

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ

Το Dermatophyte Test Agar (DTA) είναι εμπλουτισμένο θρεπτικό υπόστρωμα με αντιμικροβιακούς παράγοντες με ενσωματωμένο δείκτη αλλαγής οξύτητας για την καλλιέργεια, απομόνωση και μικροσκοπική αναγνώριση (ταυτοποίηση) των δερματόφυτων από κλινικά δείγματα ιατρικής και κτηνιατρικής προέλευσης 1-3.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα δερματόφυτα είναι οι μύκητες που μολύνουν συχνότερα τον άνθρωπο. Είναι πρωτοπαθή παθογόνα και μολύνουν υγιείς ξενιστές. Επειδή τρέφονται εκλεκτικά με την κερατίνη προσβάλλουν δομές του δέρματος που περιέχουν κερατίνη σε μεγάλη ποσότητα, όπως είναι η επιδερμίδα, τα νύχια και οι τρίχες (δέρμα και εξαρτήματα) (<http://panacea.med.uoa.gr/topic.aspx?id=869>).

Η παγκόσμια νοσοεπιβάρυνση από μύκητες που προσβάλλουν δέρμα, τρίχες και νύχια ξεπερνά το ένα δισεκατομμύριο ασθενείς ανά έτος^{4,5}. Επιπλέον, οι δερματοφυτιάσεις αποτελούν σημαντικό παράγοντα περιορισμού των καθημερινών δραστηριοτήτων του πάσχοντος.

Τα δερματόφυτα ευθύνονται για την πλειοψηφία των λοιμώξεων δέρματος και εξαρτημάτων σε ανθρώπους και ζώα. Εν τούτοις, η παγκόσμια νοσοεπιβάρυνση από μη-δερματοφυτικά παθογόνα όπως για παράδειγμα *Candida*, *Malassezia*⁶, *Scopulariopsis*, *Neoscytalidium*, *Cladosporium*, *Fusarium* spp., υπολογίζεται 11%-20%⁵. Συνεπώς, είναι απαραίτητος όχι μόνον ο διαχωρισμός δερματοφυτικού από μη-δερματοφυτικό παθογόνο στην καλλιέργεια, αλλά και ο ακριβής χαρακτηρισμός αυτών, προκειμένου να δοθούν οι οδηγίες ελέγχου της διασποράς της λοίμωξης κατά περίπτωση, αλλά και στοχευμένη αγωγή⁷.

Η οικολογική κατάσταση των δερματοφύτων περιλαμβάνει τρεις ομάδες: ανθρωπόφιλα, ζωόφιλα και γεώφιλα με διακριτούς τρόπους μετάδοσης (Εικ. 1). Τα δερματόφυτα ταξινομούνται σε τρία Γένη: *Trichophyton*, *Microsporium*, *Epidermophyton*.

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Το θρεπτικό υπόστρωμα DTA είναι εμπλουτισμένο με πεπτόνη σόγιας ως πηγή αζώτου και άνθρακα, και δεξτρόζη ως πηγή ενέργειας για τους μικροοργανισμούς. Ως δείκτης αλλαγής του pH, έχει προστεθεί ερυθρό της φαινόλης, προκειμένου να ανιχνεύεται η παραγωγή οξέος. Η ενσωμάτωση κυκλοξαμίδης (ακτιδιόνη) στο υπόστρωμα αναστέλλει την πλειοψηφία των σαπροφυτικών μυκήτων ή επιμολυντών που βρίσκονται στο δείγμα λειπών, τριχών και ονύχων που εκτίθενται στο περιβάλλον. Η δε χλωραμφαινικόλη, ως ευρέος φάσματος αντιβιοτικό, αναστέλλει πολλά Gram(+) και Gram(-) βακτήρια του μικροβιώματος ανθρώπων και ζώων, που ως γρήγορα αναπτυσσόμενα παρεμποδίζουν την ανάπτυξη των δερματοφύτων. Τέλος, η γενταμικίνη αναστέλλει κυρίως την ανάπτυξη των Gram(-) βακτηριδίων που ενδέχεται να επιμολύνουν το κλινικό υλικό που ενοφθαλμίζεται στο De-Test.

ΣΥΝΘΕΣΗ	g/litre
Soy Peptone	10.0
Dextrose	10.0
Bacteriological Agar	12.0
Phenol Red	0.2
Cycloheximide	0.5
Chloramphenicol	0.05
Gentamicin	0.1

Εμφάνιση: Πορτοκαλί διαυγές.

Τελικό pH 5,6 ± 0.2 στους 25 °C.

ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ

Το Dermatophyte test Agar είναι in vitro εργαστηριακό διαγνωστικό υλικό και πρέπει να χειρίζεται μόνο από εξειδικευμένα άτομα του εργαστηρίου.

Το υλικό αυτό περιέχει πεπτόνες και εκχυλίσματα ζωικής προέλευσης. Τα πιστοποιητικά για την προέλευση και την υγειονομική κατάσταση των ζώων δεν εγγυόνται πλήρως την απουσία μεταδιδόμενων παθογόνων παραγόντων. Γι' αυτό συνιστάται αυτά τα υλικά να αντιμετωπίζονται ως δυνητικώς μολυσματικά και με τήρηση των συνήθων μέτρων ασφαλείας (να μη λαμβάνονται από την πεπτική ή την αναπνευστική οδό).

Ο χειρισμός των τρυβλίων να γίνεται πάντα με γάντια και μέσα σε Laminar flow Class II, για να αποφεύγονται επιμολύνσεις κυρίως από σαπροφυτικούς μύκητες.

Εάν το τρυβλίο είναι ραγισμένο ή το σακουλάκι τρύπιο, μη το χρησιμοποιήσετε.

Μη χρησιμοποιείτε τα τρυβλία εάν παρουσιάζουν ενδείξεις μικροβιακής μόλυνσης.

Το πάχος του άγαρ πρέπει να είναι 4 - 5 mm και το υλικό χωρίς ρωγμές, ξηρότητα ή άλλα σημεία αλλοίωσης.

Μετά την ημερομηνία λήξεως το υλικό είναι ακατάλληλο για χρήση.

Σε περίπτωση επαφής με το δέρμα πλύνουμε αμέσως με άφθονο νερό και σαπούνι.

Τα θετικά δείγματα πρέπει να καταστρέφονται σύμφωνα με τους κανόνες υγιεινής που προβλέπονται για τη διαχείριση μολυσματικών δειγμάτων.

ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗΣ ΚΑΙ ΜΕΤΑΦΟΡΑΣ

Τα τρυβλία πρέπει να φυλάσσονται στους 2 – 8 °C μέσα στη συσκευασία τους μέχρι τη στιγμή της χρήσης τους.

Παρατεταμένη φύλαξη σε θερμοκρασία κάτω των 2 °C δημιουργεί αρκετή υγρασία μέσα στο υλικό με κίνδυνο επιμόλυνσης. Η κατάψυξη ακόμα και στιγμιαία, καταστρέφει το υλικό. Επίσης αποφεύγεται την υπερβολική θέρμανση.

Τα τρυβλία είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν μέχρι την ημερομηνία λήξης που αναγράφεται στην ετικέτα.

Εάν ανοίξετε την αεροστεγή συσκευασία του τρυβλίου κατά λάθος, μπορείτε να το φυλάξετε στο ψυγείο για 5 – 7 μέρες αφού το σφραγίσετε με παραφίλιμ η με σακουλάκι.

Για την μεταφορά οι μελέτες σταθερότητας μας έδειξαν ότι τα τρυβλία μπορούν να παραμείνουν στους 14 - 25 °C για 5 ημέρες ή στους 27 - 40 °C για 48 ώρες, χωρίς να επηρεαστεί η απόδοση του προϊόντος.

ΤΡΟΠΟΣ ΧΡΗΣΗΣ

Συλλογή του δείγματος για καλλιέργεια: (Ότι χρησιμοποιήσετε για τη συλλογή του δείγματος και τη χρήση του DTA πρέπει να είναι αποστειρωμένο).

Νύχια: Επειδή οι ζωντανοί μύκητες είναι ενσωματωμένοι, κόψτε το νύχι με ψαλίδι σε μικρά κομμάτια.

Τρίχες: Με λαβίδα κρατήστε τις τρίχες λίγο πιο πάνω από το μολυσμένο τμήμα και κόψτε στο σημείο επαφής με το δέρμα. Σημειώνεται ότι οι τρίχες που έχουν προσβληθεί από δερματοφύτο αποκόπτονται με ευκολία κατά το κράτημα με τη λαβίδα. Στη συνέχεια κόψτε 3-6 μικρά κομμάτια τρίχας, από την κάτω πλευρά της, μήκους 5-7mm.

Δέρμα: Εάν το μολυσμένο σημείο είναι ξηρό, ξύστε το δέρμα μέχρι να πέσουν κύτταρα ή πάρτε δείγμα με ένα εργαλείο εμβολιασμού που έχει υγρανθεί με φυσιολογικό ορό.

Εάν η μολυσμένη περιοχή είναι φυσαλιδώδης, πρέπει πρώτα να καθαριστεί και στη συνέχεια να πάρετε δείγμα από την μολυσμένη επιφάνεια με στείρο βαμβακοφόρο στυλεό.

Χρήση του DTA:

Τοποθετήστε τα δείγματα (νύχια, τρίχες, δέρμα) με αποστειρωμένη λαβίδα στο κέντρο της επιφάνειας του υλικού.

Πιέστε ελαφρά με προσοχή χωρίς τραυματίσετε το άγαρ για να έχουν καλύτερη επαφή με την επιφάνεια του υλικού.

Επώαστε τα DTA στους 20 - 30 °C σε ανεστραμμένη θέση μέχρι 14 μέρες σε σκοτεινό και υγρό μέρος.

ΑΝΑΓΝΩΣΗ ΚΑΙ ΕΡΜΗΝΕΙΑ

Εξετάστε τα DTA καθημερινά για έως και δεκατέσσερις (14) ημέρες και παρατηρήστε για την εμφάνιση κόκκινου χρώματος στο υλικό.

Τα περισσότερα δερματοφύτα θα δημιουργήσουν πλήρη αλλαγή του χρώματος μέσα σε 3 έως 6 ημέρες.

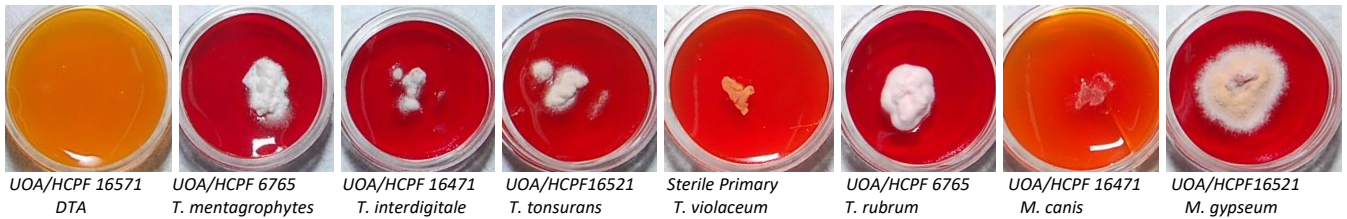
Θετικό DTA: Εμφάνιση λευκών αέριων υφών και κόκκινου χρώματος στο υλικό γύρω από την μυκητιακή ανάπτυξη.

Αρνητικό DTA: Ανάπτυξη, χωρίς αλλαγή χρώματος στο υλικό.

Ορισμένα είδη *Candida* είναι ικανά να αλλάζουν το χρώμα του δείκτη σε κόκκινο, αλλά μπορούν να αναγνωριστούν από τις χαρακτηριστικές λευκές κρεμώδεις αποικίες τους.

Για την αναγνώριση των δερματοφύτων εξετάστε τους μύκητες από τα DTA στο μικροσκόπιο με τη μέθοδο Scotch tape (Εικόνα. 2).

ΜΑΚΡΟΣΚΟΠΙΚΗ ΑΝΑΓΝΩΡΙΣΗ ΤΩΝ ΔΕΡΜΑΤΟΦΥΤΩΝ



UOA/HCPF 16571
DTA

UOA/HCPF 6765
T. mentagrophytes

UOA/HCPF 16471
T. interdigitale

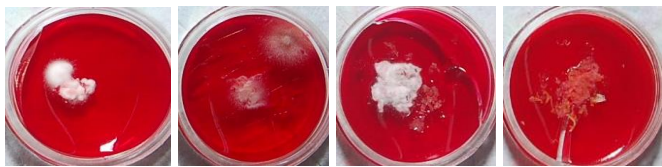
UOA/HCPF16521
T. tonsurans

Sterile Primary
T. violaceum

UOA/HCPF 6765
T. rubrum

UOA/HCPF 16471
M. canis

UOA/HCPF16521
M. gypseum



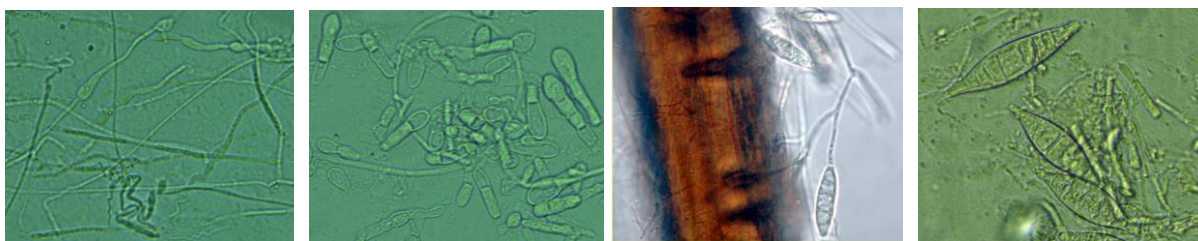
UOA/HCPF REF 3
A. vanbreuseghemii

UOA/HCPF 6765
Τρ. Κεφαλής *M. canis*

Ξέσματα Ονύχων
T. mentagrophytes

Ξέσματα Ονύχων
T. rubrum

ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΚΗ ΑΝΑΓΝΩΡΙΣΗ ΤΩΝ ΔΕΡΜΑΤΟΦΥΤΩΝ

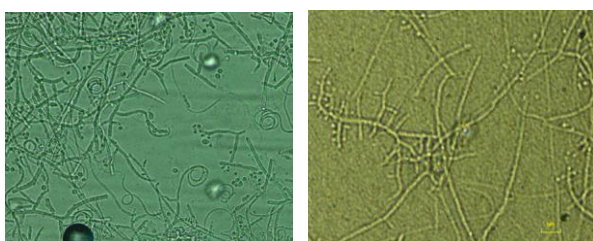


Arthroderma vanbreuseghemii

Epidermophyton floccosum

Hair-Microsp. *gypseum geophilic*

Microsporium canis



Trichophyton mentagrophytes

Trichophyton rubrum

ΜΑΚΡΟΣΚΟΠΙΚΗ ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΗ ΜΗ-ΔΕΡΜΑΤΟΦΥΤΩΝ ΚΑΙ ΕΠΙΜΟΛΥΝΤΩΝ



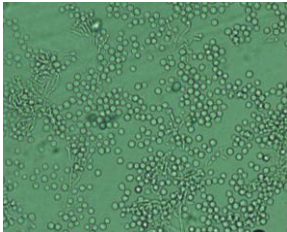
UOA/HCPFAV 5306
Candida sp. & M. canis

UOA/HCPFAV 4350
Candida sp.

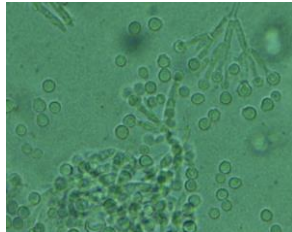
UOA/HCPF 16164
S. brevicaulis

Aspergillus sp.
(Επιμολυντής ονύχων)

ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΚΗ ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΗ ΜΗ-ΔΕΡΜΑΤΟΦΥΤΩΝ ΚΑΙ ΕΠΙΜΟΛΥΝΤΩΝ



Scopulariopsis brevicaulis



Scopulariopsis brevicaulis



Aspergillus sp. (Saprophyte)



Candida albicans

Αξιολόγηση και φωτογραφικό υλικό

Η Ελληνική Συλλογή Παθογόνων Μυκήτων, ερευνητική υποδομή του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, με το ακρωνύμιο UOA/HCPF, μέλος της European Culture Collections' Organisation (ECCO), αξιολόγησε το DERMATOPHYTE TEST AGAR με γονοτυπικά χαρακτηρισμένα στελέχη της Συλλογής και με παθολογικό κλινικό υλικό ονύχων, τριχών τριχωτού κεφαλής και λεπιών δέρματος, ιατρικής και κτηνιατρικής προέλευσης. Το φωτογραφικό υλικό είναι πρωτότυπο.

ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Η πλήρης ταξινόμηση των δερματοφύτων εξαρτάται και από μικροσκοπικές παρατηρήσεις στο άμεσο παρασκεύασμα, καθώς και από βιοχημικές και ορολογικές διαδικασίες.

Μπορεί να έχουμε ασθενή ή κανονική ανάπτυξη Gram θετικών και Gram αρνητικών βακτηρίων όταν ο αριθμός τους στο ενοφθάλμισμα είναι $\geq 10^6$ CFU/ml.

ΓΕΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΠΟΙΟΤΙΚΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ

Μικρόβιο	ATCC	Ανάπτυξη	Αποικίες
<i>Microsporium audouinii</i>	9079	Καλή	Ροζ, κόκκινο χρώμα στο υλικό
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	9533	Καλή	Ροζ, κόκκινο χρώμα στο υλικό.
<i>Aspergillus niger</i>	16404	Αναστολή	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10145	Αναστολή	

ΑΠΟΡΡΙΨΗ ΤΟΥ ΥΛΙΚΟΥ ΣΤΑ ΑΠΟΒΛΗΤΑ

Τα υλικά που δεν παρουσιάζουν καμία ανάπτυξη μπορεί να θεωρηθούν ως μη επικίνδυνα απόβλητα και να απορρίπτονται ανάλογα.

Τα υλικά που παρουσιάζουν ανάπτυξη αποικιών πρέπει να απορρίπτονται σύμφωνα με τις οδηγίες για μολυσματικά ή δυνητικούς μολυσματικά απόβλητα.

Το εργαστήριο είναι υπεύθυνο για τη σωστή διαχείριση των μολυσματικών αποβλήτων σύμφωνα με τη φύση και το βαθμό επικινδυνότητάς τους και πρέπει να τα διαχειρίζεται και να τα απορρίπτει (ή να αναθέτει τη διαχείριση και απόρριψή τους) σύμφωνα με τους εκάστοτε ισχύοντες κανονισμούς.

ΠΡΟΔΙΑΓΡΑΦΕΣ

DERMATOPHYTE TEST AGAR - CE

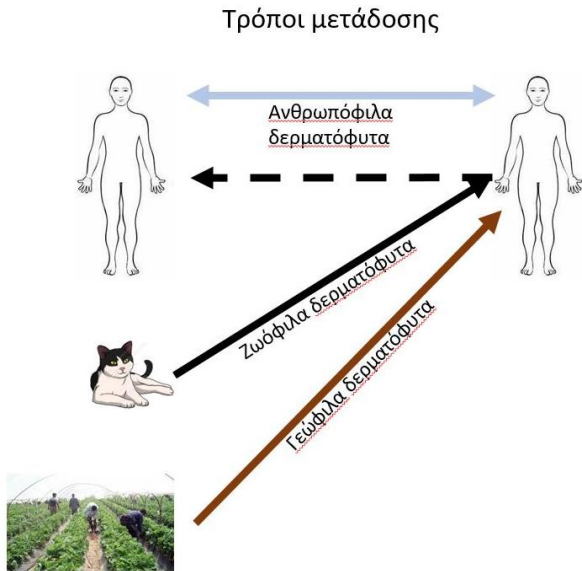
ΕΙΔΟΣ	ΚΩΔΙΚΟΣ	ΣΥΣΚΕΥΑΣΙΑ	ΦΥΛΑΞΗ	ΧΡΟΝΟΣ ΖΩΗΣ
Τρυβλίο 9cm	010039	10 τεμάχια	2 – 8 °C	4 μήνες
Τρυβλίο 6cm	050039	10 τεμάχια	2 – 8 °C	4 μήνες
Φιαλίδιο 100ml	060039	10 τεμάχια	2 – 8 °C	12 μήνες
Σωληνάριο 10ml	070039	20 τεμάχια	2 – 8 °C	12 μήνες

Παράγεται στην Ελλάδα από την εταιρεία Bioprepare σύμφωνα με τον κανονισμό (ΕΕ) 2017/746.

ΒΑΣΙΚΟ UDI-DI: 5212037714030201WT. EDMA: (14 03 02 01) PPM for Yeasts and Fungi.

Η εταιρεία Bioprepare έχει πιστοποιηθεί σύμφωνα με τα πρότυπα: EN ISO 9001:2015 / ΕΛΟΤ EN ISO 13485:2016 ΔΥ8δ/1348/2004.

ΕΙΚΟΝΑ 1.



ΕΙΚΟΝΑ 2.

Οδηγίες προετοιμασίας του δείγματος με την μέθοδο Scotch tape



Για να εφαρμόσουμε την μέθοδο Scotch tape θα χρειαστούμε:

1. Γαλακτοφαινόλη με κυανό του βαμβακος (ΓΚΒ)
2. Δύο λαβίδες.
3. Μία αντικειμενοφόρο πλάκα
4. Ένα σελοτέιπ πλάτους 1,5 – 2cm
5. Το θετικό De – Test



Ρίχνουμε μία σταγόνα (ΓΚΒ) στο μέσον της αντικειμεφόρου πλάκας.



Με την πρώτη λαβίδα τραβάμε το σελοτέιπ μέχρι τα 3,5 έως 4cm και το κόβουμε με τη δεύτερη λαβίδα. Στη συνέχεια κολλάμε τα δύο άκρα στις δύο μύτες τις λαβίδας σχηματίζοντας μία καμπύλη με την κολλητική πλευρά του σελοτέιπ προ τα έξω.



Κλείνουμε την λαβίδα και ακουμπάμε το σελοτέιπ πάνω στην αποικία του μύκητα. Πιέζουμε λίγο για να κολλήσουν μυκητήγια και σπόροι στο σελοτέιπ.



Ακουμπάμε το σελοτέιπ πάνω στη σταγόνα (ΓΚΒ) και κολλάμε πάνω στην αντικειμενοφόρο πλάκα ανοίγοντας σιγά σιγά την λαβίδα.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Allen, A.M., Drewry, R.A., A. Weaver, R.E.: Evaluation of a new color indicator media for Diagnosis of dermatophytosis. Arch. Derm. 1970; 102: 68-70.
- Mertz, W.G., Berger, C.L., A. Silva-Hutner, M.: Media With Ph-indicator for the isolation of dermatophytes. -Arch. Derm. 1969; 99: 203-209.
- Taplin, D., Allen, A.M., A. Mertz, P.M.: Experience with a new indicator medium (Dtm) for the isolation of dermatophyte fungi, In "Proceedings of the international symposium of mycoses", Scientific Publication 205. Washington, D.C. Pan American Health Organization, 1970; 55-58.
- Vos T, Flaxman AD, Naghavi M, et al., Years lived with disability (YLDs) for 1160 sequale of 289 diseases and injuries 1990-2010: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. Lancet 2012; 380: 2163-2196.
- Seth D, Khatiya Cheldize AB, Brown D, Freeman EF. Global Burden of Skin Disease: Inequities and Innovations Curr Dermatol Rep. 2017; 6: 204–210.
- Velegraki A, Cafarchia C, Gaitanis G, Iatta R, Boekhout T. *Malassezia* infections in humans and animals: pathophysiology, detection, and treatment. PLoS Pathog. 2015 8;11(1)
- Saunte DML, Piraccini BM, Sergeev AY, Prohić A, Sigurgeirsson B, Rodríguez-Cerdeira C, Szepietowski JC, Faergemann J, Arabatzis M, Pereiro M, Skerlev M, Lecerf P, Schmid-Grendelmeier P, Nenoff P, Nowicki RJ, Emtestam L, Hay RJ. A survey among dermatologists: diagnostics of superficial fungal infections - what is used and what is needed to initiate therapy and assess efficacy? J Eur Acad Dermatol Venereol. 2018 Nov 23. doi: 10.1111/jdv.15361. [Epub ahead of print]
- de Hoog GS, Dukik K, Monod M, Packeu A, Stubbe D, Hendrickx M, Kupsch C, Stielow JB, Freeke J, Göker M, Rezaei-Matehkolaei A, Mirhendi H, Gräser Y. Toward a Novel Multilocus Phylogenetic Taxonomy for the Dermatophytes. Mycopathologia. 2017;182: 5-31.
- Hayette M-P and Sacheli R. Unusual species of Dermatophytes: Rarely identified or new? Mycopathologia 2017; 182:203-213.
- Arabatzis M, Kyprianou M, Velegraki A, Makri A, Voyatzi A. *Microsporium canis* antifungal susceptibilities: concerns regarding their clinical predictability. Int J Antimicrob Agents. 2010; 36:385-6
- Mesquita JR, Vasconcelos-Nóbrega C, Oliveira J, Coelho C, Vala H, Fratti M, Arabatzis M, Velegraki A, Monod M. Epizootic and epidemic dermatophytose outbreaks caused by *Trichophyton mentagrophytes* from rabbits in Portugal, 2015. Mycoses. 2016;59:668-673.
- Arabatzis M, Bruijnesteijn van Coppenraet LE, Kuijper EJ, de Hoog GS, Lavrijsen AP, Templeton K, van der Raaij-Helmer EM, Velegraki A, Gräser Y, Summerbell RC. Diagnosis of common dermatophyte infections by a novel multiplex real-time polymerase chain reaction detection/identification scheme. Br J Dermatol. 2007;157:681-689.
- Kourkoumelis N, Gaitanis G, Velegraki A, Bassukas ID. Nail Raman spectroscopy: A promising method for the diagnosis of onychomycosis. An ex vivo pilot study. Med Mycol. 2018 1; 56:551-558

ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΚΑΤΑΣΚΕΥΑΣΤΗ IN VITRO

Bioprep
microbiology



Γ. ΠΑΠΑΝΙΚΟΛΑΟΥ & ΣΙΑ Ε.Ε.

ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ

Ποταμού 5 ΒΙΟ ΠΑ ΚΕΡΑΤΕΑΣ - ΑΤΤΙΚΗ ΤΚ 19001

Τ.Θ. 4893 - Τηλ.: 2299 0 66113 Φαξ: 2299 0 66112.

E-mail: bioprep1@otenet.gr www.bioprep.gr