασθενών,
  - β) από τα αμπού των ασθενών,
  - γ) από τα monitors των ασθενών,
  - δ) από τους νιπτήρες και τις δρύσες της ΜΕΘ, και
  - ε) από την εσωτερική επιφάνεια των σωλήνων των αναπνευστήρων.
- II) Από το έμψυχο υλικό της ΜΕΘ ελήφθησαν καλλιέργειες από:
- α) τα χέρια του ιατρο-νοσηλευτικού προσωπικού,
  - β) από το φάρυγγα του ιατρο-νοσηλευτικού προσωπικού και
  - γ) από το σώμα των ασθενών (μασχάλη, βουβώνα).

Αποτελέσματα αποικισμού του έμψυχου υλικού:

## Αποτελέσματα

Αναλυτικά για το καθένα από τα πιο πάνω υλικά είχαμε τα ακόλουθα αποτελέσματα:

- I) Αποτελέσματα αποικισμού του άψυχου περιβάλλοντος.
- A) Ελήφθησαν συνολικά 196 καλλιέργειες από τα κάγκελα των κρεβατιών των ασθενών. Από αυτές απομονώθηκε *A. baumannii* σε ποσοστό 3,1%, *K. pneumoniae* σε ποσοστό 3,11%, *P. aeruginosa* σε ποσοστό 2,0% και *E. cloacae* σε ποσοστό 1,0% των καλλιεργειών (Πίν. 1).
- B) Από τα αμπού ελήφθησαν 56 καλλιέργειες και δρέθηκε να είναι αποικισμένα με *Fusarium* σε ποσοστό 7,1% (Πίν. 7).
- Γ) Στα monitors υπήρχε διαφοροποίηση στον αποικισμό του και στην πλειοψηφία των περιπτώσεων ο μικροοργανισμός ήταν ο ίδιος με

αυτόν που αποίκιζε το αναπνευστικό του ασθενούς. Σε ποσοστό 7,7% απομονώθηκε *P. aeruginosa* και *P. fluorescens/putida* σε ποσοστό 3,8%. Σε μισές από αυτές τις καλλιέργειες η *P. aeruginosa* ήταν πολυανθεκτική (ευαίσθητη μόνο σε κολιστίνη), με φαινότυπο ίδιο με αυτόν που αποίκιζε το αναπνευστικό των αντίστοιχων ασθενών. *K. pneumoniae* και *A. baumannii* βρέθηκε σε ποσοστό 7,7% έκαστο με φαινότυπο που ταυτιζόταν με αυτόν του αναπνευστικού των αντίστοιχων ασθενών. *Fussarium* βρέθηκε να αποικίζει τα μόνιτρος μόνο σε 2 περιπτώσεις (ποσοστό 3,8%) (Πίν. 2).

- Δ) Από τους νιπτήρες και τις δρύσες της ΜΕΘ ελήφθησαν 55 καλλιέργειες. Οι επτά από αυτές ανέπτυξαν *A. lowffi*, ποσοστό 13% επί των καλλιεργειών (Πίν. 8).
- Ε) Από την εσωτερική επιφάνεια των σωλήνων των αναπνευστήρων ελήφθησαν 27 καλλιέργειες. Σε μία από αυτές απομονώθηκε *S. cohnii*, ευαίσθητος μόνο στα γλυκοπεπτίδια.
- Α) Αποικισμένο ήταν το 19,2% των χειρών του ιατρο-νοσηλευτικού προσωπικού. Απομονώθηκαν διάφοροι μικροοργανισμοί με κυριότερο εκπρόσωπο το *E. cloacae* σε ποσοστό 7%. Ακολούθουσαν η *P. fluorescens / putida* σε ποσοστό 5,3%, το *A. baumannii* σε ποσοστό 3,5%, ενώ η *S. maltophilia* και ο υφομόκητας *Fussarium*, απομονώθηκαν σε ποσοστό 1,7% έκαστος (Πίν. 3).
- Β) Το σώμα των ασθενών ήταν αποικισμένο σε ποσοστό 67,4%. Υπερείχε ο αποικισμός στο βουδώνια που έφτανε στο 44,1% ενώ ο αποικισμός στη μασχάλη δεν ξεπερνούσε το 23,3%. Στη βουδωνική περιοχή υπερείχε η *E. coli* με ποσοστό 10,2% και η *P. aeruginosa* με ποσοστό 7,7% και ακολουθούσαν ο *Proteus* (5,1%) το *E. cloacae* (3,0%) και η *K. pneumoniae* (1,8%) (Πίν. 5).
- Γ) Στον αποικισμό της μασχάλης υπερετρούσε η *K. pneumoniae* με ποσοστό 21% και ακολουθούσε η *P. aeruginosa* με ποσοστό 16% (Πίν. 6).
- Δ) Αξίζει να σημειωθεί ότι ο φάρυγγας του ιατρο-νοσηλευτικού προσωπικού ήταν αποικισμένος σε ποσοστό 7,4% από παθογόνους μικροοργανισμούς της ΜΕΘ όπως *E. cloacae*, *E. coli*, *E. aerogenes* και *A. baumannii* (που ταυτιζόνταν φαινοτυπικά με μικροοργανισμούς που απομο-

**Πίνακας 1.** Αποτελέσματα από 196 καλλιέργειες που ελήφθησαν από τα κάγκελα των κρεβατιών των ασθενών της Μ.Ε.Θ.

Μικροοργανισμός	Αριθμός θετικών καλ/γειών	Ποσοστό
<i>A. baumannii</i>	6	3,1%
<i>K. pneumoniae</i>	6	3,1%
<i>P. aeruginosa</i>	4	2,0%
<i>E. cloaca</i>	2	1,0%

**Πίνακας 2.** Αποτελέσματα από 52 καλλιέργειες που ελήφθησαν από την επιφάνεια των μόνιτρος των ασθενών

Μικροοργανισμός	Αριθμός θετικών καλ/γειών	Ποσοστό
<i>A. baumannii</i>	4	7,7%
<i>K. pneumoniae</i>	4	7,7%
<i>P. aeruginosa</i>	4	7,7%
<i>P. putida</i>	2	3,8%
<i>Fussarium</i>	2	3,8%

**Πίνακας 3.** Αποτελέσματα από 114 καλλιέργειες που ελήφθησαν από τα χέρια του ιατρικού προσωπικού

Μικροοργανισμός	Αριθμός θετικών καλ/γειών	Ποσοστό
<i>A. baumannii</i>	4	3,5%
<i>E. cloaca</i>	8	7,0%
<i>S. maltophilia</i>	2	1,7%
<i>P. putida</i>	6	5,3%
<i>Fussarium</i>	2	1,7%

**Πίνακας 4.** Αποτελέσματα από 54 καλλιέργειες που ελήφθησαν από το φάρυγγα των ιατρών της Μ.Ε.Θ.

Μικροοργανισμός	Αριθμός θετικών καλ/γειών	Ποσοστό
<i>A. baumannii</i>	2	1,8%
<i>E. cloacae</i>	2	1,8%
<i>E. coli</i>	2	1,8%
<i>E. aerogenes</i>	2	1,8%

ώνονταν την αντίστοιχη χρονική περίοδο από διάφορα βιολογικά υλικά των νοσηλευόμενων στη ΜΕΘ (Πίν. 4).

**Πίνακας 5.** Αποτελέσματα από 78 καλλιέργειες που ελήφθησαν από τη βουβωνική περιοχή του σώματος των ασθενών της Μ.Ε.Θ.

Μικροοργανισμός	Αριθμός θετικών καλ/γείων	Ποσοστό
<i>E. coli</i>	8	10,2%
<i>E. cloaca</i>	2	3,0%
<i>K. pneumoniae</i>	14	18%
<i>P. aeruginosa</i>	6	7,7%
<i>Proteus</i>	4	5,1%

**Πίνακας 6.** Αποτελέσματα από 76 καλλιέργειες που ελήφθησαν από την μασχάλη των ασθενών της Μ.Ε.Θ.

Μικροοργανισμός	Αριθμός θετικών καλ/γείων	Ποσοστό
Σύνολο 76	32	42,1%
<i>K. pneumoniae</i>	16	21%
<i>Proteus</i>	2	2,6%
<i>E. aerogenes</i>	2	2,6%
<i>P. aeruginosa</i>	12	16%

**Πίνακας 7.** Αποτελέσματα από 56 καλλιέργειες που ελήφθησαν από τα αμπού των ασθενών της Μ.Ε.Θ.

Μικροοργανισμός	Αριθμός θετικών καλ/γείων	Ποσοστό
<i>Fusarium</i>	4	7,1%

**Πίνακας 8.** Αποτελέσματα από 110 καλλιέργειες που ελήφθησαν από τους νιπτήρες και τις βρύσες της Μ.Ε.Θ.

Μικροοργανισμός	Αριθμός θετικών καλ/γείων	Ποσοστό
<i>A. lowffi</i>	14	12,7%

## Συζήτηση

Η μετάδοση των μικροοργανισμών στο νοσοκομειακό χώρο, έχει γίνει θέμα πολλαπλών μελετών και συζητήσεων. Όλοι συμφωνούν, ότι η σημαντικότερη οδός μετάδοσης, είναι τα χέρια του ιατρο-νοσηλευτικού προσωπικού.<sup>12,13</sup> Αρκετές μελέτες δείχνουν ότι η συμμόρφωση του προσωπικού, για το σχολαστικό πλύσιμο των χεριών, στη ΜΕΘ, δεν ξεπερνά το 40%. Αξίζει να σημειωθεί ότι το πιο πάνω ποσοστό ελάχιστα μεταβλήθηκε,

όταν το προσωπικό ενός νοσοκομείου, ενημερώθηκε ότι πραγματοποιείται σχετική μελέτη. Πολλοί λόγοι έχουν προταθεί για να ερμηνεύσουν το χαμηλό ποσοστό συμμόρφωσης του προσωπικού. Οι κυριότεροι από αυτούς είναι: α) η έλλειψη προτεραιότητας σε σχέση με άλλες εργασίες, β) ανεπαρκής χρόνος για πλύσιμο χεριών, γ) μη βολική θέση νιπτήρων ή άλλων αντισηπτικών συσκευών, δ) αλλεργία ή δυσανεξία στα αντισηπτικά διαλύματα, ε) έλλειψη οργάνωσης και προγραμματισμού στο επίπεδο του προσωπικού και στ) έλλειψη της προσωπικής αφοσίωσης στο χρέος της καθαριότητας των χεριών.

Πολλοί μικροοργανισμοί, όπως οι *Pseudomonas putida* και *Pseudomonas stutzeri*, αποικίζουν διαλύματα αντισηπτικών, και μπορούν παράλληλα να μετέφερον *bla<sub>VIM</sub>* γονίδια αντοχής. Η διασπορά των πιο πάνω μικροοργανισμών, αποτέλεσε αιτία επιδημιών σε νοσοκομεία.<sup>2</sup> Μια άλλη οδός μετάδοσης των μικροοργανισμών είναι ο αέρας. Στις επεκτεινόμενες επιδημίες, η διαδοχική συγκέντρωση περιπτώσεων ή «γενεών» εμφανίζεται ως αποτέλεσμα της περιόδου επώασης που παρεμβάλλεται μεταξύ των διαδοχικών περιπτώσεων.<sup>10,11</sup>

Ένα απλό μοντέλο διασποράς πολυανθεκτικών μικροβίων στο χώρο της ΜΕΘ, είναι αυτό στο οποίο μεταφέρονται τα στελέχη, από τον περιβάλλοντα χώρο του ασθενούς (όπως π.χ. μόνιτορς, κάγκελα κρεβατιού του ασθενούς, που όπως προαναφέρθηκε αποικίζονται με τα πολυανθεκτικά στελέχη του ασθενούς) με τα χέρια του προσωπικού.<sup>14</sup> Το γεγονός ότι απομονώθηκαν πολυανθεκτικά στελέχη τόσο από τον περιβάλλοντα χώρο του ασθενούς όσο και από τα χέρια του προσωπικού, ενισχύει αυτή την άποψη.

Από τα προαναφερόμενα αποτελέσματα αξίζει να σημειωθεί ότι ο αποικισμός του αναπνευστικού μερικών νοσηλευόμενων συνέπιπτε τόσο χρονικά όσο και ποιοτικά (είδος μικροοργανισμού) με τον αποικισμό των μόνιτορς. Αυτό αποδίδεται σε χειρισμούς π.χ. φυσιοθεραπευτών οι οποίοι ετύγχανε παράλληλα με τη φυσιοθεραπεία του αναπνευστικού να ρυθμίζουν και τους όγκους, στο μόνιτορ του ασθενούς, ή την περιεκτικότητα του μίγματος αέρα, σε οξυγόνο. Με τον περαιτέρω χειρισμό των αποικισμένων μόνιτορς (ακόμα και αν δεν έχει προηγηθεί κλινική εξέταση του ασθενούς) από το ιατρονοσηλευτικό προσωπικό, διασπείρεται ο αποικισμός, από ασθενή σε ασθενή. Κάτι ανάλογο συμ-

δαίνει και με τα κάγκελα των κρεβατιών που συνήθως κρατούν οι ασθενείς με τα χέρια τους.

Οι Johanson και συν. αναφέρουν ότι, όσον αφορά στο αναπνευστικό δένδρο, το 22% των ασθενών που προσέρχονται στη ΜΕΘ αποικίζεται από το πρώτο 24ωρο, ενώ οι Kerker και συν. έδειξαν ότι ο αποικισμός του αναπνευστικού φτάνει το 40-60% την 5η ημέρα νοσηλείας και το 100% μετά τη 10η ημέρα νοσηλείας.<sup>15,16</sup> Με τα παραπάνω συμφωνούν και οι Ewig και συν. που διαπιστώνουν υψηλό ρυθμό αποικισμού στη ΜΕΘ (83%) στο πρώτο 24ωρο.

Ο αποικισμός του αναπνευστικού των ασθενών στη νεοϊδρυθείσα ΜΕΘ που μελετήσαμε έφτασε το 83%. Η σύγκριση των αποτελεσμάτων μας με ανάλογα δημοσιευμένα αποτελέσματα ήδη λειτουργούντων Μονάδων Εντατικής Θεραπείας, δεν δείχνουν στατιστικά σημαντική διαφορά.<sup>15,16</sup> Βέβαια, αξίζει να σημειωθεί η χρονική καθυστέρηση της ανάπτυξης του αποικισμού στο αναπνευστικό των ασθενών στη νεοϊδρυθείσα ΜΕΘ σε σχέση με αυτή που ήδη αναφέρεται για ήδη λειτουργούσα ΜΕΘ.<sup>17</sup>

Η δουβωνική περιοχή του σώματος των νοση-

λευομένων, είναι σε μεγαλύτερο ποσοστό αποικισμένη σε σχέση με τη μασχάλη των ασθενών. Μια πιθανή ερμηνεία γι' αυτό είναι η γειτνίαση της δουβωνικής περιοχής με την περιοχή του πρωκτού, γεγονός που ερμηνεύει επίσης και την συχνή εμφάνιση της *E. coli*.

Για τον αποικισμό του φάρυγγα στο ιατρικό προσωπικό, υπάρχουν δύο πιθανές ερμηνείες:

- α) Μεταφορά των μικροοργανισμών με τα χέρια στη στοματική κοιλότητα και από εκεί αποικισμός του φάρυγγα.
- β) Αν και ο αέρας δεν αποτελεί περιβάλλον ανάπτυξης μικροβίων, μικροδιακά κύτταρα μολύνουν τον αέρα τυχαία. Πολλά παθογόνα μεταδίδονται μέσω του αέρα γιατί θρίσκονται σε σωματίδια σκόνης ή στα σταγονίδια σάλιου.

Το *Acinetobacter lowffi*, μικροοργανισμός του περιβάλλοντος που φιλεί το υγρό στοιχείο, δρέθηκε να επικρατεί σ' όλες τις καλλιέργειες που ελήφθησαν από νιπτήρες και θρύεςες. Σε ήδη λειτουργούσες ΜΕΘ, ο αποικισμός των νιπτήρων από Gram(-) βακτήρια, υπερβαίνει το 5%, και το *A. lowffi* σταδιακά εκλείπει.

## SUMMARY

### *Environmental colonization of a newly established intensive care unit*

M. CHORIANOPOULOU,<sup>1</sup> M. KANELLOPOULOU,<sup>2</sup> S. CHATZOPOULOU, G.L. DAIKOS, S. LABROPOULOS,<sup>1</sup> N.I. LEGAKIS<sup>3</sup>

*Intensive Care Unit<sup>1</sup> and Laboratory of Clinical Microbiology,<sup>2</sup> General Peripheral Hospital "Sismanogleio", Department of Microbiology,<sup>3</sup> Medical School, University of Athens, Athens, Greece*

*The aim of this study was to investigate colonization of the environment in a newly established Intensive Care Unit (ICU). The findings were: a) From the cultures of the beds a variety of organisms was isolated, specifically: *A. baumannii* 3.1%, *K. pneumoniae* 3.11%, *P. aeruginosa* 2.0% and *E. cloaca* 1.0%; b) *A. lowffi* was isolated from cultures of the taps (13%); c) Cultures from the hands of the staff showed that 19.2% were colonized, by *E. cloaca* (7%), *P. fluorescens / putida* 5.3%, *A. baumannii* 3.5%, and *S. maltophilia* 1.7% and *fussarium* 1.7%.*

ACTA MICROBIOLOGICA HELLENICA 2006, 51 (1): 36-41

## Βιβλιογραφία

1. Λεγάκης Ν, Χαλεβελάκης Ι. Φυσιολογική χλωρίδα. Στο: Αντιβιοτικά και συνήθεις λοιμώξεις. 2<sup>η</sup> Έκδοση. Αθήνα 1995, 88 – 92

2. Bonten M, Weinstein RA. The role of colonization in the pathogenesis of nosocomial infections. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1996, 17:193-200
3. Greene JN. The microbiology of colonization,



- including techniques for assessing and measuring colonization. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1996, 17:1114-1118
4. Παρασκευάς Ε, Μανιάτης ΑΝ. Ιογενείς και μικροβιακές εντερίτιδες. Ελληνική Γαστρεντερολογική Εταιρεία. Λεπτό έντερο, Γαστρεντερολογία Αθήνα 1991
  5. Alexander M. *Microbiol Ecology*. Wiley 1971
  6. Graham HD. The Microbiology of the Atmosphere, 2<sup>nd</sup> ed. Wiley, 1973
  7. Gregory PH, Monteith JL. Airborne microbes. Cambridge Univ Press, 1967
  8. Hers JFP, Winkler KC. Airborn transmission and airborn infection: 6<sup>th</sup> International Symposium on Aerobiology. Wiley, 1973
  9. Hugo WB. Inhibition and destruction of the microbial cell. *Academic Press*, 1971
  10. Isenberg HD, Balows A. Bacterial pathogenicity in man and animals. In: Starr MP, Stole H, Truper HG (eds): The procaryotes. New York, Springer – Verlag, 1981, p. 83
  11. Lennette EH, Ballows A. Hausler WJ, et al (eds) Manual of Clinical Microbiology (4<sup>th</sup> ed). Washington DC, American Society for Microbiology, 1985
  12. Murray BR, Washington JA. II. Microscopic and bacteriologic analysis of expectorated sputum. *Mayo Clin Proc* 1975, 50:339
  13. Rosebury T. Microorganisms endogenous to man. New York, McGraw *Hill Book Co, Inc*, 1961
  14. Skinner FA, Carr JG. The normal microflora of man. London, Academic Press, 1974
  15. Johanson WG, Pierce AK, Sanford JP. Nosocomial respiratory infections with Gram-negative bacilli: The significance of colonization of the respiratory tract. *Am Rev Respir Dis* 1988, 137:259-264
  16. Kerver AJ, Rommes JH, Mevissen-Erhage EA et al. Prevention of colonization and infection in critically ill patients: A prospective randomized study. *Crit Care Med* 1988, 16:1087-1093
  17. Χωριανοπούλου Μ, Κανελλοπούλου Μ, Παρασκευόπουλος Ι, Λαμπρόπουλος Σ. Μικρόβια που αποικίζουν το αναπνευστικό και ουροποιητικό σύστημα ασθενών νοσηλευμένων σε νεοϊδρυθείσα ΜΕΘ Τριτοβάθμιου Γενικού Νοσοκομείου κατά τους τρεις πρώτους μήνες λειτουργίας της. Δελτίον Ελληνικής Μικροβιολογικής Εταιρείας

# Σύγκριση των απαιτήσεων ποιότητας τεσσάρων βιοχημικών αναλυτών με τη χρήση διαγραμμάτων OPSpecs και του ανώτερου επιτρεπτού συστηματικού σφάλματος

Π. Καρκαλούσος,<sup>1</sup> Δ. Βούρτσης,<sup>2</sup> Λ. Τσουκαλάς,<sup>3</sup> Μ. Αντωνίου<sup>4</sup>

Μελετώντας διαδοχικά διαγράμματα OPSpecs ο χειριστής ενός αυτόματου αναλυτή μπορεί να βρει την πιο κατάλληλη μέθοδο ελέγχου για κάθε εξέταση, δηλαδή το συνδυασμό κριτηρίων ελέγχου και τον αριθμό των τιμών ελέγχου που εξασφαλίζουν τη μεγαλύτερη πιθανότητα ανίχνευσης σφάλματος και τη μικρότερη πιθανότητα λανθασμένης απόρριψης. Στη μελέτη μας χρησιμοποιήθηκαν τα διαγράμματα OPSpecs για να συγκριθούν οι απαιτήσεις ποιότητας τεσσάρων βιοχημικών αναλυτών (WAKO 30 R, OLYMPUS AU 500, ILAB 600, ACE). Για κάθε εξέτάσή τους προσδιορίστηκαν τα καταλληλότερα κριτήρια ελέγχου, ο ελάχιστος απαιτούμενος αριθμός τιμών ελέγχου, και η εγγύηση της μεθόδου ποιότητας κάθε ανάλυσης. Στη σύγκριση των απαιτήσεων ποιότητας των τεσσάρων αναλυτών βοήθησε και ο προσδιορισμός του ανώτερου επιτρεπτού συστηματικού σφάλματος σύμφωνα με τη σχέση:  $\Delta SE_{crit} = [(TE_a - bias)/s_{meas}] - 1,65$ . Με βάση την τιμή  $\Delta SE_{crit}$  οι αναλυτές ταξινομήθηκαν, ξεκινώντας από το λιγότερο απαιτητικό σε μεθόδους ποιότητας, ως εξής: WAKO 30 R, ILAB 600, OLYMPUS AU 500, ACE. Από τις επιμέρους εξετάσεις λιγότερο απαιτητικές σε μεθόδους ποιότητας αποδείχθηκαν οι Trig, CK, K. Ακολουθούν διαδοχικά οι LDH, ALP, AST, BILIT, UA, TP, ALT, Ca, Creat, Gluc, Chol, ALB, Na, Urea.

ΔΕΛΤΙΟΝ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΕΤΑΙΡΕΙΑΣ 2006, 51 (1): 42-53

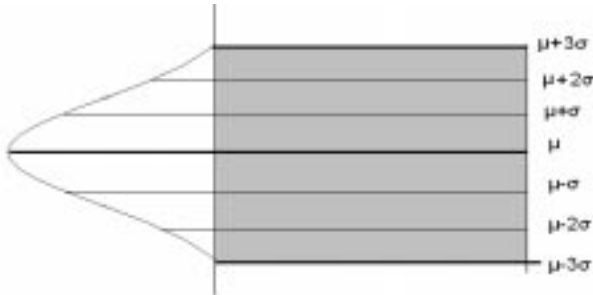
## Πρόλογος

Σκοπός αυτής της εργασίας είναι η σύγκριση των απαιτήσεων ποιότητας τεσσάρων μοντέλων βιο-

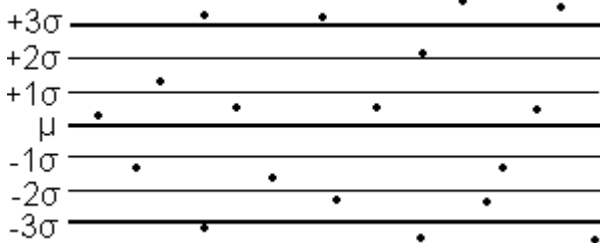
Νοσοκομείο ΙΚΑ Βραχείας Νοσηλείας - 3<sup>ο</sup> Θεραπευτήριο ΙΚΑ,<sup>1</sup> ΤΜΥ ΙΚΑ Παγκρατίου,<sup>2</sup> 7<sup>ο</sup> Νοσοκομείο ΙΚΑ,<sup>3</sup> ΤΜΥ ΙΚΑ Χαλανδρίου<sup>4</sup>

χημικών αναλυτών (WAKO 30 R, OLYMPUS AU 500, ILAB 600, ACE). Με τον όρο «απαιτήσεις ποιότητας» εννοούνται τα όρια ελέγχου και ο αριθμός των τιμών ελέγχου που απαιτούνται για μια συγκεκριμένη αναλυτική μέθοδο, με σκοπό αυτή η μέθοδος να παράγει αποτελέσματα με ιατρικώς αποδεκτή επαναληψιμότητα και ακρίβεια.

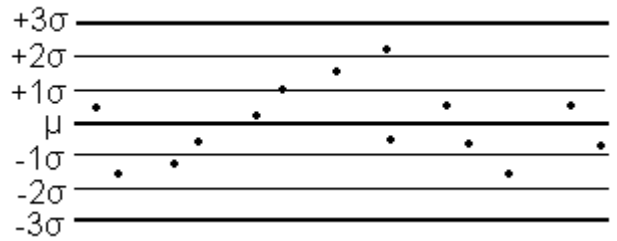
Τα όρια ελέγχου είναι γνωστά σε όλους από τα εσώκλειστα φυλλάδια των υλικών ελέγχου. Στην πράξη αναφέρονται στα όρια του γνωστού διαγράμματος Levey-Jennings<sup>1</sup> (Εικ. 1) που υπάρχει σήμερα στο λογισμικό όλων σχεδόν των αναλυτών. Η παραβίαση των ορίων αυτών καταδεικνύει αναλυτικό σφάλμα, πλην όμως ο απλός εντοπισμός της παραβίασης αυτών των ορίων δεν είναι σε καμιά περίπτωση επαρκής. Ο λόγος είναι ότι απαιτείται η διάκριση των αναλυτικών σφαλμάτων σε τυχαία και συστηματικά, αφού αυτές οι δύο κατηγορίες σφαλμάτων αντιμετωπίζονται με διαφορετικό τρόπο. Στο διάγραμμα Levey-Jennings η διάκριση των τυχαίων και συστηματικών σφαλμάτων βασίζεται στον τρόπο κατανομής των ημερήσιων τιμών ελέγχου ανάμεσα στα όρια ελέγχου του διαγράμματος (Εικ. 2, 3, 4). Επειδή η οπτική ερμηνεία του διαγράμματος Levey-Jennings είναι αρκετά υποκειμενική έχει εν πολλοίς αντικατασταθεί σήμερα από στατιστικά κριτήρια ελέγχου. Τα γνωστότερα κριτήρια ελέγχου είναι τα κριτήρια Westgard,<sup>2</sup> τα οποία είναι:<sup>3-5</sup>



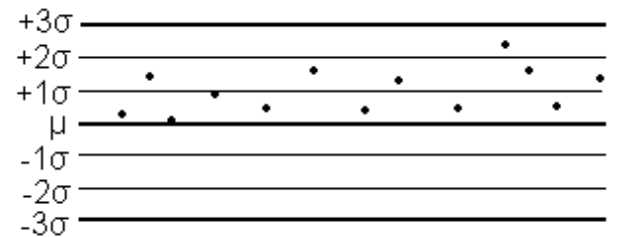
**Εικόνα 1.** Η δημιουργία του διαγράμματος Levey-Jennings όπως δημιουργείται από μια ανεστραμμένη κανονική κατανομή, η οποία ορίζεται από τα όρια ελέγχου των υλικών ελέγχου.



**Εικόνα 2.** Τα τυχαία σφάλματα στο διάγραμμα Levey-Jennings. Οι τιμές ελέγχου βγαίνουν έξω από τα όρια  $\mu \pm 3\sigma$ .



**Εικόνα 3.** Συστηματικά σφάλματα του τύπου της «ολίσθησης» (drift) στο διάγραμμα Levey-Jennings. Οι τιμές ελέγχου βαθμιαία αυξάνονται ή μειώνονται.



**Εικόνα 4.** Συστηματικά σφάλματα του τύπου της «μετατόπισης» (Shift) στο διάγραμμα Levey-Jennings. Οι τιμές ελέγχου συγκεντρώνονται από τη μία μόνο μεριά της μέσης τιμής.

**1<sub>2s</sub>.** Μία τιμή ελέγχου είναι μεταξύ  $\mu+2s$  και  $\mu+3s$  ή μεταξύ  $\mu-2s$  και  $\mu-3s$ . Είναι το κατεξοχήν κριτήριο ελέγχου που εφαρμόζεται στα Ελληνικά εργαστήρια. Ανιχνεύει τυχαία σφάλματα.

**1<sub>3s</sub>.** Δηλώνει τυχαίο σφάλμα. Εμφανίζεται όταν μία τιμή ελέγχου υπερβεί το όριο  $\mu \pm 3s$ .

**2<sub>2s</sub>.** Δηλώνει συστηματικό σφάλμα. Εμφανίζεται όταν δύο συνεχόμενες τιμές ελέγχου κυμαίνονται μεταξύ  $\mu+2s$  και  $\mu+3s$  ή μεταξύ  $\mu-2s$  και  $\mu-3s$ .

**R<sub>4s</sub>.** Δηλώνει τυχαίο σφάλμα. Εμφανίζεται όταν μία τιμή ελέγχου υπερβεί την τιμή  $\mu+2s$  και μία άλλη τιμή, όχι απαραίτητα συνεχόμενη, υπερβεί την τιμή  $\mu-2s$ .

**4<sub>1s</sub>.** Δηλώνει συστηματικό σφάλμα. Εμφανίζεται όταν τέσσερις συνεχόμενες τιμές ελέγχου κυμαίνονται μεταξύ  $\mu+1s$  και  $\mu+3s$  ή μεταξύ  $\mu-1s$  και  $\mu-3s$ .

**10 $\bar{x}$ .** Δηλώνει συστηματικό σφάλμα. Εμφανίζεται όταν δέκα συνεχόμενες τιμές ελέγχου βρίσκονται πάνω ή κάτω από τη μέση τιμή ( $\bar{x}$ ).

Ένα ή περισσότερα από τα παραπάνω κριτήρια σε συνδυασμό με τον καθημερινά χρησιμοποιούμενο αριθμό τιμών ελέγχου χαρακτηρίζεται ως μέθοδος ελέγχου ποιότητας. Οι μέθοδοι ανάλυ-

σης που χρειάζονται καθημερινά μεγάλο αριθμό τιμών ελέγχου και πολλά διαφορετικά κριτήρια ελέγχου χαρακτηρίζονται ως αναλυτικές μέθοδοι «απαιτητικών μεθόδων ποιότητας». Αυτές οι αναλυτικές μέθοδοι μπορούν να παράγουν τα ίδια αποτελέσματα με τις άλλες, περισσότερο σταθερές μεθόδους αλλά με περισσότερο κόστος και κόπο.

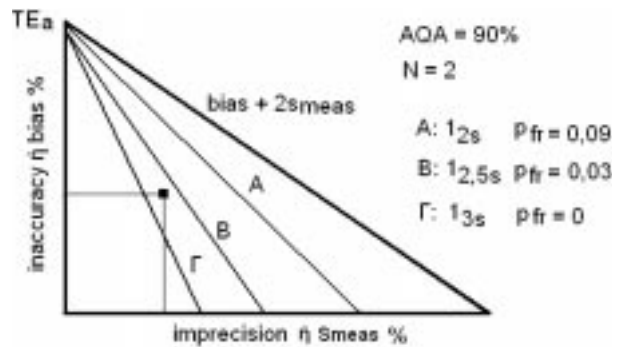
Ο χαρακτηρισμός μιας αναλυτικής μεθόδου ως περισσότερο ή λιγότερο απαιτητικής ως προς την ποιότητα αλλά και ο προσδιορισμός των κατάλληλων γι' αυτή μεθόδων ελέγχου γίνεται πολύ εύκολα με τα διαγράμματα OPSpecs. Τα διαγράμματα OPSpecs (Operating Process Specifications Curves) επινοήθηκαν το 1992 από τον J. Westgard<sup>6</sup> και χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό των πιο αποδοτικών μεθόδων ελέγχου που εντοπίζουν συστηματικά σφάλματα. Η επιλογή των μεθόδων ελέγχου στηρίζεται στις τιμές του εσωτερικού και εξωτερικού ελέγχου ποιότητας και στο ανώτερο επιτρεπτό σφάλμα (Total Error ή TE) της εξέτασης. Το TE είναι το ανώτερο σφάλμα που επιτρέπεται να έχει μια εξέταση, έτσι ώστε η τιμή της να μην οδηγεί σε εσφαλμένες ιατρικές αποφάσεις που μπορούν να θέσουν σε κίνδυνο την υγεία των ασθενών.

### Τα διαγράμματα OPSpecs

Τα διαγράμματα OPSpecs (Εικ. 5) αποτελούνται από ένα σύστημα αξόνων όπου στον κατακόρυφο άξονα βρίσκονται τιμές έλλειψης ακρίβειας (inaccuracy ή bias%) και στον οριζόντιο άξονα τιμές έλλειψης επαναληψιμότητας (imprecision ή  $s_{meas}$  %). Η τιμή  $s_{meas}$  αντιστοιχεί στο συντελεστή μεταβλητότητας (CV%) επαναλαμβανόμενων μετρήσεων των υλικών ελέγχου και βρίσκεται συνήθως εύκολα από τις τιμές ελέγχου του εσωτερικού ελέγχου ποιότητας. Αντίθετα, η τιμή bias% προέρχεται από προγράμματα εξωτερικού ελέγχου ποιότητας. Πρόκειται για την εκατοστιαία απόκλιση της τιμής του εργαστηρίου από την τιμή στόχο της συγκεκριμένης ομάδας εργαστηρίων.

Η ανώτερη τιμή του άξονα των bias% είναι το TE της συγκεκριμένης εξέτασης ενώ του άξονα  $s_{meas}$  % το TE/2. Το TE εκφράζεται συνήθως σε εκατοστιαίο ποσοστό. Διεθνώς έχουν επικρατήσει δύο σχολές ως προς τον προσδιορισμό του TE, η Ευρωπαϊκή και η Αμερικάνικη.

Στην Ευρωπαϊκή σχολή<sup>7-9</sup> προσδιορίζεται το



**Εικόνα 5.** Παράδειγμα χρήσης διαγράμματος OPSpecs. Στο διάγραμμα OPSpecs της εικόνας η πλησιέστερη λειτουργική γραμμή προς το λειτουργικό σημείο είναι η γραμμή B που αντιστοιχεί στο κριτήριο ελέγχου  $1_{2,5s}$ . Το κριτήριο  $1_{2,5s}$  έχει πιθανότητα ανίχνευσης σφάλματος  $p_{fr} = 0,03$ . Κατόπιν τούτων σύμφωνα με το διάγραμμα OPSpecs η καλύτερη μέθοδος για τη συγκεκριμένη εξέταση είναι η καθημερινή εφαρμογή του μονού κριτηρίου  $1_{2,5s}$  χρησιμοποιώντας μόνο 2 (N=2) υλικά ελέγχου ανά ημέρα. Η μέθοδος αυτή εξασφαλίζει την ανίχνευση συστηματικών σφαλμάτων με πιθανότητα 90% (AQA = 90%).

ανώτερο επιτρεπτό βιολογικό σφάλμα (Total allowable biological Error ή TEba) το οποίο εξαρτάται από τη βιολογική διακύμανση της ουσίας μέσα στον ανθρώπινο πληθυσμό ( $CV_b$ ) και οργανισμό κάθε ατόμου ( $CV_w$ ). Η τιμή του TEba ισούται με  $TEba = bias_{ba} + 1,65s_{ba}$ . Όπου  $bias_{ba} = 0,25\sqrt{CV_w^2 + CV_b^2}$  και  $s_{ba} = 0,5 CV_w$ .

Στην Αμερικάνικη σχολή<sup>10</sup> προσδιορίζεται το ανώτερο επιτρεπτό αναλυτικό σφάλμα (Total Allowable Error ή TEa) το οποίο εξαρτάται από την ανώτερη επιτρεπτή έλλειψη ακρίβειας και επαναληψιμότητας που είναι ανεκτές για μια εξέταση. Η τιμή του TEa ισούνται με  $TEa = bias + 2s_{meas}$ .

Το σύστημα των αξόνων bias,  $s_{meas}$  των διαγραμμάτων OPSpecs διασχίζεται από διάγωνες γραμμές που ξεκινούν από την κορυφή του άξονα bias% και καταλήγουν σε ένα σημείο πάνω στον οριζόντιο άξονα. Οι γραμμές αυτές ονομάζονται λειτουργικές γραμμές (operating lines).

Κάθε λειτουργική γραμμή αντιπροσωπεύει την ικανότητα ανίχνευσης συστηματικών σφαλμάτων μιας μεθόδου ελέγχου ποιότητας. Μια μέθοδος ποιότητας αποτελείται από μια σειρά κριτηρίων ελέγχου και τον αριθμό των υλικών ελέγχου που χρειάζεται να τρέχουν στον αναλυτή καθημερινά.

Από μαθηματικής απόψεως οι τιμές των λειτουργικών γραμμών υπολογίζονται από τη σχέση  $bias = TE - (\Delta SE + 1,65)s_{meas}$ , όπου  $bias$  είναι οι τιμές συστηματικών σφαλμάτων που μπορούν να ανιχνευτούν από κάθε λειτουργική γραμμή. Στην παραπάνω σχέση τα  $TE$  και  $\Delta SE$  και μόνο το  $s_{meas}$  μεταβάλλεται παίρνοντας τιμές από τον οριζόντιο άξονα, όπως ειπώθηκε προηγουμένως. Ο συντελεστής  $\Delta SE$  είναι το ανώτερο συστηματικό σφάλμα που μπορεί να ανιχνευτεί με τη μέθοδο ελέγχου της συγκεκριμένης λειτουργικής γραμμής.

Δεν έχουν όμως όλες οι λειτουργικές γραμμές την ίδια ικανότητα ανίχνευσης συστηματικών σφαλμάτων. Τα κριτήρια ελέγχου που εκφράζουν, διαφέρουν ως προς την πιθανότητα λανθασμένης ανίχνευσης σφάλματος (probability of false error ή  $p_{fr}$ ). Η λειτουργική γραμμή που ενώνει τα άκρα  $TE$  και  $TE/2$  αντιστοιχεί στην πλέον σταθερή κατάσταση όπου ισχύει:  $TE = bias + 2s_{meas}$ . Η τιμή αυτή  $TE$  ισούται με το ανώτερο επιτρεπτό σφάλμα  $Tea$  ή  $TEba$ .

Για να προσδιοριστεί η καταλληλότερη λειτουργική γραμμή για μια συγκεκριμένη εξέταση θα πρέπει να βρεθεί η σχετική θέση της πάνω στο διάγραμμα OPSpecs. Για το σκοπό αυτό προσδιορίζονται οι τιμές  $s_{meas}$  και  $bias$  κάθε εξέτασης και σημειώνεται το καρτεσιανό τους γινόμενο πάνω στο διάγραμμα. Το σημείο αυτό ονομάζεται λειτουργικό σημείο (operating point). Η λειτουργική γραμμή που βρίσκεται πάνω από το λειτουργικό σημείο προσφέρει την καταλληλότερη μέθοδο για την ανίχνευση συστηματικών σφαλμάτων, αφού εξασφαλίζει τη μικρότερη πιθανότητα  $p_{fr}$ .

Τα διαγράμματα OPSpecs διαφέρουν μεταξύ τους και ως προς την πιθανότητα να ανιχνευτούν τα αναλυτικά σφάλματα της εξέτασης με τις μεθόδους ελέγχου που προτείνουν. Η πιθανότητα αυτή ονομάζεται εγγύηση της ποιότητας της ανάλυσης (Analytical Quality Assurance ή AQA) και εκφράζεται ως εκατοστιαίο ποσοστό. Επειδή τα διαγράμματα OPSpecs χρησιμοποιούνται στην πράξη για την ανίχνευση μόνο συστηματικών σφαλμάτων, η πιθανότητα AQA% συμβολίζεται και ως AQA%SE).

Επιπλέον τα διαγράμματα OPSpecs διαφέρουν και ως προς τον αριθμό των τιμών ελέγχου (N) που θα χρειαστούν καθημερινά προκειμένου να εφαρμοστούν αποτελεσματικά οι μέθοδοι ελέγχου που προτείνουν. Γνωρίζουμε ότι π.χ. στους βιοχη-

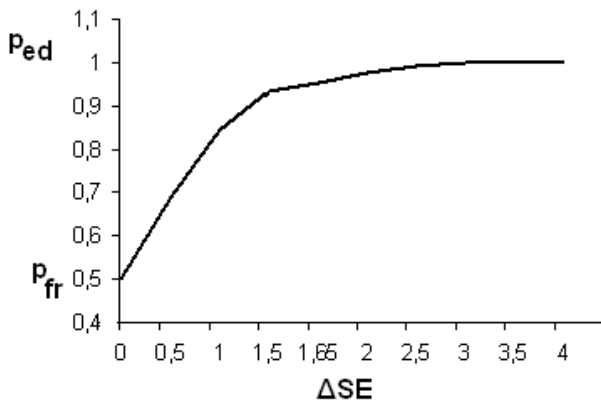
μικούς αναλυτές χρησιμοποιούνται δύο επίπεδα ελέγχου (level 1 και 2) εκ των οποίων το level 1 αντιστοιχεί στις φυσιολογικές τιμές και το level 2 στις υψηλές παθολογικές τιμές (N = 2). Διαφορετικά διαγράμματα OPSpecs δημιουργούνται για διαφορετικό αριθμό τιμών ελέγχου. Έτσι, ανάλογα με το είδος του αναλυτή και της εξέτασης, μελετώνται διαγράμματα OPSpecs που έχουν κατασκευαστεί για αριθμό τιμών ελέγχου πολλαπλάσιο από τον αρχικό αριθμό των υλικών ελέγχου. Έτσι, για τους βιοχημικούς αναλυτές μελετώνται διαγράμματα OPSpecs με N = 2, 4, 6, 8.

Σύμφωνα λοιπόν με τα παραπάνω για κάθε εξέταση μελετώνται διαφορετικά OPSpecs ανάλογα με τα  $TE$ , AQA%, και N. Το  $TE$  είναι χαρακτηριστικό για κάθε εξέταση και δεν μεταβάλλεται. Κατά συνέπεια κατά τη διαδικασία εύρεσης της καταλληλότερης μεθόδου ελέγχου δοκιμάζονται διαδοχικά διαγράμματα OPSpecs για διαφορετικά AQA και N. Αντικειμενικός σκοπός είναι να βρεθεί το διάγραμμα στο οποίο θα υπάρχει λειτουργική γραμμή πάνω από το λειτουργικό σημείο της εξέτασης. Στην πράξη δοκιμάζονται διαγράμματα OPSpecs με N = 2, 4, 6 (για βιοχημικούς αναλυτές) και AQA% = 90 ή 50.

Όταν AQA% = 50 τα κριτήρια ελέγχου εντοπίζουν συστηματικά σφάλματα με πιθανότητα μόλις 50%. Σε αυτή την περίπτωση η καθημερινή εφαρμογή του διαγράμματος Levey-Jennings και των κριτηρίων Westgard δεν επαρκεί. Το εργαστήριο θα πρέπει να χρησιμοποιήσει παράλληλα και εναλλακτικές μεθόδους ελέγχου ποιότητας που βασίζονται στα αποτελέσματα των ασθενών π.χ. διαφορές δέλτα,<sup>11</sup> ημερήσια μέση τιμή. Όταν όμως AQA% < 50 η αναλυτική μέθοδος είναι παντελώς ακατάλληλη αφού δεν υπάρχει κανένας συνδυασμός κριτηρίων ελέγχου που να την σταθεροποιεί.

Διαγράμματα OPSpecs μπορούν να βρεθούν σε σχετικά διδλία,<sup>12</sup> να παραχθούν από ειδικά προγράμματα<sup>13,14</sup> ή ακόμα και να αναζητηθούν στο διαδίκτυο ([www.Westgard.com](http://www.Westgard.com)). Εδώ θα πρέπει να διευκρινισθεί στον αναγνώστη ότι η θεωρητική ερμηνεία των διαγραμμάτων OPSpecs βασίζεται στη στατιστική και συγκεκριμένα στη θεωρία των πιθανοτήτων.<sup>15-18</sup> Η ερμηνεία τους όμως ξεφεύγει από το αντικείμενο αυτού του άρθρου.

Περίληπτικά μόνο μπορούμε να αναφέρουμε ότι τα διαγράμματα OPSpecs αποτελούν μετεξέλιξη των λεγόμενων καμπύλων ισχύος (Εικ. 6). Οι



**Εικόνα 6.** Οι καμπύλες ισχύος μιας υποθετικής μεθόδου ποιότητας.

καμπύλες ισχύος ορίζονται από ένα διπλό σύστημα αξόνων. Στην τεταγμένη αυτών βρίσκεται η πιθανότητα ανίχνευσης σφάλματος (probability of error detection ή  $p_{ed}$ ) όπου  $p_{ed} = 1 - p_{fr}$ . Στην τεταγμένη δεν βρίσκονται τιμές συστηματικών σφαλμάτων ( $\Delta SE$ ), μεταξύ άλλων και η τιμή  $\Delta SE_{crit}$ . Οι καμπύλες ισχύος που βρίσκονται μέσα στο σύστημα αξόνων εκφράζουν την πιθανότητα ανίχνευσης σφάλματος (βλ. AQA%) με μια συγκεκριμένη μέθοδο ποιότητας για διάφορα συστηματικά σφάλ-

ματα. Κάθε καμπύλη ισχύος εκφράζει μια μέθοδο ποιότητας και κατά συνέπεια αντιστοιχεί σε μια λειτουργική γραμμή των διαγραμμάτων OPSpecs.

### Υλικό και μέθοδος

Συγκρίθηκαν τέσσερις βιοχημικοί αναλυτές ILAB 600, OLYMPUS AU 500, ACE και WAKO 30R που είναι εγκατεστημένοι σε ισόριθμα εργαστήρια του ΙΚΑ. Οι αναλυτικές μέθοδοι ήταν ίδιες για όλες τις κοινές εξετάσεις των αναλυτών. Τα αντιδραστήρια παρέμειναν σταθερά κατά τη διάρκεια της συλλογής των τιμών (Πίν. 1) και επιπλέον το προσωπικό του αναλυτή, τουλάχιστον για την περίοδο των μετρήσεων, παρέμεινε το ίδιο. Ο αναλυτής ACE είναι προϊόν της εταιρείας Alfa Wassermann, ο WAKO 30R της εταιρείας WAKO Chemicals, ο OLYMPUS AU 500 της εταιρείας OLYMPUS και ο ILAB 600 της εταιρείας Instrumentation Laboratory.

Ως μέτρο της επαναληψιμότητας ( $s_{meas}$ ) χρησιμοποιήθηκε ο συντελεστής μεταβλητότητας (CV%) τουλάχιστον 15 συνεχόμενων τιμών ελέγχου από κάθε εξέταση. Αυτές οι τιμές προήλθαν από μετρήσεις των υλικών ελέγχου διαδοχικών ημερών. Αυτός ο προσδιορισμός της επαναληψιμότητας

**Πίνακας 1.** Οι κατασκευάστριες εταιρείες των αντιδραστηρίων των αναλυτών όπως χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια της μελέτης

	ACE	ILAB 600	OLYMPUS AU 500	WAKO 30R
<b>Gluc</b>	Diasys	Instrumentation laboratory	Olympus	Biosys
<b>Urea</b>	Diasys	Diasys	Medicon	Biosys
<b>Creat</b>	Alfa Wassermann	Diasys	Medicon	DiaSys
<b>UA</b>	Alfa Wassermann	Instrumentation laboratory	Medicon	Biosys
<b>Chol</b>	Diasys	Diasys	Medicon	Biosys
<b>Trig</b>	DiaSys	DiaSys	Medicon	Biosys
<b>TP</b>	Alfa Wassermann	DiaSys	Medicon	Biosys
<b>ALB</b>	DiaSys	DiaSys	Olympus	Biosys
<b>BILIT</b>	Alfa Wassermann	Diasys	Medicon	DiaSys
<b>AST</b>	ThermoDMA	DiaSys	Medicon	Biosys
<b>ALT</b>	ThermoDMA	DiaSys	Medicon	Biosys
<b>GGT</b>	Alfa Wassermann	Instrumentation laboratory	Medicon	Biosys
<b>ALP</b>	Alfa Wassermann	Diasys	Olympus	Biosys
<b>LDH</b>	Alfa Wassermann	DiaSys	DMA	Biosys
<b>CK</b>	Alfa Wassermann	DiaSys	Medicon	Med Tec
<b>Ca</b>	DiaSys	Instrumentation laboratory	Medicon	Biosys
<b>Na</b>	Alfa Wassermann	Instrumentation laboratory	Olympus	Biosys
<b>K</b>	Alfa Wassermann	Instrumentation laboratory	Olympus	Biosys

επαναλήφθηκε αρκετές φορές για κάθε αναλυτή και για τα δύο επίπεδα ελέγχου level 1 και level 2. Το τελικό  $s_{meas}$  προήλθε από τη μέση τιμή των δύο μικρότερων CV κάθε level. Η επιλογή των δύο μικρότερων τιμών CV από κάθε level έγινε με σκοπό να απαλειφθούν οι επιδράσεις τυχαίων γεγονότων κατά τη διάρκεια της μελέτης όπως π.χ. τεχνικές δλάδες, αλλαγή βάρδιας προσωπικού.

Ως μέτρο της ακρίδειας (bias) χρησιμοποιήθηκε η μέση απόσταση % από την τιμή στόχο του εξωτερικού ελέγχου ποιότητας. Και τα τέσσερα εργαστήρια συμμετείχαν στο πρόγραμμα ΕΣΕΑΠ. Αναλύθηκαν οι τιμές και δύο υλικών ελέγχου του προγράμματος ΕΣΕΑΠ πολλών διαδοχικών αποστολών (διμήνων). Το τελικό bias% για κάθε εξέταση προήλθε από τη μέση τιμή των αποστάσεων % και των δύο υλικών ελέγχου μετά την απαλοιφή των ακραίων αποστάσεων άνω των 3 τυπικών αποκλίσεων. Όλες οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν κατά το διάστημα: Σεπτέμβριος 2003 – Μάιος 2004. Η απόρριψη από τον τελικό μέσο όρο των τιμών bias% που υπερβαίνουν τις 3 τυπικές αποκλίσεις του προγράμματος ΕΣΕΑΠ εξασφαλίζει ότι τα τελικά αποτελέσματα δεν θα επηρεαστούν από τυχαία ανθρώπινα λάθη όπως είναι π.χ. η λάθος αραιώση του λυοφιλοποιημένου ορού του ΕΣΕΑΠ, η τυχαία δλάδη του αναλυτή είτε ακόμη η κακή βαθμονόμηση τη συγκεκριμένη ημέρα των μετρήσεων.

Οι τιμές TEa (Πίν. 2) προήλθαν από τους πίνακες του Αμερικανικού προτύπου CLIA (έκδοση 1998<sup>10</sup>). Για τις τιμές TEa των Ca, Na και K χρησιμοποιήθηκαν οι συγκεντρώσεις αντίστοιχα 9 mg/dl (Ca), 135 mmol/l (Na) και 3,8 mmol/l (K). Οι συγκεντρώσεις αυτές ως εκατοστιαίο ποσοστό ήταν 11% (Ca), 4% (Na) και 14% (K). Ο κατάλογος των διαγραμμάτων OPSpecs που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη προερχόταν από το βιβλίο OPSpecs Manual του J. Westgard.<sup>12</sup>

Για την ασφαλέστερη σύγκριση των τεσσάρων αναλυτών χρησιμοποιήθηκε ως επιπλέον μέτρο το ανώτερο επιτρεπτό συστηματικό σφάλμα ( $\Delta SE_{crit}$ ) το οποίο δίνεται από τη σχέση  $\Delta SE_{crit} = [(TE_a - bias)/s_{meas}] - 1,65$ . Οι τιμές του  $\Delta SE_{crit}$  σύμφωνα με τον J. Westgard<sup>12</sup>, μπορεί να πάρουν τους ακόλουθους χαρακτηρισμούς:

1. Αν το  $\Delta SE_{crit}$  είναι μικρότερο από 2, ο έλεγχος ποιότητας χαρακτηρίζεται ως «πολύ απαιτητικός». Σε αυτή την περίπτωση μικρή μόνο εκτρο-

**Πίνακας 2.** Οι τιμές του ανώτερου επιτρεπτού αναλυτικού σφάλματος (TEa) του Αμερικανικού προτύπου CLIA

<b>GOT</b>	$\mu \pm 20\%$
<b>GPT</b>	$\mu \pm 20\%$
<b>ALP</b>	$\mu \pm 30\%$
<b>LDH</b>	$\mu \pm 20\%$
<b>ALB</b>	$\mu \pm 10\%$
<b>CK</b>	$\mu \pm 30\%$
<b>Gluc</b>	$\mu \pm 10\%$
<b>Urea</b>	$\mu \pm 9\%$
<b>UA</b>	$\mu \pm 17\%$
<b>Creat</b>	$\mu \pm 15\%$
<b>Chol</b>	$\mu \pm 10\%$
<b>Trig</b>	$\mu \pm 25\%$
<b>HDL</b>	$\mu \pm 30\%$
<b>TP</b>	$\mu \pm 10\%$
<b>TBILI</b>	$\mu \pm 20\%$
<b>Ca</b>	$\mu \pm 1 \text{ mg/dl}$
<b>Na</b>	$\mu \pm 4 \text{ mmol/l}$
<b>K</b>	$\mu \pm 0,5 \text{ mmol/l}$

πή των τιμών είναι ανεκτή για τη συγκεκριμένη εξέταση και πρέπει επειγόντως να βελτιωθεί η επαναληψιμότητα και η ακρίδειά της. Εάν δεν επιτευχθεί αυτό θα πρέπει να αλλάξει η αναλυτική μέθοδος. Η μέθοδος ποιότητας της εξέτασης χρησιμοποιεί συνδυασμό πολλών κριτηρίων ελέγχου και μεγάλο αριθμό τιμών ελέγχου (N = 4, 6).

2. Αν το  $\Delta SE_{crit}$  είναι μεταξύ 2 και 3, η αναλυτική μέθοδος είναι ανεκτή αλλά υπάρχουν μεγάλα περιθώρια βελτίωσης της επαναληψιμότητας και ακρίδειας. Ο έλεγχος ποιότητας χαρακτηρίζεται ως «απαιτητικός». Η μέθοδος ποιότητας της εξέτασης χρησιμοποιεί μεγάλο αριθμό καθημερινών τιμών ελέγχου και ενδεχομένως πολύπλοκο συνδυασμό κριτηρίων ελέγχου.
3. Αν το  $\Delta SE_{crit}$  είναι μεταξύ 3 και 4, η αναλυτική μέθοδος δουλεύει ικανοποιητικά. Ο καθημερινός έλεγχος ποιότητας χαρακτηρίζεται ως «μη απαιτητικός» και απαιτεί μικρό αριθμό τιμών ελέγχου και ενδεχομένως μονά κριτήρια ελέγχου.
4. Αν το  $\Delta SE_{crit}$  είναι μεγαλύτερο από 4, ο έλεγχος ποιότητας χαρακτηρίζεται ως «απλός» αφού οι επιδόσεις της αναλυτικής μεθόδου είναι εξαιρετικές. Αρκούν μονά κριτήρια ελέγχου και δύο μόνο τιμές ελέγχου (N = 2).

### Αποτελέσματα

Στους πίνακες 3 έως 6 συνοψίζονται οι μέθοδοι ελέγχου κάθε εξέτασης για τους τέσσερις βιοχημικούς αναλυτές. Συγκεκριμένα, για κάθε εξέταση έχουν προσδιοριστεί τα καλύτερα κριτήρια ελέγχου, ο ελάχιστος αριθμός τιμών ελέγχου (N) και η αντίστοιχη εγγύηση της ποιότητας της ανά-

λυσης. Σταθερότερη εξέταση είναι εκείνη η οποία μπορεί να ελεγχθεί ικανοποιητικά με μονά κριτήρια ελέγχου, μικρό αριθμό τιμών ελέγχου (N=2) και μεγάλη εγγύηση της ποιότητας της ανάλυσης.

Με βάση τα παραπάνω, ο πιο σταθερός αναλυτής είναι ο WAKO 30R. Μόνο δύο εξετάσεις του (ουρία και αλβουμίνη) χρειάζονται περισσότε-

**Πίνακας 3.** Οι απαιτήσεις ποιότητας του αναλυτή WAKO 30R

	Επαναληψιμότητα %	Ακρίβεια %	Κριτήρια ελέγχου	N	AQA %
Gluc	1,5	0,5	$1_{3,5s}$	2	90
Urea	2,8	0,4	$1_{2s}$	4	50
Creat	2,3	3,6	$1_{3s}/2_{2s}/R_{4s}$	2	90
UA	2,0	0,5	$1_{3,5s}$	2	90
Chol	1,4	3,2	$1_{2,5s}$	2	90
Trig	2,1	1,7	$1_{3,5s}$	2	90
TP	1,3	0,7	$1_{3,5s}$	2	90
ALB	2,2	2,4	$1_{2s}$	4	90
BILIT	3,5	1,3	$1_{3s}$	2	90
AST	1,8	3,8	$1_{3,5s}$	2	90
ALT	2,6	2,1	$1_{3,5s}$	2	90
ALP	2,0	0,9	$1_{3,5s}$	2	90
LDH	1,2	0,5	$1_{3,5s}$	2	90
CK	1,1	4,8	$1_{3,5s}$	2	90
Ca	1,3	1,1	$1_{3,5s}$	2	90
Na	0,8	0,2	$1_{2,5s}$	2	90
K	1,2	1,0	$1_{3,5s}$	2	90

**Πίνακας 4.** Οι απαιτήσεις ποιότητας του αναλυτή ILAB 600

	Επαναληψιμότητα %	Ακρίβεια %	Κριτήρια ελέγχου	N	AQA %
Gluc	1,5	3,6	$1_{3s}/2_{2s}/R_{4s}$	2	90
Urea	2,5	4,3	Απαιτείται βελτίωση επαναληψιμότητας		
Creat	1,5	0,2	$1_{3,5s}$	2	90
UA	1,8	1,2	$1_{2s}$	2	90
Chol	2,6	1,8	$1_{2s}$	2	50
Trig	3,4	3,3	$1_{3,5s}$	2	90
TP	1,8	1,2	$1_{2,5s}$	2	90
ALB	2,3	1,5	$1_{3s}, 2_{2s}, R_{4s}, 4_{1s}$	4	90
BILIT	0,6	5,9	$1_{3,5s}$	2	90
AST	1,7	5,1	$1_{3,5s}$	2	90
ALT	1,3	3,2	$1_{3,5s}$	2	90
ALP	3,6	11,7	$1_{3s}/2_{2s}/R_{4s}$	2	90
LDH	1,1	2,9	$1_{3,5s}$	2	90
CK	1,2	3,4	$1_{3,5s}$	2	90
Ca	1,9	2,1	$1_{3s}$	2	90
Na	1,7	2,2	Απαιτείται βελτίωση επαναληψιμότητας		
K	1,4	2,0	$1_{3,5s}$	2	90



**Πίνακας 5.** Οι απαιτήσεις ποιότητας του αναλυτή OLYMPUS AU 500

	Επαναληψιμότητα %	Ακρίβεια %	Κριτήρια ελέγχου	N	AQA %
Gluc	2,9	1,3	1 <sub>2s</sub>	2	90
Urea	2,8	2,5	Απαιτείται βελτίωση επαναληψιμότητας		
Creat	4,6	9,2	1 <sub>2s</sub>	4	50
UA	3,2	1,2	1 <sub>2,5s</sub>	2	90
Chol	2,3	4,1	1 <sub>2s</sub>	4	50
Trig	3,1	2,9	1 <sub>3,5s</sub>	2	90
TP	2,0	0,8	1 <sub>2,5s</sub>	2	90
ALB	2,7	0,8	1 <sub>2,5s</sub>	4	90
BILIT	2,2	4,7	1 <sub>2s</sub>	2	50
AST	1,9	2,5	1 <sub>3,5s</sub>	2	90
ALT	2,9	11,6	1 <sub>2s</sub>	2	50
ALP	4,1	8,3	1 <sub>3s</sub>	2	90
LDH	2,4	0,4	1 <sub>3,5s</sub>	2	90
CK	3,3	10,8	1 <sub>3,5s</sub>	2	90
Ca	3,7	2,7	1 <sub>3s</sub> /2 <sub>2s</sub> /R <sub>4s</sub>	2	90
Na	2,2	0,2	1 <sub>2s</sub>	2	50
K	2,1	0,6	1 <sub>3,5s</sub>	2	90

**Πίνακας 6.** Οι απαιτήσεις ποιότητας του αναλυτή ACE

	Επαναληψιμότητα %	Ακρίβεια %	Κριτήρια ελέγχου	N	AQA %
Gluc	2,0	1,5	1 <sub>2s</sub>	2	90
Urea	3,9	1,7	Απαιτείται βελτίωση επαναληψιμότητας		
Creat	4,0	2,8	1 <sub>2s</sub>	4	50
UA	4,6	1,6	1 <sub>2s</sub>	2	50
Chol	2,0	2,5	1 <sub>2s</sub>	4	90
Trig	2,6	3,6	1 <sub>3,5s</sub>	2	90
TP	2,1	1,9	1 <sub>3s</sub> , 2 <sub>2s</sub> , R <sub>4s</sub> , 4 <sub>1s</sub>	4	90
ALB	1,6	6,9	Απαιτείται βελτίωση ακρίβειας		
BILIT	3,3	9,6	1 <sub>2s</sub>	2	50
AST	5,7	1,2	1 <sub>3s</sub> /2 από 3 <sub>2s</sub> /R <sub>4s</sub> /3 <sub>1s</sub> /6 $\bar{x}$	6	90
ALT	5,6	8,8	Απαιτείται βελτίωση ακρίβειας/επαναληψιμότητας		
ALP	2,6	8,2	1 <sub>3,5s</sub>	2	90
LDH	3,1	3,2	1 <sub>3s</sub>	2	90
CK	2,5	14,6	1 <sub>3s</sub> , 2 <sub>2s</sub> , R <sub>4s</sub>	2	90
Ca	2,2	1,4	1 <sub>3s</sub> , 2 <sub>2s</sub> , R <sub>4s</sub>	2	90
Na	1,1	0,8	1 <sub>2s</sub>	2	50
K	1,4	1,1	1 <sub>3,5s</sub>	2	90

ρες από δύο τιμές ελέγχου (N=4) και από αυτές μόνο η ουρία δεν εξασφαλίζει εγγύηση ποιότητας 90%. Η ουρία θα πρέπει να ελέγχεται εφεξής και με εναλλακτικές μεθόδους ποιότητας, όπως είναι η ημερήσια μέση τιμή και οι διαφορές δέλτα.

Δεύτερος σταθερότερος αναλυτής είναι ο αναλυτής ILAB 600 για τον οποίο δύο εξετάσεις, η ουρία και το νάτριο, δεν εξασφαλίζουν μέθοδο

ποιότητας που να εγγυάται τη σταθερότητά τους. Στις δύο αυτές εξετάσεις απαιτείται επειγόντως βελτίωση της επαναληψιμότητας αφού δίνουν εντελώς αναξιόπιστα αποτελέσματα. Αν αυτό δεν είναι δυνατό θα πρέπει οι δύο αναλυτικές μέθοδοι να εγκαταλειφθούν. Μία ακόμα εξέταση, η χοληστερίνη έχει πολύ μικρή AQA (50%).

Τρίτος σταθερότερος αναλυτής είναι ο OLYM-

**Πίνακας 7.** Η βαθμολόγηση των αναλυτών και των εξετάσεων με βάση την τιμή  $\Delta SE_{crit}$ 

	WAKO 30R	ILAB 600	OLYMPUS AU 500	ACE	$\Delta SE_{crit}$
<b>Trig</b>	Απλός	Απλός	Απλός	Απλός	<b>16</b>
<b>CK</b>	Απλός	Απλός	Απλός	Απλός	<b>16</b>
<b>K</b>	Απλός	Απλός	Απλός	Απλός	<b>16</b>
<b>LDH</b>	Απλός	Απλός	Απλός	Μη απαιτητικός	<b>15</b>
<b>ALP</b>	Απλός	Μη απαιτητικός	Μη απαιτητικός	Απλός	<b>14</b>
<b>ALP</b>	Απλός	Μη απαιτητικός	Μη απαιτητικός	Απλός	<b>14</b>
<b>AST</b>	Απλός	Απλός	Απλός	Πολύ απαιτητικός	<b>13</b>
<b>BILIT</b>	Μη απαιτητικός	Απλός	Απλός	Πολύ απαιτητικός	<b>12</b>
<b>UA</b>	Απλός	Απλός	Μη απαιτητικός	Πολύ απαιτητικός	<b>12</b>
<b>TP</b>	Απλός	Μη απαιτητικός	Απαιτητικός	Απαιτητικός	<b>11</b>
<b>ALT</b>	Απλός	Απλός	Πολύ απαιτητικός	Πολύ απαιτητικός	<b>10</b>
<b>Ca</b>	Απλός	Μη απαιτητικός	Πολύ απαιτητικός	Απαιτητικός	<b>10</b>
<b>Gluc</b>	Απλός	Απαιτητικός	Πολύ απαιτητικός	Απαιτητικός	<b>9</b>
<b>Creat</b>	Μη απαιτητικός	Απλός	Πολύ απαιτητικός	Πολύ απαιτητικός	<b>9</b>
<b>Chol</b>	Μη απαιτητικός	Πολύ απαιτητικός	Πολύ απαιτητικός	Απαιτητικός	<b>7</b>
<b>ALB</b>	Πολύ απαιτητικός	Απαιτητικός	Απαιτητικός	Πολύ απαιτητικός	<b>6</b>
<b>Na</b>	Απαιτητικός	Πολύ απαιτητικός	Πολύ απαιτητικός	Πολύ απαιτητικός	<b>5</b>
<b>Urea</b>	Πολύ απαιτητικός	Πολύ απαιτητικός	Πολύ απαιτητικός	Πολύ απαιτητικός	<b>4</b>
<b><math>\Delta SE_{crit}</math></b>	<b>3,4</b>	<b>3,1</b>	<b>2,4</b>	<b>2,2</b>	

PUS AU 500. Μία εξέτασή του, η ουρία, χρειάζεται επειγόντως βελτίωσή της επαναληψιμότητας ή αντικατάστασή της. Επιπλέον υπάρχουν και πέντε εξετάσεις (κρεατινίνη, χοληστερίνη, ολική χοληρυθρίνη, ALT, νάτριο) με πολύ μικρή AQA (50%) που χρειάζονται επιπλέον έλεγχο με εναλλακτικές μεθόδους.

Ο πιο ασταθής αναλυτής αποδείχθηκε ο ACE. Τρεις εξετάσεις του (ουρία, αλβουμίνη, ALT) χρειάζονται επειγόντως βελτίωση της επαναληψιμότητας και της ακρίβειας ενώ άλλες τέσσερις εξετάσεις (κρεατινίνη, ουρικό οξύ, χοληρυθρίνη, νάτριο) έχουν μικρή AQA (50%) και χρειάζονται περαιτέρω έλεγχο με εναλλακτικές μεθόδους.

Από τη βαθμολόγηση των εξετάσεων και των αναλυτών με τη μέτρηση του  $\Delta SE_{crit}$  επιβεβαιώθηκαν οι προηγούμενες παρατηρήσεις (Πίν. 7). Το μέγεθος του  $\Delta SE_{crit}$  για τους τέσσερις αναλυτές είναι αντίστοιχα: WAKO 30R (3,4), ILAB 600 (3,1), OLYMPUS AU 500 (2,4) και ACE (2,2). Από τις επιμέρους εξετάσεις λιγότερο απαιτητικές ως προς την ποιότητα ήταν οι: Trig, CK, K. Ακολουθούν οι LDH, ALP, AST, BILIT, UA, TP, ALT, Ca, Creat, Gluc, Chol, ALB, Na, Urea. Στον πίνακα 8 φαίνεται ότι η σταθερότητα των επιμέρους εξετάσεων είναι διαφορετική για κάθε αναλυτή.

**Πίνακας 8.** Η σχετική ταξινόμηση των εξετάσεων με βάση την τιμή  $\Delta SE_{crit}$ . Από πάνω προς κάτω μειώνεται η σταθερότητα των εξετάσεων και αυξάνουν οι απαιτήσεις του ελέγχου ποιότητας

OLYMPUS	WAKO	ACE	ILAB
AST	CK	K	BILIT
LDH	LDH	ALP	CK
BILIT	ALP	Trig	LDH
Trig	Trig	CK	ALT
K	K	LDH	Creat
CK	AST	Gluc	UA
ALP	UA	Ca	AST
UA	Ca	TP	K
TP	TP	Chol	Trig
ALB	ALT	UA	ALP
Gluc	Gluc	AST	TP
ALT	BILIT	BILIT	Ca
Chol	Creat	Creat	Gluc
Urea	Chol	Na	ALB
Ca	Na	ALT	Chol
Na	ALB	ALB	Urea
Creat	Urea	Urea	Na

### Συμπέρασμα – Συζήτηση

Πρωταρχικός σκοπός της εργασίας μας ήταν να αποκτήσουν τα συμμετέχοντα εργαστήρια τις κα-

λύτερες δυνατές μεθόδους ποιότητας που θα καταστήσουν τα αποτελέσματά τους αξιόπιστα. Η διαδικασία αξιολόγησης όμως των μεθόδων ποιότητας δεν σταματάει εδώ.

Όλες οι μέθοδοι ποιότητας που επιλέγηκαν με τα διαγράμματα OPSpecs πρέπει στη συνέχεια να εφαρμοστούν. Αφού εφαρμοστούν πιστά για εύλογο χρονικό διάστημα, το εργαστήριο θα πρέπει να επαναλάβει τις μετρήσεις επαναληψιμότητας και ακρίβειας. Με τα αποτελέσματα των νέων μετρήσεων και τη βοήθεια των διαγραμμάτων OPSpecs, το εργαστήριο θα επαναπροσδιορίσει τις μεθόδους ποιότητας που καλύπτουν τις νέες ανάγκες του. Λογικά, οι νέες μέθοδοι ποιότητας που θα επιλεγούν θα είναι ακόμα καλύτερες από τις πρώτες σε ό,τι αφορά τον κόπο (μικρότερος αριθμός ημερήσιων τιμών ελέγχου) αλλά και την απόδοση (μεγάλη εγγύηση ποιότητας και μικρή πιθανότητα λανθασμένης απόρριψης).

Επαναλαμβάνοντας αυτόν τον κύκλο των επαναξιολογήσεων όλο και περισσότερες εξετάσεις θα έχουν 90% εγγύηση ποιότητας, τα κριτήρια ελέγχου θα είναι τα απλούστερα δυνατά ενώ ο αριθμός των απαιτούμενων τιμών ελέγχου θα περιοριστεί στις δύο μετρήσεις που γίνονται έτσι και αλλιώς κάθε πρωί. Το εργαστήριο τότε θα έχει αποκτήσει τις πλέον σταθερές αναλυτικές μεθόδους. Η κατάσταση αυτή θα ανατραπεί όταν συμβεί μια αλλαγή στις συνθήκες ανάλυσης (π.χ. νέα αντιδραστήρια ή νέος αναλυτής) οπότε θα ξεκινήσει μια νέα διαδικασία αξιολόγησης.

Εδώ πρέπει να τονιστεί ότι οι εξετάσεις με μεγάλες απαιτήσεις ποιότητας δεν οδηγούν υποχρεωτικά σε λανθασμένα αποτελέσματα. Αν το εργαστήριο ικανοποιήσει αυτές τις αυξημένες απαιτήσεις ποιότητας, σε ό,τι αφορά τα κριτήρια ελέγχου και τον αριθμό των τιμών ελέγχου, οι εξετάσεις αυτές θα παράγουν εξίσου σωστά αποτελέσματα με άλλες εξετάσεις λιγότερο απαιτητικές.

Θα αναρωτιέται κάποιος γιατί να μην εφαρμόζει το εργαστήριο όλα τα κριτήρια Westgard για το σύνολο των εξετάσεών του. Το ερώτημα αυτό είναι εύλογο μια που οι σύγχρονοι αναλυτές περιέχουν συνήθως στο λογισμικό τους όλα τα κριτήρια ελέγχου αλλά και ακόμα περισσότερα. Κι όμως στις περισσότερες περιπτώσεις το λογισμικό τους δίνει τη δυνατότητα στο χρήστη να επιλέξει ποια κριτήρια θέλει να χρησιμοποιήσει. Οι κατασκευαστές

δηλαδή μας παροτρύνουν να επιλέξουμε τις μεθόδους ποιότητας που επιθυμούμε.

Ο λόγος είναι ότι οι εξετάσεις που έχουν μεγάλη σταθερότητα, δηλαδή άριστη επαναληψιμότητα και ακρίβεια, μπορούν να ελεγχθούν ικανοποιητικά με μονά κριτήρια ελέγχου (π.χ.  $1_{2s}$  ή  $1_{3s}$ ). Άλλες πάλι εξετάσεις έχουν εξαιρετικά μεγάλο ανώτερο επιτρεπτό σφάλμα, με αποτέλεσμα να επιτρέπεται μια κάποια ελαστικότητα ως προς τα κριτήρια ελέγχου που θα χρησιμοποιηθούν.

Η επιλογή των κριτηρίων όμως πρέπει να γίνεται με αυστηρά επιστημονικές μεθόδους. Πρέπει να αποφεύγεται η εμπειρική επιλογή των μεθόδων ποιότητας. Κατά κανόνα μια τέτοια επιλογή περιορίζεται στην επιλογή των ορίων ελέγχου. Συνηθίζεται πολλοί εργαστηριακοί να επιλέγουν εμπειρικά ανάλογα με την εξέταση ή τον αναλυτή ένα από τα όρια ελέγχου  $\pm 3s$ ,  $\pm 2,5s$ ,  $\pm 2s$  τα οποία αντιστοιχούν στα κριτήρια ελέγχου ( $1_{3s}$ ,  $1_{2,5s}$ ,  $1_{2s}$ ). Συνήθως μια τέτοια επιλογή δεν έχει κάποια στατιστική βάση με εξαίρεση ίσως την εμπειρική προσέγγιση του ανώτερου επιτρεπτού ολικού σφάλματος της εξέτασης με βάση τις τιμές αναφοράς της. Μια τέτοια προσέγγιση είναι σίγουρα λανθασμένη αφού δεν λαμβάνεται υπόψη το πραγματικό ανώτερο ολικό σφάλμα, την πιθανότητα ανίχνευσης σφάλματος και την πιθανότητα λανθασμένης απόρριψης. Για όλους αυτούς τους λόγους τα διαγράμματα OPSpecs είναι απαραίτητα.

Ακόμα μεγαλύτερα προβλήματα δημιουργούνται όταν πρέπει να επιλεγεί ο καθημερινός αριθμός τιμών ελέγχου ανά εξέταση. Συνήθως τα εργαστήρια περιορίζονται στα δύο επίπεδα που τρέχουν κάθε πρωί ή έχουν καθιερώσει περιοδικό επανέλεγχο με τρέξιμο νέων υλικών ελέγχου στην αρχή κάθε βάρδιας (π.χ. στην εφημερία). Μια τέτοια πρακτική προκαλεί είτε ελλιπή έλεγχο ποιότητας είτε «υπερβολικό» έλεγχο ποιότητας που στοιχίζει κόπο και χρήμα. Και εδώ τα διαγράμματα OPSpecs μπορούν να υπολογίσουν σωστά τον ελάχιστο απαιτούμενο αριθμό τιμών ελέγχου ανά εξέταση.

Πιστεύουμε ότι τα διαγράμματα OPSpecs θα πρέπει να μπουν στην καθημερινή πρακτική των ιατρικών εργαστηρίων στη χώρα μας. Ο στατιστικά τεκμηριωμένος έλεγχος ποιότητας θα είναι σίγουρα το ζητούμενο τα επόμενα χρόνια δεδομένης της συζήτησης που έχει ήδη ανοίξει για τη διαπίστευση των ιατρικών εργαστηρίων.

## SUMMARY

### **Comparison of quality control requirements of four biochemical analyzers with the use of OPSpecs diagrams, and the critical systematic errors**

P. KARKALOUSOS,<sup>1</sup> D. VOURTSIS,<sup>2</sup> L. TSOUKALAS,<sup>3</sup> ? ANTONIOU<sup>4</sup>

*3rd Hospital of Social Security Institute (SSI),<sup>1</sup> Local Healthcare Unit of SSI in Pagkrati,<sup>2</sup> 7th Hospital of SSI,<sup>3</sup> Local Healthcare Unit of SSI in Halandri,<sup>4</sup> Athens, Greece*

Since 1992, the diagrams of the operating process specifications curves (OPSpecs) are used widely for the selection of the best control methods for each test. OPSpecs diagrams ensure the best analytical performance and estimate the simplest and easiest control methods with the largest probability of error detection and the smallest probability of false rejection. In this study, OPSpecs diagrams were used to compare the analytical performance and the quality requirements of four biochemical analyzers: WAKO 30R, OLYMPUS 500, ILAB 600 and ACE. The most suitable control criteria, the necessary number of control values and the analytical quality assurance of the tests of the four analyzers were ascertained. In addition, the critical systematic error ( $\Delta SE_{crit} = [(TE_a - bias)/s_{meas}] - 1.65$ ) of each test was calculated, in order to evaluate their analytical performance. The imprecision ( $s_{meas}$  or CV) of each test was calculated by the daily values of internal quality control. The measurements were repeated several times for both control levels. The final imprecision value was the mean value of the two smallest CV. The inaccuracy (bias) value was derived from the external quality control values. The final inaccuracy value was the mean of the differences between the laboratory values and the target values of the peer groups. The outlier distances up to three standard deviations were discarded. All the laboratories of the four analyzers participated in the same external quality control program. It was also estimated how many tests of each analyzer needed immediate improvements in precision and accuracy because of results which were totally unreliable. The numbers of these tests were: zero for WAKO 30 R, one for OLYMPUS AU 500, two for ILAB 600 and three for ACE. By using the  $\Delta SE_{crit}$  value the analyzers were classified (starting from the most stable) as follows: WAKO 30R, ILAB 600, OLYMPUS au 500, ACE. The  $\Delta SE_{crit}$  value of each test was also evaluated, using the mean value of the four machines. The most stable analytes proved to be CK, Trig, K, followed by LDH, ALP, AST, Bilit, UA, TP, ALT, Ca, Creat, Gluc, Chol, ALB, Na, Urea. The unstable analytes demand a lot of effort and money in order to produce medically reliable results, due mainly to the many daily control repetitions and the complicated control criteria they require.

ACTA MICROBIOLOGICA HELLENICA 2006, 51 (1): 42-53

### **Βιβλιογραφία**

1. Levey S, Jennings E. The use of control charts in the clinical laboratory. *Am J Clin Pathol* 1950, 20:1059
2. Westgard J, Tongry G, et al. A multirule Shewhart chart for quality control in clinical chemistry. *Clin Chem* 1981, 27/3, 493-501
3. Bishop J, Nix A. Comparison of quality-control rules used in clinical chemistry laboratories. *Clin Chem* 1993, 39/8, 1638-1649
4. Radin N. The multi-rule Shewhart chart for quality control. *Clin Chem* 1996, 30/6, 1103-1104
5. Westgard J. Selecting appropriate quality-control rules. *Clin Chem* 1994, 40:3, 499-500
6. Westgard J. Charts of operational process speci-

- cations ("OPSpecs Charts") for assessing the precision, accuracy, and quality control needed to satisfy proficiency testing performance criteria. *Clin Chem* 1992, 38: 1226-1233
7. Ricos C, Alvarez V, Cava F, Garcia-Lario J, Hernandez A, Jimenez C, Minchinela J, Perich C, Simon M. Current databases on biological variation: Pros, cons and progress. *Scand J Clin Lab Invest* 1999, 59:491-500
  8. Fraser C, Hyltoft Petersen P, Ricos C, Haekel R. Proposed quality specifications for the imprecision and inaccuracy of analytical systems for clinical chemistry. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1992, 30:311-317
  9. Hyltoft Petersen P, Ricos C, Stockl D, Libeer J, Baadenhuijsen H, Fraser C, Thienpont L. Proposed guidelines for the internal quality control of analytical results in the medical laboratory. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1996, 34:983-999
  10. Westgard J. CLIA Final rules. Wisconsin, 2004
  11. Καρκαλούσος Π. Μέθοδοι εντοπισμού μη αναλυτικών σφαλμάτων στο εργαστήριο κλινικής χημείας. *Εφαρμ Κλιν Μικροβ Εργ Διαγν* 2004, 9(3):118-119
  12. Westgard J. OPSpecs Manual. Wisconsin, Expanded Edition 1996
  13. Westgard J, Stein B, Westgard S, Kennedy R. QC validator 2.0: A computer program for automatic selection of statistical QC procedures for applications in healthcare laboratories. *Computer Methods and Programs in Biomedicine* 1997, 53:175-186
  14. [www.westgard.com/ezruns.html](http://www.westgard.com/ezruns.html)
  15. Westgard JO, Tongry G, et al. A multirule Shewhart chart for quality control in clinical chemistry. *Clin Chem* 1981, 27/3, 493-501
  16. Parvin C. New insight into the comparative power of quality-control rules that use control observations within a single analytical run. *Clin Chem* 1993, 39/3, 440-447
  17. Parvin C. Comparing the power of quality-control rules to detect persistent systematic error. *Clin Chem* 1992, 38/3, 358-363
  18. Parvin C. Comparing the power of quality-control rules to detect persistent random error. *Clin Chem* 1992, 38/3, 364-369

### Αγγλοελληνικό λεξιλόγιο

**AQA%:** Analytical Quality Assurance. «Η εγγύηση της ποιότητας της ανάλυσης». Πρόκειται για την πιθανότητα ανίχνευσης σφάλματος  $p_{ed}$  με την οποία υπολογί-

στηκαν τα ανώτερα επιτρεπτά συστηματικά σφάλματα των διαγραμμάτων OPSpecs. Η επιλογή του AQA θέτει τις προδιαγραφές ποιότητας για τα διαγράμματα OPSpecs.

**$\Delta RE_{crit}$ :** «Ανώτερο επιτρεπτό τυχαίο σφάλμα». Το μεγαλύτερο τυχαίο σφάλμα ενός αναλυτικού προσδιορισμού που δεν θέτει σε κίνδυνο την υγεία του ασθενούς.

**$\Delta SE_{crit}$ :** «Ανώτερο επιτρεπτό συστηματικό σφάλμα». Το μεγαλύτερο συστηματικό σφάλμα ενός αναλυτικού προσδιορισμού που δεν θέτει σε κίνδυνο την υγεία του ασθενούς.

**Inaccuracy ή Bias:** «Συστηματικό σφάλμα ή μεροληψία». Πρόκειται για τη διαφορά ανάμεσα στην τιμή που μετρήθηκε και την πραγματική τιμή. Υπολογίζεται από τα προγράμματα εξωτερικού ελέγχου ποιότητας. Είναι συνώνυμο με την έννοια της έλλειψης ακρίβειας.

**OPSpecs chart:** Operating process specifications curves. «Λειτουργικό διάγραμμα». Χρησιμοποιείται για την επιλογή της κατάλληλης μεθόδου ελέγχου ποιότητας με βάση το αποδεκτό ολικό αναλυτικό σφάλμα, την έλλειψη ακρίβειας και επαναληψιμότητας της μεθόδου για καθορισμένο επίπεδο αξιοπιστίας.

**TE:** Total Analytical Error. «Ολικό αναλυτικό σφάλμα». Υπολογίζεται από τη σχέση  $TE = bias + 2\sigma$ . Πρόκειται για το ολικό σφάλμα μιας μεθόδου προσδιορισμού και εξαρτάται από την έλλειψη ακρίβειας (bias) και την έλλειψη επαναληψιμότητας ( $\sigma$ ).

**$\Delta RE$ :** «Μέγεθος τυχαίου σφάλματος». Μετρείται είτε ως ποσοστό % είτε με μονάδες τυπικής απόκλισης.

**$\Delta SE$ :** «Μέγεθος συστηματικού σφάλματος». Μετρείται είτε ως ποσοστό % είτε με μονάδες σταθερής απόκλισης.

**Levey-Jennings chart:** «Διάγραμμα ελέγχου κατά Levey-Jennings». Περιλαμβάνει την αποτύπωση των καθημερινών τιμών ελέγχου πάνω σε διάγραμμα, το οποίο χωρίζεται σε οριζόντια τμήματα με βάση τη μέση τιμή  $\mu$  και τη σταθερή απόκλιση  $\sigma$  (+3 $\sigma$ , +2 $\sigma$ , +1 $\sigma$ ,  $\mu$ , -3 $\sigma$ , -2 $\sigma$ , -1 $\sigma$ ).

**Operating lines:** «Λειτουργική γραμμή». Πρόκειται για σειρές γραμμών που διασχίζουν τα διαγράμματα OPSpecs ξεκινώντας από την κορυφή της τεταγμένης όπου βρίσκεται το  $TE_{PT}$  και καταλήγοντας στην τεταγμένη σε ένα σημείο  $s_{meas}$ . Κάθε λειτουργική γραμμή αντιστοιχεί σε διαφορετική μέθοδο ελέγχου ποιότητας.

**Imprecision ή  $s_{meas}$ :** «Έλλειψη επαναληψιμότητας». Περιγράφει την έλλειψη της επαναληψιμότητας της αναλυτικής μεθόδου, το οποίο ισούται με το συνολικό τυχαίο σφάλμα. Εκφράζεται σε επί τοις εκατό.

**Operating point:** «Λειτουργικό σημείο». Σημείο πάνω στο διάγραμμα OPSpecs που υποδηλώνει τη θέση του εργαστηρίου ως προς τη δική του επαναληψιμότητα και ακρίβεια. Το λειτουργικό σημείο συγκρίνεται με πλήθος λειτουργικών γραμμών (operating lines) που αντιστοιχούν σε διάφορες μεθόδους ελέγχου.

# Συχνότητα εμφάνισης λοιμώξεων σε νεοϊδρυθείσα μονάδα εντατικής θεραπείας

Μ. Χωριανοπούλου,<sup>1</sup> Α. Τσελένη-Κωτσοβίλη,<sup>3</sup> Π. Τάσιος,<sup>3</sup> Ε. Παπαφράγκας,<sup>2</sup>  
Σ. Λαμπρόπουλος,<sup>1</sup> Ν.Ι. Λεγάκης<sup>3</sup>

Ο σκοπός της εργασίας αυτής ήταν να μελετηθεί η συχνότητα εμφάνισης λοιμώξεων σε νεοϊδρυθείσα Μονάδα Εντατικής Θεραπείας. Κατά τη διάρκεια 3 μηνών (Οκτώβριος-Δεκέμβριος 2000) νοσηλεύτηκαν 35 ασθενείς (άνδρες 20, γυναίκες 15, μέση ηλικίας 47,5 έτη) σε νεοϊδρυθείσα ΜΕΘ δύναμης 12 κρεβατιών. Συνολικά έγιναν 120 καλλιέργειες βρογχικών εκκρίσεων, 150 καλλιέργειες ούρων και 66 ζεύγη αιμοκαλλιεργειών με την κλασική μεθοδολογία. Από τους 35 ασθενείς, αποικίστηκαν με Gram (-) μικρόβια οι 29 και από αυτούς μόνο 13 ασθενείς ανέπτυξαν πνευμονία σχετιζόμενη με τον αναπνευστήρα (Ventilated Associated Pneumonia, VAP) (38%). Στις πνευμονίες υπερετερούσαν πολυανθεκτικά στελέχη *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, και *K. pneumoniae*. Όσον αφορά στο ουροποιητικό σύστημα από τους 35 ασθενείς αποικίστηκε το 6% με Gram (-) και 14% με *C. albicans*, ενώ ουρολοιμώξη εμφάνισαν 4 ασθενείς (11%). Από τους αποικισθέντες, βακτηριαμία ανέπτυξαν οι 3 από τους 35 ασθενείς (9%). Από τις καλλιέργειες ούρων και αίματος απομονώθηκαν πολυανθεκτικά *E. coli*, *P. aeruginosa* και *K. pneumoniae*.

ΔΕΛΤΙΟΝ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΕΤΑΙΡΕΙΑΣ 2006, 51 (1): 54-57

## Εισαγωγή

Το σύνολο των μικροοργανισμών που αποικίζουν το ανθρώπινο σώμα και τους βλεννογόνους αποτελούν τη φυσιολογική χλωρίδα, η οποία διακρίνεται σε μόνιμη και παροδική. Η χλωρίδα είναι πολύπλοκη και αποτελείται από πληθώρα μικροο-

γανισμών (κυρίως βακτήρια και μύκητες) για κάθε συγκεκριμένη ανατομική περιοχή και ηλικία.<sup>1</sup> Η σύνθεσή της διέπεται από ρυθμιστικούς μηχανισμούς συμβίωσης και ανταγωνισμού μεταξύ αυτών καθεαυτών των μικροοργανισμών αλλά και μεταξύ μικροοργανισμών και μεγαλοοργανισμού. Η αναερόβιος χλωρίδα βρίσκεται σε δυναμική ισορροπία με τα εντεροβακτηριακά στο γαστρεντερικό σωλήνα. Η διαταραχή αυτής της ισορροπίας συμβάλλει στην παθολογική υπερανάπτυξη των ανθεκτικών μικροοργανισμών. Αποικισμός ασθενών

Μονάδα Εντατικής Θεραπείας<sup>1</sup> και Εργαστήριο Κλινικής Μικροβιολογίας, ΓΠΝΑ "Σισμανόγλειο",<sup>2</sup> Εργαστήριο Μικροβιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Αθηνών, Αθήνα<sup>3</sup>

με παθογόνους μικροοργανισμούς συμβαίνει σε σύντομο χρονικό διάστημα μετά την εισαγωγή στο νοσοκομείο και ειδικά στη ΜΕΘ. Η έκθεση στα παθογόνα και ο αποικισμός των ασθενών από παθογόνους μικροοργανισμούς συχνά οδηγεί σε σοβαρές λοιμώξεις. Έναντι αυτών των περιπτώσεων, η φυσιολογική χλωρίδα δρα προστατευτικά με τους παρακάτω μηχανισμούς:

α) Ανταγωνισμός στους υποδοχείς για την προσκόλληση στα κύτταρα του ξενιστή. Σε ορισμένες σοβαρές καταστάσεις (ανοσοκαταστολή, κακοήθειες, εξεργασίες, μεγάλες χειρουργικές επεμβάσεις, εγκαύματα) εκκρίνονται με το σίελο πρωτεολυτικά ένζυμα που διασπούν τη φιμπρονεκτίνη. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τον αποικισμό του ανώτερου αναπνευστικού συστήματος με Gram- αρνητικά μικρόβια. β) Ανταγωνισμός στην πρόσληψη θρεπτικών ουσιών - διατροφή, γ) παραγωγή βακτηριοσινών, δ) παραγωγή πτητικών λιπαρών οξέων και άλλων τοξικών μεταβολιτών, και ε) συνεχής διέγερση του ανοσιακού συστήματος ώστε να διατηρεί σε χαμηλά και σταθερά επίπεδα τα μόρια της κλάσης II του μείζονος συστήματος ιστοσυμβατότητας (MHC-DR) στα μακροφάγα. Καθήκον του κλινικού γιατρού είναι να προσδιορίσει αν υπάρχει λοίμωξη ή αν απλά ο ασθενής είναι αποικισμένος από παθογόνους μικροοργανισμούς, δεδομένου ότι στη βιβλιογραφία αναφέρεται ότι η χορήγηση αντιβιοτικών κρίνεται μη απαραίτητη στο 50% των περιπτώσεων.<sup>2</sup> Από την άλλη δέβαια η ικανότητα των ασθενών που νοσηλεύονται στη ΜΕΘ να αντιμετωπίσουν λοιμώξεις υστερεί. Οι μηχανισμοί άμυνας μειονεκτούν λόγω υποκείμενων νοσημάτων ή λόγω παθολογικών και χειρουργικών παρεμβάσεων. Σκοπός της εργασίας μας είναι η μελέτη της συχνότητας εμφάνισης λοίμωξης σε ασθενείς που νοσηλεύονται σε νεοϊδρυθείσα ΜΕΘ.

## Υλικό και μέθοδος

Κατά τη διάρκεια 3 μηνών (Οκτώβριος-Δεκέμβριος 2000) νοσηλεύτηκαν 35 ασθενείς (άνδρες 20, γυναίκες 15, μέσης ηλικίας 47,5 έτη) σε νεοϊδρυθείσα ΜΕΘ δύναμης 12 κρεβατιών. Απ' αυτούς, 10/35 (30%) είχαν χειρουργικό νόσημα, 13/33 (40%) αναπνευστικό και 10/33 (30%) παθολογικό. Μέσος χρόνος νοσηλείας ήταν οι 46 ημέρες. Τα κλινικά δείγματα εξετάζονταν στο μικροβιολο-

γικό εργαστήριο καθημερινά τις 3 πρώτες ημέρες και στη συνέχεια ανά τριήμερο. Συνολικά έγιναν 120 καλλιέργειες βρογχικών εκκρίσεων, 150 καλλιέργειες ούρων και 66 ζεύγη αιμοκαλλιεργειών με την κλασική μεθοδολογία. Η ταυτοποίηση και η ευαισθησία των μικροβίων στα αντιβιοτικά έγινε σύμφωνα με τις υποδείξεις της ASM και της NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards).

## Αποτελέσματα

Από τους 35 ασθενείς, αποικίστηκαν με Gram (-) μικρόβια οι 29 και από αυτούς μόνο 13 ασθενείς ανέπτυξαν VAP (38%). Στις πνευμονίες υπερερούσαν πολυανθεκτικά στελέχη *A. baumannii*, *P. aeruginosa* και *K. pneumoniae*.

Όσον αφορά στο ουροποιητικό σύστημα από τους 35 ασθενείς αποικίστηκε το 6% με Gram (-) και 14% με *C. albicans*, ενώ ουρολοίμωξη εμφάνισαν 4 ασθενείς (11%).

Από τους αποικισθέντες, βακτηριαμία ανέπτυξαν οι 3 από τους 35 ασθενείς (9%). Από τις καλλιέργειες ούρων και αίματος απομονώθηκαν πολυανθεκτικά *E. coli*, *P. aeruginosa* και *K. pneumoniae*.

## Συζήτηση

Η πνευμονία στη ΜΕΘ παρουσιάζει υψηλή θνητότητα και τις περισσότερες φορές σχετίζεται με τη χρήση του αναπνευστήρα. Η διάγνωση της πνευμονίας της σχετιζόμενης με τον αναπνευστήρα (ventilator-related-pneumonia, VAP) είναι δύσκολη. Διάφορες υποθέσεις υπάρχουν σχετικά με την αιτιολογία της VAP. Οποσδήποτε, ο αποικισμός της τραχείας στους διασωληνωμένους αρρώστους ευνοεί την πρόσβαση των μικροβίων στο κατώτερο αναπνευστικό.

Στη βιβλιογραφία γίνεται μεγάλη συζήτηση όσον αφορά στη διάγνωση της VAP, ιδιαίτερα όσον αφορά στη σύγκριση μεταξύ των δειγμάτων που λαμβάνονται με επεμβατικές τεχνικές και με τραχειακή αναρρόφηση. Η ποσοτική καλλιέργεια των ενδοτραχειακών αναρροφήσεων παρουσιάζει μια σχετική ευαισθησία 70% και σχετική ειδικότητα 72% στη διάγνωση της VAP.<sup>3</sup>

Τα δείγματα που αξιολογούνται είναι αυτά που έχουν λιγότερα από 10 επιθηλιακά κύτταρα και/

ή περισσότερα από 25 λευκοκύτταρα ανά οπτικό πεδίο.<sup>4</sup> Μία πολυπαραγοντική μελέτη που δημοσιεύτηκε από τον Timsit, αναγνωρίζει τρεις παράγοντες που σχετίζονται με την VAP: α) τη μείωση του λόγου PaO<sub>2</sub>/FIO<sub>2</sub><50 mm Hg, β) την παρουσία περιφερικών ρυπαρών εκκρίσεων και γ) τη διατήρηση των εκκρίσεων από περιφερικό βρόγχο κατά τη διάρκεια της εκπνοής μετά από τη βρογχοκυψελιδική έκπλυση. Η παρουσία δύο τουλάχιστον από τα παραπάνω υποδηλώνει πνευμονία με 94% ευαισθησία και 89% ειδικότητα.<sup>5</sup> Στη μελέτη μας αξιολογήθηκαν οι ανωτέρω παράγοντες για τη διάγνωση της VAP. Έτσι, από τους 35 ασθενείς αποικίστηκαν με Gram (-) μικρόβια οι 29 και από αυτούς μόνο 13 ασθενείς ανέπτυξαν VAP (38%).

Η διάγνωση της ουρολοίμωξης σε ασθενή της ΜΕΘ έχει επίσης ευρέως συζητηθεί στη βιβλιογραφία. Μια καλλιέργεια ούρων πρέπει πάντα να συνοδεύεται από γενική ούρων. Έτσι, μία αρνητική γενική ούρων με θετική καλλιέργεια δημιουργεί έντονα την υποψία αποικισμού του ουροκαθετήρα ή επιμόλυνσης της ουροκαλλιέργειας. Στην περίπτωση αυτή, πρέπει να αλλάζεται ο ουροκα-

θετήρας και να επαναλαμβάνεται η καλλιέργεια ούρων. Αν και τα δύο είναι θετικά, τότε τίθεται η διάγνωση της ουρολοίμωξης και πρέπει να χορηγείται αντιμικροβιακή αγωγή καθώς και να αλλάζεται ο ουροκαθετήρας. Επειδή οι ασθενείς της ΜΕΘ φέρουν ουροκαθετήρα και λαμβάνουν ευρέως φάσματος αντιβιοτικά, συχνά αναπτύσσουν καντιντουρία η οποία όχι σπάνια μπορεί να εξελιχθεί σε καντινταμία.<sup>6,8</sup> Στη δική μας μελέτη αποικίστηκαν 6% με Gram (-), και 14% με *C. albicans* και 4/35 (11%) από τους αποικισθέντες έπαθαν ουρολοίμωξη.

Όσον αφορά στη βακτηριαιμία, οι ασθενείς της ΜΕΘ παρουσιάζουν αυξημένη συχνότητα λόγω της συχνής τοποθέτησης κεντρικών γραμμών. Στη δική μας μελέτη, 3/35 (9%) των ασθενών ανέπτυξαν βακτηριαιμία στη χρονική διάρκεια παρακολούθησής τους. Σύμφωνα με βιβλιογραφικά δεδομένα, η συχνότητα εμφάνισης πνευμονίας σε ήδη λειτουργούσα ΜΕΘ είναι 40%, των ουρολοιμώξεων 24% και των βακτηριαιμιών 11%.<sup>7,9</sup> Φαίνεται λοιπόν ότι μία νεοϊδρυθείσα ΜΕΘ δεν διαφέρει όσον αφορά στη συχνότητα εμφάνισης λοίμωξης από μία ήδη λειτουργούσα.

## SUMMARY

### ***Incidence of appearance of infections in a newly established intensive care unit***

M. CHORIANOPOULOU,<sup>1</sup> A. TSELENI-KOTSOVILI,<sup>3</sup> P. TASIOS,<sup>3</sup> E. PAPAFRAGAS,<sup>2</sup>  
S. LAIROPOULOS,<sup>1</sup> N.I. LEGAKIS<sup>3</sup>

*Intensive Care Unit<sup>1</sup> and Laboratory of Clinical Microbiology<sup>2</sup>, General Peripheral Hospital "Sismanogleio", Laboratory of Microbiology<sup>3</sup>, Medical School, University of Athens, Athens, Greece*

**Objectives.** *The aim of this study was to investigate the appearance of infections in a newly established Intensive Care Unit (ICU) in a tertiary care hospital. Method.* Over a three-month period 35 patients (20 male, 15 female) were admitted to the ICU, from all of whom tracheobronchial aspirates and urine cultures were collected throughout their stay. **Results.** *The colonization rate of the lower respiratory tract was 83%. Colonization occurred in the first 6 to 20 days following admission (median 13 days), the causative organisms being Acinetobacter baumannii (38% of patients), Pseudomonas aeruginosa (28%), Enterobacter aerogenes (14%) and Stenotrophomonas maltophilia (3%). Of the patients who were colonized, only 13 patients (38%) developed ventilator associated pneumonia. A. baumannii, P. aeruginosa, and K. pneumoniae were the most common isolates. Twenty-three percent of the patients had their urinary tract already colonized on admission (by Candida spp, 17% and Escherichia coli, 6%), and a further 20% developed positive urine cultures*



during their ICU stay (median 12 days), the cultivated organisms being *Candida spp* (14% of all patients), *P. aeruginosa* (3%) and *A. baumannii* (3%). Only four patients (11%) developed urinary tract infection and only three patients (9%) bacteraemia. The most common isolates from blood and urine were *E. coli*, *P. aeruginosa* and *K. pneumoniae*

ACTA MICROBIOLOGICA HELLENICA 2006, 51 (1): 54-57

## Βιβλιογραφία

1. Λεγάκης Ν, Χαλεβελάκης Ι. Φυσιολογική χλωρίδα. Στο: Αντιβιοτικά και συνήθεις λοιμώξεις. 2<sup>η</sup> Έκδοση. Αθήνα 1995, 88-92
2. Tramont EC, Hoover DL. General of nonspecific host mechanisms. In: Principles and Practice of Infectious Diseases. 4<sup>th</sup> edition. Mandell GL, Douglas RG, Bennett JE. John Wiley & Sons. 1995, 1826-1835
3. Bonten MJM, Weinstein RA. The role of colonization in the pathogenesis of nosocomial infections. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1996, 17:193-200
4. Evans ME, Kortas KJ. Vancomycin use in a university medical center: Comparison with hospital infection control practices advisory committee guidelines. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1996, 17:356-359
5. El Ebiary M, Gontalez J. Quantitative cultures of endotracheal aspirates for the diagnosis of ventilator-associated pneumonia. *Am Rev Respir Dis* 1993, 148:1552-1557
6. Maki DG, Weise CE, Sarafin HW. A semi-quantitative culture method for identifying intravenous-catheter-related infection. *N Engl J Med* 1977, 296:1305-1309
7. Timsit JF, Misset B, Azoulay E, et al. Usefulness of airway visualization in the diagnosis of nosocomial pneumonia in ventilated patients. *Chest* 1996, 110:172-179
8. Fisher JF, Newman CL, Sobel JD. Yeast in the urine: Solutions for a budding problem. *Clin Infect Dis* 1995, 20:183-189
9. Craven DE, Kunches LM, Lichtenberg DA. Nosocomial infection and fatality in medical surgical intensive care unit patients. *Arch Intern Med* 1988, 148:1161-1168

**Ανοσολογία****Μ. Παυλάτου***4<sup>η</sup> Έκδοση, Ιατρικές Εκδόσεις Λίτσας, σελ. 603*

Όταν θα γραφεί η ιστορία της σύγχρονης εργαστηριακής ιατρικής, στο λήμμα Παυλάτου Μαρία, ο συγγραφέας θα έχει ένα πολύ σημαντικό πρόβλημα να αντιμετωπίσει με την ημερομηνία που αποχώρησε από την ενεργό επιστημονική δράση. Όσοι έχουμε την τύχη να τη γνωρίζουμε και διδαχθήκαμε στα πρώτα μας επιστημονικά δήματα την Ανοσολογία από τα βιβλία της και τα καταπληκτικά μαθήματά της, πολλά χρόνια πριν, δεν θα μπορέσουμε να βοηθήσουμε στην ερώτηση αυτή. Αδιάκοπα, χωρίς καμιά απουσία, βρίσκεται μέχρι σήμερα στην πρώτη γραμμή της επιστήμης, διαψεύδοντας ακόμα και τον εαυτό της, όταν στην έκδοση του 1997 της «Ανοσολογίας της» έγραφε, ότι το σύγγραμμα εκείνο θα «αποτελούσε την τελευταία της προσφορά στην εκπαίδευση των νέων».

Αδιάψευστος μάρτυρας του γεγονότος αυτού αποτελεί η νέα Έκδοση της «Ανοσολογίας της», από τις Εκδόσεις Λίτσας, το 2004, που δεν αποτελεί απλώς μια «επαυξημένη έκδοση», όπως συνηθίζουμε να γράφουμε, αλλά ένα νέο βιβλίο, με πλήθος έγχρωμες εικόνες και σχεδιαγράμματα. Είχα την τύχη να συζητήσω μαζί της στην περίοδο συγγραφής του βιβλίου και αισθάνθηκα το νεανικό ενθουσιασμό με τον οποίο το ξανάγραφε και συμπλήρωνε κάθε καινούργια γνώση. Γνώση, που θα έπρεπε να αντληθεί και να ταξινομηθεί από ένα μεγάλο αριθμό άρθρων της σύγχρονης Ανοσολογίας και της Μοριακής Βιολογίας. Όπως δε αναφέρει και στον πρόλογο της νέας έκδοσης και επιβεβαιώνεται και από τους συνεργάτες του εκδοτικού οίκου, έκανε συνεχείς προσθήκες και διορθώσεις, μέχρι τη στιγμή της εκτύπωσης. Συμπεριέ-

λαβε έτσι όλες τις τελευταίες θεωρίες και αντιλήψεις, τόσο στη διάγνωση, με την εφαρμογή των μεθόδων της σύγχρονης μοριακής βιολογίας, όσο και στη θεραπεία με την εφαρμογή ανοσοπαρεμβατικών μεθόδων.

Η συγγραφέας, με τη μεγάλη συγγραφική της ικανότητα και εμπειρία, επιτυγχάνει να δώσει ένα εύληπτο, καλογραμμμένο και πλήρες σύγγραμμα, τόσο για εκπαιδευτική χρήση, όσο και για επιστημονική αναζήτηση στις βασικές αρχές της Ανοσολογίας, ανεξάρτητα της ειδικότητας του αναγνώστη.

Στόχος της συγγραφέως, όπως το αναφέρει άλλωστε, είναι ο φοιτητής και ο νέος επιστήμονας, τους οποίους φιλοδοξεί να κερδίσει και να τους κάνει να αποφασίσουν να «γίνουν υπηρέτες της θαυμαστής αυτής επιστήμης».

Στα 22 επιμέρους κεφάλαια γίνεται εκτενής αναφορά στις βασικές γνώσεις της ανοσολογίας, καθώς και στις νέες αντιλήψεις που επικρατούν σήμερα, με πληθώρα πινάκων, σχεδιαγραμμάτων και έγχρωμων εικόνων. Στο τέλος κάθε κεφαλαίου ακολουθεί σύνοψη, για μια γρήγορη πληροφόρηση ή επανάληψη.

Ιδιαίτερα χρήσιμα είναι για τον αναγνώστη τα Παραρτήματα και ειδικότερα το εκτεταμένο Αγγλοελληνικό Λεξικό, οι Συντομογραφίες και το Ευρετήριο στην Ελληνική και Αγγλική γλώσσα.

Η υποδοχή και του νέου αυτού συγγράμματός της, είναι εξασφαλισμένη και θα αποτελέσει, όπως και τα προηγούμενα 5 συγγράμματά της, σημείο αναφοράς και έγκυρης επιστημονικής αναζήτησης.

**Δρ. Ευάγγελος Δ. Βογιατζάκης**

Ιατρός Βιοπαθολόγος – Κλινικός Μικροβιολόγος  
Διευθυντής Μικροβιολογικού-Βιοχημικού  
Εργαστηρίου ΓΝΑ «Πολυκλινική»

# ΔΕΛΤΙΟΝ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΕΤΑΙΡΕΙΑΣ

Acta Microbiologica  
Hellenica

ΟΔΗΓΙΕΣ ΓΙΑ ΤΟΥΣ ΣΥΓΓΡΑΦΕΙΣ

## ΓΕΝΙΚΕΣ ΟΔΗΓΙΕΣ

Το Δελτίο Ελληνικής Μικροβιολογικής Εταιρείας είναι η επίσημη διμηνιαία έκδοση της Ελληνικής Μικροβιολογικής Εταιρείας με σκοπό τη συνεχή εκπαίδευση των Βιοπαθολόγων, Κλινικών Μικροβιολόγων, αλλά και κάθε επιστήμονα που ασχολείται με την εργαστηριακή και κλινική ιατρική.

Κύρια επιδίωξη είναι η δημοσίευση μελετών που αφορούν σε όλους τους τομείς της κλινικής Μικροβιολογίας (Βακτηριολογία, Παρασιτολογία, Μυκητολογία, Ιολογία). Επίσης δημοσιεύονται μελέτες που αναφέρονται στην Εργαστηριακή Αιματολογία-Αιμοδοσία, Ιατρική Βιοχημεία και Ανοσολογία. Στο περιοδικό δημοσιεύονται οι παρακάτω κατηγορίες άρθρων:

**Άρθρα σύνταξης:** Σύντομα άρθρα σχολιασμού ή κρίσης επίκαιρων θεμάτων, τα οποία γράφονται μετά από πρόσκληση της συντακτικής επιτροπής.

**Ανασκοπήσεις:** Αναλύονται σύγχρονα ιατρικά θέματα, στα οποία παρουσιάζονται οι πρόσφατες εξελίξεις ή αναφέρονται τα συμπεράσματα σειράς ερευνητικών μελετών των συγγραφέων. Οι ανασκοπήσεις γράφονται από ένα ή δύο συγγραφείς. Η έκταση του κυρίως κειμένου να μην είναι μεγαλύτερη των 10.000 λέξεων και η βιβλιογραφία να μην υπερβαίνει τις 80 παραπομπές.

**Ερευνητικές εργασίες:** Περιέχουν πρωτοδημοσιεύσιμα αποτελέσματα εργαστηριακών, επιδημιολογικών ή κλινικών μελετών προοπτικού ή αναδρομικού χαρακτήρα. Η έκταση του κειμένου χωρίς τη βιβλιογραφία να μην υπερβαίνει τις 5.000 λέξεις.

**Ενδιαφέρουσες περιπτώσεις:** Αποτελούν νέες ή πολύ σπάνιες περιπτώσεις νοσημάτων, σπάνιες εκδηλώσεις, εφαρμογή νέων διαγνωστικών κριτηρίων ή νέων θεραπευτικών μεθόδων. Η έκταση του κυρίως κειμένου να μην είναι μεγαλύτερη των 1.500 λέξεων και η βιβλιογραφία να μην υπερβαίνει τις 15 παραπομπές.

**Βραχείες δημοσιεύσεις:** Οι υποβαλλόμενες ερευνητικές εργασίες και ενδιαφέρουσες περιπτώσεις μπορεί να δημοσιευθούν υπό μορφή βραχείων δημοσιεύσεων, εφόσον, κατά την κρίση της συντακτικής επιτροπής, δεν είναι απαραίτητη η εκτεταμένη δημοσίευσή τους. Οι συγγραφείς μπορούν να υποβάλλουν εργασίες που έχουν εξαρχίς τη μορφή βραχείων δημοσιεύσεων, έκτασης έως 1800 λέξεων και με βιβλιογραφικές παραπομπές μέχρι 15.

**Σεμινάρια, στερογγυλά τραπέζια:** Υποβάλλονται ή γράφονται μετά από προτροπή της σύνταξης.

**Γράμματα προς τη σύνταξη:** Περιέχουν κρίσεις για δημοσιευμένες μελέτες, παρατηρήσεις κ.λπ. Η έκτασή τους να μην υπερβαίνει τις 500 λέξεις και η βιβλιογραφία τις 5 αναφορές.

Τα άρθρα θα δημοσιεύονται εφόσον δεν έχουν δημοσιευθεί ή υποβληθεί για δημοσίευση σε άλλο περιοδικό.

## ΥΠΟΒΟΛΗ ΚΑΙ ΣΥΝΤΑΞΗ ΤΩΝ ΕΡΓΑΣΙΩΝ

Τα άρθρα που υποβάλλονται για δημοσίευση αποστέλλονται σε ηλεκτρονική μορφή (δισκέτα) και σε τρία αντίγραφα, ένα πλήρες και δύο χωρίς τα ονόματα των συγγραφέων και το νοσοκομείο προέλευσης, στην παρακάτω διεύθυνση:

Δελτίο Ελληνικής Μικροβιολογικής Εταιρείας  
ASCENT, ΒΑΣ. ΣΟΦΙΑΣ 77, 11521 ΑΘΗΝΑ

Το υποβαλλόμενο άρθρο συνοδεύεται από επιστολή, που επιβεβαιώνει ότι όλοι οι συγγραφείς έχουν διαβάσει και συμφωνούν με την υποβολή του χειρόγραφου και ότι το άρθρο ή ένα σημαντικό μέρος αυτού δεν έχει δημοσιευθεί ή υποβληθεί για δημοσίευση κάπου αλλού. Κατά την παραλαβή το άρθρο χαρακτηρίζεται με αριθμό που κοινοποιείται στον υπεύθυνο για αλληλογραφία συγγραφέα, ο οποίος τον χρησιμοποιεί σε κάθε επικοινωνία με το περιοδικό.

Για τη σύνταξη των άρθρων το περιοδικό ακολουθεί τις υποδείξεις της Διεθνούς Επιτροπής Συντακτών Ιατρικών Περιοδικών. Το χειρόγραφο δακτυλογραφείται σε λευκό χαρτί μεγέθους A4 (212 x 297 mm) με περιθώρια τουλάχιστον 2,5 cm, σε διπλό διάστημα και στη μια όψη του φύλλου. Η εργασία περιλαμβάνει τα εξής τμήματα: τη σελίδα τίτλου, την ελληνική περίληψη με τις λέξεις κλειδιά, το κυρίως κείμενο, τις ευχαριστίες, την αγγλική περίληψη, τη βιβλιογραφία, τους πίνακες και τις λεζάντες των εικόνων.

**Σελίδα τίτλου:** Αποτελεί την πρώτη σελίδα του άρθρου και περιλαμβάνει: (α) τον τίτλο του άρθρου, στον οποίο δεν επιτρέπονται συντμήσεις λέξεων, (β) τα ονόματα των συγγραφέων (αρχικό μικρό ονόματος και επώνυμο), (γ) το εργαστήριο ή την κλινική και το νοσοκομείο από το οποίο προέρχεται η εργασία, (δ) τις λέξεις κλειδιά (3-6) που πρέπει να αντιστοιχούν στους διεθνείς όρους του *Index Medicus* και να αποδίδονται στα Ελληνικά σύμφωνα με το IATROTEK (MeSH-Hellas-Bιοϊατρική Ορολογία), (ε) την πλήρη διεύθυνση του υπεύθυνου για την αλληλογραφία συγγραφέα και (στ) βραχύ τίτλο όχι μεγαλύτερο από 40 γράμματα. Τα 5 πρώτα στοιχεία που αναφέρονται στη σελίδα τίτλου γράφονται εκτός από την ελληνική και στην αγγλική γλώσσα.

**Περίληψη:** Οι ανασκοπήσεις και οι ερευνητικές εργασίες συνοδεύονται από περίληψη στην Ελληνική και Αγγλική γλώσσα έκτασης 250-400 λέξεων. Οι περιλήψεις των ερευνητικών εργασιών πρέπει να χωρίζεται σε 4 παραγράφους με τις ακόλουθες επικεφαλίδες: Σκοπός, Υλικό-Μέθοδος, Αποτελέσματα, Συμπεράσματα. Οι ενδιαφέρουσες περιπτώσεις θα πρέπει να συνοδεύονται από περίληψη στην αγγλική και Ελληνική όχι μεγαλύτερη από 250 λέξεις.

**Κείμενο:** Οι ανασκοπήσεις κεφαλοποιούνται. Ο σκοπός της ανασκόπησης περιγράφεται διεξοδικά στην εισαγωγή του άρθρου. Οι ερευνητικές εργασίες χωρίζονται στα τμήματα: Εισαγωγή, Υλικό και μέθοδος, Αποτελέσματα, Συζήτηση. Οι ενδιαφέρουσες περιπτώσεις αποτελούνται από τα τμήματα: Εισαγωγή, Περιγραφή περιπτώσεως, Σχόλιο. Οι βραχείες δημοσιεύσεις χωρίζονται στα τμήματα: Εισαγωγή, Υλικό και μέθοδος, Αποτελέσματα και Συζήτηση.

Στο Υλικό και μέθοδος περιγράφεται λεπτομερώς ο τρόπος επιλογής του υλικού ή των ασθενών, καθώς και η μέθοδος που

εφαρμόστηκε, ώστε η έρευνα να μπορεί να αναπαραχθεί από ερευνητές που επιθυμούν την εφαρμογή της. Σε περιπτώσεις ερευνών που αφορούν σε ανθρώπους, πρέπει να διευκρινίζεται ότι τηρήθηκε η Διακήρυξη του Ελσίνκι (1975). Τα αποτελέσματα, όσα αναφέρονται σε πίνακες δεν επαναλαμβάνονται στο κείμενο. Στη συζήτηση μπορεί να γίνει σύγκριση με τα αποτελέσματα άλλων εργασιών και αναφέρονται τα συμπεράσματα, τα οποία προκύπτουν από τα αποτελέσματα της μελέτης.

**Ευχαριστίες:** Απευθύνονται μόνο σε άτομα με ουσιαστική συμβολή στην πραγματοποίηση της έρευνας.

**Βιβλιογραφία:** Ακολουθείται το σύστημα Vancouver. Οι βιβλιογραφίες αριθμούνται με την ίδια σειρά που αναφέρονται στο κείμενο. Οι βιβλιογραφικές παραπομπές στο κείμενο αριθμούνται με αραβικούς αριθμούς κατά τη σειρά εμφάνισής τους υπό μορφή εκθετών. Γράφονται τα επώνυμα των συγγραφέων και τα αρχικά του ονόματος χωρίς τελείες. Π.χ. Klotz SA, Penn CC, Negvesky GJ, Butrus SI. Fungal and parasitic infections of the eye. *Clin Microbiol Rev* 2000, 13:662-685.

Όταν οι συγγραφείς είναι πολλοί αναγράφονται τα πρώτα έξι ονόματα και ακολουθεί η λέξη «et al» ή «και συν.» εφόσον το άρθρο είναι στα ελληνικά π.χ. Garcia HH, Herrera G, Gilman RH, Tsang VC, Pilcher JB, Diaz JF et al. Discrepancies between cerebral computed tomography and western blot in the diagnosis of neurocysticercosis. *Am J Trop Med Hyg* 1994, 50:152-157.

Σε περίπτωση αναφοράς ονομάτων συγγραφέων στο κείμενο, αναγράφεται μόνο το επώνυμό τους. Στα ελληνικά άρθρα, αν οι συγγραφείς είναι δύο, μεταξύ των επωνύμων τοποθετείται η λέξη «και». Αν το άρθρο είναι ανυπόγραφο, στη θέση των ονομάτων των συγγραφέων αναφέρεται "Anonymous" ή "Ανώνυμος" (για Ελληνική δημοσίευση). Όταν πρόκειται για σύγγραμμα αναφέρονται το όνομα του συγγραφέα, ο τίτλος, ο αριθμός της έκδοσης (αν υπάρχουν περισσότερες από μία), ο εκδότης, ο τόπος έκδοσης, το έτος και οι σελίδες της αναφοράς. Αν πρόκειται για κεφάλαιο βιβλίου αναφέρεται επιπλέον μετά το όνομα του εκδότη και ο τίτλος του βιβλίου. Π.χ. Griffiths WD. Old world cutaneous leishmaniasis. In: Peters W, Killick-Kendrick R (eds). *The Leishmaniases in biology and medicine*. Vol. II. London, Academic Press, 1987:617-636.

Άρθρα που έχουν γίνει δεκτά για δημοσίευση, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως βιβλιογραφική παραπομπή. Στην περίπτωση αυτή, μετά τη συντομογραφία του περιοδικού αναγράφεται "in press" ή "υπό δημοσίευση".

**Εικόνες:** Οι φωτογραφίες, τα σχήματα, τα διαγράμματα κ.λπ. ονομάζονται ως εικόνες, αναφέρονται στα σημεία του κειμένου όπου αντιστοιχούν και αριθμούνται με αραβικούς αριθμούς (εικόνα 1, εικόνα 2 κ.ο.κ.). Υποβάλλονται σε 2 αντίγραφα πρωτοτύπων εικόνων, καθώς και σε 2 φωτοαντίγραφα, προοριζόμενα για τους κριτές. Στο πίσω μέρος κάθε πρωτότυπης εικόνας αναγράφεται, σε αυτοκόλλητο, το όνομα του πρώτου συγγραφέα του άρθρου και ο αριθμός της εικόνας. Για να αποφεύγονται σμικρύνσεις που αλλοιώνουν το περιεχόμενό τους, οι εικόνες θα πρέπει να έχουν μέγεθος ανάλογο των στηλών του Περιοδικού. Οι εικόνες μπορούν επίσης να υποβληθούν σε ηλεκτρονική μορφή (CD-ROM). Οι λεζάντες των εικόνων γράφονται όλες μαζί σε ξεχωριστή σελίδα του άρθρου.

**Πίνακες:** Όλοι οι πίνακες αναφέρονται στα σημεία του κειμένου όπου αντιστοιχούν και αριθμούνται με συνεχόμενους αραβικούς αριθμούς (πίνακας 1, πίνακας 2 κ.ο.κ.). Οι πίνακες δακτυλογραφούνται σε διπλό διάστημα και σε ξεχωριστή σελίδα ο καθένας. Η έκταση κάθε πίνακα δεν πρέπει να υπερβαίνει τη μία σελίδα. Όλοι οι πίνακες πρέπει να έχουν λεζάντες, οι οποίες γράφονται στο άνω μέρος της αντίστοιχης σελίδας. Τυχόν επεξηγήσεις αναφέρονται με παραπομπές στο τέλος του πίνακα.

**Ονοματολογία και μονάδες μέτρησης:** Οι φαρμακευτικές ουσίες αναφέρονται με την κοινόχρηστη ονομασία τους και όχι με την εμπορική. Οι μονάδες των διαφόρων μεγεθών αναφέρονται με τους διεθνώς παραδεκτούς συμβολισμούς και όχι με τις ελληνικές ονομασίες τους. Για παράδειγμα, γράφεται κύτταρα/μl και όχι κύτταρα κ.κ.χ. Η ονοματολογία των βακτηρίων είναι αυτή που αναφέρεται στο: *Approved Lists of Bacterial Names* (Skerman VBD, McGowan V, Sneath PHA, ed. American Society for Microbiology 1989) και στο *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. Τα ονόματα των ιών θα πρέπει να είναι τα εγκεκριμένα από τη διεθνή επιτροπή για την ταξινόμηση των ιών (ICTV), όπως αναφέρονται στο *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of viruses, Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses* (van Regenmortel et al, ed. Academic Press, San Diego, Calif, 2000).

## ΔΙΟΡΘΩΣΗ ΤΥΠΟΓΡΑΦΙΚΩΝ ΔΟΚΙΜΙΩΝ

Όλες οι εργασίες που υποβάλλονται κρίνονται από 2 τουλάχιστον κριτές. Οι κριτές μπορεί να αποτελούν μέλη της Συντακτικής Επιτροπής του Περιοδικού ή να είναι άλλοι, ειδικοί για το θέμα, επιστήμονες. Οι συγγραφείς ειδοποιούνται συνήθως σε 4 εβδομάδες για την αποδοχή της μελέτης για δημοσίευση. Μία μελέτη προτού δημοσιευθεί μπορεί να δοθεί στους συγγραφείς για τροποποίηση. Το τελικό διορθωμένο κείμενο υποβάλλεται σε 2 πλήρη αντίγραφα με όλα τα στοιχεία της εργασίας καθώς και σε ηλεκτρονική μορφή. Η μελέτη τροποποιημένη πρέπει να επιστραφεί στο Περιοδικό σε 2 εβδομάδες.

Μετά την αποδοχή, η μελέτη αποστέλλεται στο Τυπογραφείο. Οι συγγραφείς δυνατόν να λάβουν τυπογραφικά δοκίμια για διόρθωση. Τα δοκίμια πρέπει να επιστρέφονται στο Τυπογραφείο σε 3 το πολύ ημέρες, μαζί με μια επιστολή που θα δηλώνουν τον αριθμό ανατύπων που επιθυμούν. Η σχετική δαπάνη βαρύνει εξ ολοκλήρου τους συγγραφείς. Δεν επιτρέπεται αλλαγή του κειμένου στο στάδιο των δοκιμών χωρίς την άδεια της Συντακτικής Επιτροπής.

✍

### ΠΡΟΣ

ΔΕΛΤΙΟΝ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΕΤΑΙΡΕΙΑΣ  
"ASCENT" ΒΑΣ. ΣΟΦΙΑΣ 77, 115 21 ΑΘΗΝΑ  
ΤΗΛ: 210 7247906 - FAX: 210 7246180

ΑΙΤΗΣΗ ΕΓΓΡΑΦΗΣ ΣΥΝΔΡΟΜΗΤΗ  
 ΕΝΗΜΕΡΩΣΗ ΑΛΛΑΓΗΣ ΔΙΕΥΘΥΝΣΕΩΣ  
ΕΤΗΣΙΑ ΣΥΝΔΡΟΜΗ: 30,00 ΕΥΡΩ

Παρακαλώ να με εγγράψετε συνδρομητή / ή να γίνει διόρθωση της διευθύνσεώς μου

ΕΠΩΝΥΜΟ: ..... ΟΝΟΜΑ: .....

ΕΠΑΓΓΕΛΜΑ: ..... ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑ: .....

ΔΙΕΥΘΥΝΣΗ ΓΙΑ ΑΛΛΗΛΟΓΡΑΦΙΑ: .....

ΠΟΛΗ: ..... Τ.Κ.: ..... ΤΗΛΕΦΩΝΟ: ..... FAX: .....

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ

ΥΠΟΓΡΑΦΗ

• Οι **συνδρομές εσωτερικού** αποστέλλονται με ΤΑΧΥΔΡΟΜΙΚΗ ΕΠΙΤΑΓΗ στη Διεύθυνση:

X. ΚΟΥΤΣΙΑ, ΒΑΣ. ΣΟΦΙΑΣ 77, 11521 ΑΘΗΝΑ

• Οι **συνδρομές Εταιρειών** (90,00 Ευρώ.), **Εξωτερικού** (150 US\$) και **Κύπρου** (30 CYP) αποστέλλονται με ταχυδρομική επιταγή στη διεύθυνση: Π. ΓΕΩΡΓΑΚΑΚΟΣ, Τυνίνθου 30, 165 61 Α. Γλυφάδα.