



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΠΡΟΝΟΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ  
ΤΟΜΕΑΣ ΙΑΤΡΙΚΩΝ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΩΝ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Αξιολόγηση μοριακών και ανοσοχρωματογραφικών μεθόδων  
στη διάγνωση δερματοφυτικών λοιμώξεων**

ΓΡΙΒΟΚΩΣΤΟΠΟΥΛΟΥ ΜΑΡΙΑ (19678047)

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ: ΣΙΩΠΗ ΜΑΡΙΑ, Ph.D., ΑΚΑΔΗΜΑΪΚΗ ΥΠΟΤΡΟΦΟΣ

ΑΘΗΝΑ 2024



UNIVERSITY OF WEST ATTICA  
FACULTY OF HEALTH AND CARE SCIENCES  
DEPARTMENT OF BIOMEDICAL SCIENCES  
DIVISION MEDICAL LABORATORIES SCIENCE

DISSERTATION

**Evaluation of molecular and immunochromatographic methods  
for the diagnosis of dermatophyte infections**

GRIVOKOSTOPOULOU MARIA (19678047)

SUPERVISOR: SIOPI MARIA, Ph.D., ACADEMIC SCHOLAR

ATHENS 2024

## **Μέλη Τριμελούς Εξεταστικής Επιτροπής**

**Σιώπη Μαρία**

**Μπελούκας Απόστολος**

**Βογιατζάκη Χρυσάνθη**

## Δήλωση συγγραφέα πτυχιακής διπλωματικής εργασίας

Η κάτωθι υπογεγραμμένη Γριβοκωστοπούλου Μαρία του Χρήστου, με αριθμό μητρώου 19678047, φοιτήτρια του τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών της Σχολής Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής, δηλώνω ότι:

*«Είμαι συγγραφέας αυτής της πτυχιακής/διπλωματικής εργασίας και ότι κάθε βοήθεια την οποία είχα για την προετοιμασία της είναι πλήρως αναγνωρισμένη και αναφέρεται στην εργασία. Επίσης, οι όποιες πηγές από τις οποίες έκανα χρήση δεδομένων, ιδεών ή λέξεων, είτε ακριβώς είτε παραφρασμένες, αναφέρονται στο σύνολό τους, με πλήρη αναφορά στους συγγραφείς, τον εκδοτικό οίκο ή το περιοδικό, συμπεριλαμβανομένων και των πηγών που ενδεχομένως χρησιμοποιήθηκαν από το διαδίκτυο. Επίσης, βεβαιώνω ότι αυτή η εργασία έχει συγγραφεί από εμένα αποκλειστικά και αποτελεί προϊόν πνευματικής ιδιοκτησίας τόσο δικής μου, όσο και του Ιδρύματος. Παράβαση της ανωτέρω ακαδημαϊκής μου ευθύνης αποτελεί ουσιώδη λόγο για την ανάκληση του πτυχίου μου».*

Υπογραφή

## Ευχαριστίες

Η παρούσα ερευνητική πτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Κλινικής Μικροβιολογίας του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου (Π.Γ.Ν.) «Αττικόν».

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τη Δρ. Μαρία Σιώπη, επιβλέπουσα καθηγήτρια της παρούσας εργασίας, για την ανάθεση του θέματος, τη βοήθεια καθώς και την υποστήριξη καθ' όλη τη διάρκεια της προσπάθειας αυτής. Η αδιάκοπη αυτή υποστήριξη αποτέλεσε καθοριστικό παράγοντα για την ολοκλήρωση της πτυχιακής μου εργασίας.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω θερμά τον Καθηγητή Μικροβιολογίας κ. Σπύρο Α. Πουρνάρα (Διευθυντή Εργαστηρίου Κλινικής Μικροβιολογίας, Π.Γ.Ν. «Αττικόν», Ιατρική Σχολή, Ε.Κ.Π.Α.), καθώς και τον Αναπληρωτή Καθηγητή Μικροβιολογίας κ. Ιωσήφ Μελετιάδη (συνεπιβλέποντας της εργασίας, Υπεύθυνος Τμήματος Μυκητολογίας, Εργαστήριο Κλινικής Μικροβιολογίας, Π.Γ.Ν. «Αττικόν», Ιατρική Σχολή, Ε.Κ.Π.Α.) για την εμπιστοσύνη και την ευκαιρία που μου προσέφεραν να πραγματοποιήσω την έρευνα αυτή.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια και τους φίλους μου, για τη στήριξη και την πίστη τους όλα τα χρόνια των σπουδών μου.

## Πίνακας περιεχομένων

|  |      |
|--|------|
| Περίληψη.....  | VII  |
| Summary .....  | VII  |
| Συντομογραφίες .....   | VIII |
| <b>Γενικό μέρος</b>  |      |
| 1. Δερματοφυτικές λοιμώξεις  |      |
| 1.1 Εισαγωγή .....   | 1    |
| 1.2 Παθογένεια.....  | 3    |
| 1.3 Προδιαθεσικοί παράγοντες και παράγοντες κινδύνου .....               | 4    |
| 1.4 Αιτιολογικοί παράγοντες .....  | 5    |
| 1.5 Κλινικές εκδηλώσεις και επιδημιολογία .....                          | 7    |
| 1.6 Εργαστηριακή μικροβιολογική διάγνωση .....                           | 19   |
| 1.7 Θεραπευτική αντιμετώπιση .....                                       | 27   |
| <b>Ειδικό μέρος</b>  |      |
| Σκοπός.....  | 31   |
| 2. Υλικά και μέθοδοι   |      |
| 2.1 Κλινικά δείγματα .....   | 32   |
| 2.2 Άμεση μικροσκόπηση .....   | 32   |
| 2.3 Καλλιέργεια .....  | 32   |
| 2.4 Μοριακή ανίχνευση δερματοφύτων.....                                  | 33   |
| 2.5 Ανοσοχρωματογραφική ανίχνευση δερματοφύτων .....                     | 36   |
| 2.6 Ανάλυση .....  | 40   |
| 3. Αποτελέσματα  |      |
| 3.1 Άμεση μικροσκόπηση και καλλιέργεια .....                             | 42   |
| 3.2 Αξιολόγηση της PCR στην ανίχνευση δερματοφύτων.....                  | 43   |
| 3.3 Αξιολόγηση της ανοσοχρωματογραφίας στην ανίχνευση δερματοφύτων ..... | 47   |
| 4. Συζήτηση - Συμπεράσματα .....   | 50   |
| Βιβλιογραφία .....   | 54   |
| Παραρτήματα  |      |

|                         |    |
|-------------------------|----|
| Κατάλογος εικόνων.....  | 65 |
| Κατάλογος πινάκων ..... | 68 |

## Περίληψη

Η άμεση μικροσκόπηση και η καλλιέργεια αποτελούν το χρυσό πρότυπο στη διάγνωση δερματοφυτικών λοιμώξεων, ωστόσο χαρακτηρίζονται από μειωμένη ειδικότητα και χαμηλή ευαισθησία σε συνδυασμό με αυξημένο χρόνο λήψης αποτελεσμάτων (έως 4 εβδομάδες), αντίστοιχα, καθυστερώντας την έγκαιρη έναρξη της ενδεδειγμένης αντιμυκητικής θεραπείας. Ως εκ τούτου, η εφαρμογή μη καλλιεργητικών μεθόδων αποτελεί ελκυστική εναλλακτική διαγνωστική προσέγγιση.

Σκοπό της παρούσας μελέτης αποτέλεσε η αξιολόγηση δύο εμπορικά διαθέσιμων δοκιμασιών, μιας μοριακής (Dermatophyte PCR kit, PCR) και μιας ανοσοχρωματογραφικής (Diafactory tinea unguium, DTU), στην ανίχνευση δερματοφύτων.

Μελετήθηκαν ξέσματα όνυχος από 84 άτομα με κλινική υποψία ονυχομυκητίασης με μικροσκοπία φθορισμού (Blankophor P), καλλιέργεια, PCR και DTU. Εκτιμήθηκε η κατηγορική συμφωνία μεταξύ της εκάστοτε υπό μελέτη δοκιμασίας και της μεθόδου αναφοράς (θετική [υφές ή/και αρθροκόνιδια] άμεση μικροσκόπηση ή/και θετική για δερματόφυτο καλλιέργεια), καθώς και η διαγνωστική τους ακρίβεια.

Περισσότερα δείγματα βρέθηκαν θετικά για δερματόφυτο με PCR (36%) και DTU (50%) παρά με καλλιέργεια (10%), ενώ η PCR ήταν θετική για *T. rubrum* σε δύο περιπτώσεις που απομονώθηκαν *Candida* spp. στην καλλιέργεια. Η συμφωνία μεταξύ της PCR ή της DTU και της μεθόδου αναφοράς ήταν 63% και 70%, αντίστοιχα. Η θετική προγνωστική αξία, η αρνητική προγνωστική αξία, η ειδικότητα και η ευαισθησία της PCR ήταν 96%, 45%, 96% και 49%, αντίστοιχα, ενώ της DTU ήταν 100%, 40%, 100% και 62%, αντίστοιχα.

Η υψηλή ειδικότητα και θετική προγνωστική αξία, σε συγκερασμό με την ευκολία στη χρήση και την υψηλή ταχύτητα λήψης αποτελεσμάτων, καθιστούν τις PCR και DTU ως ελκυστικές επικουρικές δοκιμασίες για τη διερεύνηση της ονυχομυκητίασης στην καθ' ημέρα εργαστηριακή πράξη.

**Λέξεις κλειδιά:** δερματόφυτο, PCR, ανοσοχρωματογραφία, διάγνωση, ονυχομυκητίαση



## Summary

Direct microscopy and fungal culture are considered the gold standard for diagnosing dermatophyte infections, however they are characterized by reduced specificity and low sensitivity combined with long turnaround time (up to 4 weeks), respectively, delaying the timely initiation of appropriate antifungal therapy. Therefore, the implementation of non-culture-based methods consists an appealing alternative diagnostic approach.

The aim of the present study was to assess the performance of two commercially available tests, a molecular (Dermatophyte PCR kit, PCR) and an immunochromatographic (Diafactory tinea unguium, DTU), for the detection of dermatophytes.

Nail clippings from 84 patients with suspected onychomycosis were studied by fluorescence microscopy (Blankophor P), culture, PCR and DTU. Categorical agreement between each of the assays under evaluation and the reference method (positive [hyphae and/or arthroconidia] direct microscopy and/or positive for dermatophyte culture), as well as their diagnostic accuracy, was determined.

More samples were positive for dermatophyte by PCR (36%) and DTU (50%) than by culture (10%), while *T. rubrum* was detected by PCR in two specimens which were culture-positive for *Candida* spp. The agreement between the PCR or the DTU and the reference method was 63% and 70%, respectively. The positive predictive value, negative predictive value, specificity and sensitivity of the PCR was 96%, 45%, 96% and 49%, respectively, while of the DTU was 100%, 40%, 100% and 62%, respectively.

Based on the high specificity and positive predictive value, combined with the ease of use and the short time required to obtain results, PCR and DTU may be attractive adjunctive tools for the onychomycosis workup in everyday laboratory practice.

**Keywords:** dermatophyte, PCR, immunochromatography, diagnosis, onychomycosis

## Συντομογραφίες

| Σύντμηση     | Αγγλική Ορολογία   | Ελληνική Ορολογία  |
|--------------|--|--|
| CLZ          | control line zone  | ζώνη ελέγχου   |
| CSH1         | chitin synthase I  | συνθετάση I της χιτίνης  |
| DTM          | dermatophyte test medium   | άγαρ δερματοφύτων  |
| DTU          | Diafactory tinea unguium   |  |
| ELISA        | enzyme-linked immunosorbent assay  | ανοσοπροσροφητική ανάλυση στερεάς φάσεως με σύνδεση ενζύμου  |
| HIV          | human immunodeficiency virus   | ιός της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας  |
| IC           | internal control   | εσωτερικός μάρτυρας ελέγχου  |
| ITS          | internal transcriber spacer  | εσωτερική μεταγραφόμενη περιοχή  |
| MaE          | major error  | σημαντικό σφάλμα   |
| MALDI-ToF MS | matrix assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry | φασματοφωτομετρία μάζα με μηχανισμό ιοντισμού εκρόφησης με λέιζερ, υποβοηθούμενου από μήτρα, και αναλυτή χρόνου/πτήσης |
| NPV          | negative predictive value  | αρνητική προγνωστική αξία  |
| PCR          | polymerase chain reaction  | αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης  |
| PPV          | positive predictive value  | θετική προγνωστική αξία  |
| TLZ          | test line zone   | ζώνη εξέτασης  |
| VmE          | very major error   | πολύ σημαντικό σφάλμα  |
| ΗΠΑ          |  | Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής  |
| ΣΔ           |  | σακχαρώδης διαβήτης  |

# Γενικό μέρος

## 1. Δερματοφυτικές λοιμώξεις

### 1.1 Εισαγωγή

Ο όρος *tinea* χρησιμοποιείται για να περιγραφεί μια μυκητίαση που έχει προκληθεί από ένα δερματόφυτο και συνοδεύεται από το λατινικό όρο που υποδηλώνει το σημείο της λοίμωξης, όπως *tinea pedis* (δερματοφυτία άκρων ποδών). Τα δερματόφυτα είναι κερατινόφιλοι μύκητες, οι οποίοι αποικίζουν μέρη του σώματος που είναι πλούσια σε κερατίνη, όπως το δέρμα, οι τρίχες και οι όνυχες. Τις τελευταίες δεκαετίες, η συχνότητα εμφάνισης επιπολής μυκητιάσεων έχει αυξηθεί σημαντικά, με το ~20-25% του πληθυσμού παγκοσμίως να προσβάλλεται από δερματόφυτα σύμφωνα με τον παγκόσμιο οργανισμό υγείας [1], ενώ σε γεωγραφικές περιοχές με υψηλό επιπολασμό, το ποσοστό αυτό μπορεί να αγγίξει το 40-60% [2,3]. Δεδομένου ότι οι δερματοφυτίες τείνουν να χρονίζουν, ενώ υπάρχουν και συχνές υποτροπές, σε πολλές περιπτώσεις ακόμα και μετά τη θεραπεία, η οικονομική επιβάρυνση που επιφέρουν στα συστήματα υγειονομικής περίθαλψης είναι εξαιρετικά σημαντική, με απόδειξη το χαρακτηριστικό παράδειγμα των Ηνωμένων Πολιτειών της Αμερικής (ΗΠΑ) όπου το ετήσιο κόστος για τη στοχευμένη θεραπεία τους ξεπερνά τα 800 εκατομμύρια δολάρια [4]. Ωστόσο, είναι αξιοσημείωτο πως το πραγματικό κόστος είναι αρκετά υψηλότερο αν κάποιος συνυπολογίσει αφενός τα αυξημένα ποσοστά υποδιάγνωσης των δερματοφυτιών και αφετέρου τα έξοδα που σχετίζονται με περιττές διαγνωστικές ή επεμβατικές ιατρικές πράξεις και τη χορήγηση μη ενδεδειγμένης θεραπείας πριν από την οριστική διάγνωση [5].

Τα δερματόφυτα ανήκουν στο φύλο των Ασκομυκήτων, στην ομοταξία Eurotiomycetes, στην τάξη Onygenales και στην οικογένεια Arthrodermataceae. Επί του παρόντος, έχουν αναγνωρισθεί >50 διαφορετικά είδη που ταξινομούνται με βάση το πόσο στενή συγγένεια τα χαρακτηρίζει εξελικτικά, δηλαδή με φυλογενετικά κριτήρια, σε 9 γένη, *Trichophyton*, *Epidermophyton*, *Nannizzia*, *Microsporum*, *Lophophyton*, *Arthroderma*, *Ctenomyces*, *Guarromyces* και *Paraphyton* [6]. Ωστόσο, τα κύρια παθογόνα που μολύνουν τον άνθρωπο ανήκουν στα 4 πρώτα προαναφερθέντα γένη και δεν ξεπερνούν τα 6, εκ των οποίων αυτό που απομονώνεται συχνότερα είναι το *T. rubrum* [1]. Η λοίμωξη από

δερματόφυτα αρχίζει όταν τα αρθροκονίδια τους προσκολληθούν σε κερατινοποιημένους ιστούς [7-9]. Ωστόσο, τα αρθροκονίδια των δερματοφύτων δεν μπορούν να εισβάλλουν σε υγιή ιστό διότι το ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή τα παρεμποδίζει. Έτσι, η εμφάνιση λοίμωξης σχετίζεται στενά με διάφορους προδιαθεσικούς παράγοντες, όπως η ηλικία, η ανοσοκαταστολή, οι κακές συνθήκες υγιεινής, ο σακχαρώδης διαβήτης (ΣΔ) και το κλίμα [10]. Η μετάδοση των δερματοφυτικών μυκήτων επιτυγχάνεται είτε μέσω της άμεσης επαφής με το μολυσμένο οργανισμό, είτε έμμεσα από την επαφή με μολυσμένες εστίες [11].

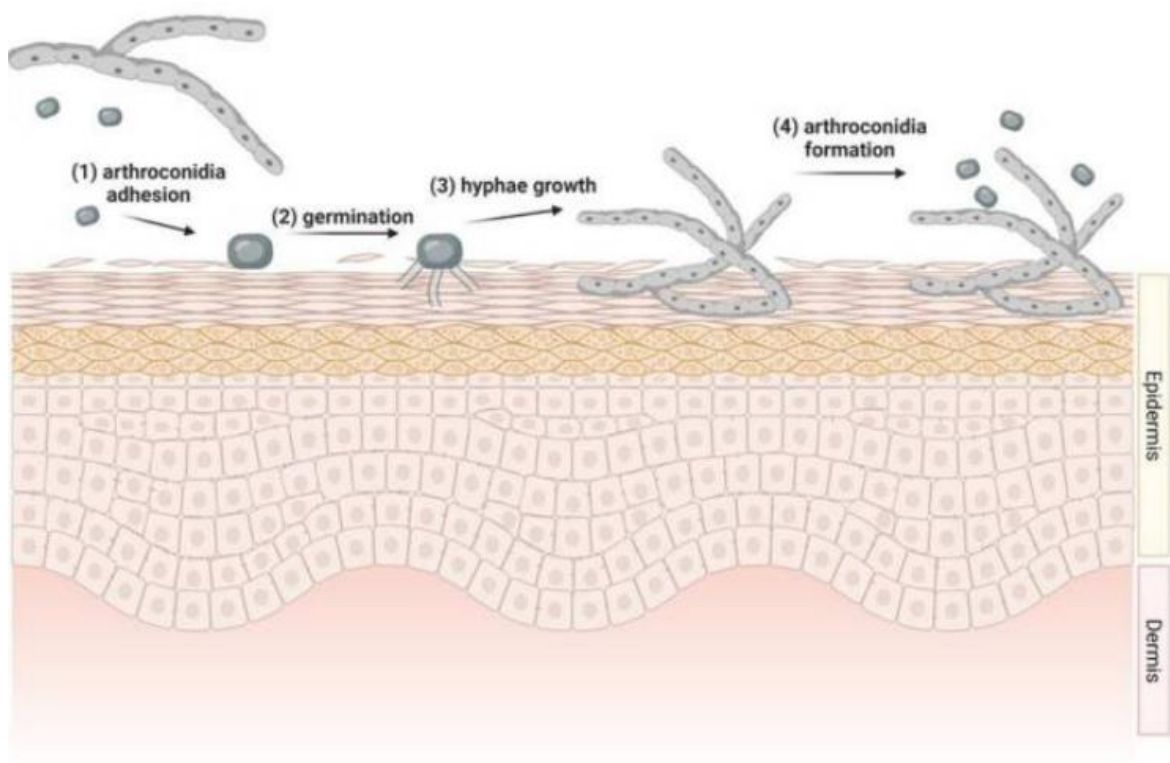
Επιπλέον, τα δερματόφυτα ταξινομούνται ανάλογα με τον κύριο βióτοπό τους και την οδό μετάδοσής τους σε ανθρωπόφιλα, ζωόφιλα και γεώφιλα. Τα ανθρωπόφιλα δερματόφυτα χαρακτηρίζονται από τη μετάδοση από άνθρωπο σε άνθρωπο, ευθύνονται για το ~70% των περιστατικών προκαλώντας χρόνιες λοιμώξεις και είναι γεωγραφικά περιορισμένα, με εξαίρεση το *T. rubrum* που ευδοκίμει συχνότερα στις αναπτυσσόμενες χώρες. Από την άλλη πλευρά, τα ζωόφιλα δερματόφυτα μεταδίδονται από τα ζώα στους ανθρώπους και είναι υπαίτια για το ~30% των περιπτώσεων προκαλώντας οξείες και περισσότερο φλεγμονώδεις λοιμώξεις, με τα *T. mentagrophytes* και *M. canis* να αποτελούν τα κύρια παθογόνα είδη που ανήκουν στη συγκεκριμένη κατηγορία. Εντούτοις, τα τελευταία χρόνια έχει παρατηρηθεί σημαντική πλήθυνση των δερματοφυτιών στους ανθρώπους λόγω της συχνής επαφής τους με τα ζώα. Τέλος, τα γεώφιλα δερματόφυτα αναπτύσσονται στο έδαφος και σπάνια προκαλούν λοιμώξεις στον άνθρωπο, με τη *N. gypsea* (πρώην *M. gypseum*) να αποτελεί το πιο κοινό ανθρώπινο παθογόνο αυτής της κατηγορίας [1].

Ενώ τα δερματόφυτα έχουν κοσμοπολίτικο χαρακτήρα και είναι κοινά τόσο στις αναπτυγμένες όσο και στις αναπτυσσόμενες χώρες, τα είδη που επικρατούν και οι κλινικές οντότητες που εμφανίζονται, διαφοροποιούνται ανά γεωγραφική περιοχή και χρονική περίοδο [12]. Γενικά, οι κλινικές εκδηλώσεις της δερματοφυτίας διαφέρουν ανάλογα με τον αιτιολογικό παράγοντα και την εστία της λοίμωξης. Ενδεικτικά, οι συνήθεις βλάβες του δέρματος είναι κυκλικές, ερυθρηματώδεις και προκαλούν κνησμό στον ξενιστή λόγω της άμεσης επαφής του με το παθογόνο ή/και των αντιδράσεων υπερευαισθησίας από τα μεταβολικά προϊόντα του [13]. Η έγκυρη διάγνωση των δερματοφυτικών λοιμώξεων είναι ιδιαίτερα σημαντική καθώς η κλινική τους εικόνα μπορεί να είναι μη ειδική ομοιάζοντας με άλλες δερματικές παθήσεις, ενώ συγχρόνως είναι ζωτικής σημασίας για την αποτελεσματική διαχείρισή τους και την πρόληψη της αντιμυκητικής αντοχής [14].

Αξίζει να σημειωθεί πως η μικροσκοπική εξέταση νωπού παρασκευάσματος και η καλλιέργεια, οι οποίες αποτελούν το χρυσό πρότυπο στη διάγνωση των δερματοφυτιών, χαρακτηρίζονται από μεταβαλλόμενα ποσοστά ειδικότητας (38-78%) και ευαισθησίας (24-79%) σε συνδυασμό με αυξημένο χρόνο λήψης αποτελεσμάτων (έως 4 εβδομάδες), αντίστοιχα, καθυστερώντας την έγκαιρη έναρξη της ενδεδειγμένης αντιμυκητικής θεραπείας [15]. Ως εκ τούτου, η ενσωμάτωση μη καλλιεργητικών μεθόδων στη διαγνωστική διαδικασία, όπως η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (polymerase chain reaction, PCR), αποτελεί ελκυστική εναλλακτική προσέγγιση.

## 1.2 Παθογένεια

Η παθογένεια των δερματοφυτιών εξαρτάται από τη σύνθετη αλληλεπίδραση μεταξύ του ξενιστή (εγγενής άμυνα και ανοσοαπόκριση), του παθογόνου παράγοντα και του περιβάλλοντος. Προκειμένου να επιτευχθεί ο αποικισμός του δερματόφυτου στο δέρμα, θα πρέπει αυτό να καταπολεμήσει τους αμυντικούς φραγμούς του ξενιστή, δηλαδή το όξινο pH και την απομάκρυνση των νεκρών κυττάρων του δέρματος, την παρουσία αντιμικροβιακών πεπτιδίων και λιπαρών οξέων, καθώς και τη δράση των φαγοκυττάρων [16-18]. Τα δερματόφυτα διαθέτουν ειδικές επιφανειακές πρωτεΐνες, τις προσκολλητίνες, με τη βοήθεια των οποίων επιτυγχάνεται η προσκόλληση των αρθροκονιδίων τους σε κερατινοποιημένους ιστούς σε σύντομο χρονικό διάστημα, εντός 2-6 ωρών, ώστε να αποφευχθεί η καταπολέμησή τους από τους αμυντικούς φραγμούς του ξενιστή [7-9]. Στη συνέχεια, ξεκινούν να εκβλαστάνουν στην κεράτινη στιβάδα του ξενιστή και το pH στο σημείο της μόλυνσης γίνεται πιο βασικό. Αυτό οφείλεται στην αποδόμηση της κερατίνης μέσω κατάλληλων πρωτεολυτικών ενζύμων, κυρίως κερατινολυτικές πρωτεάσες, που εκκρίνει το παθογόνο με σκοπό τη διάσπαση των μορίων κερατίνης, τη μετατροπή τους σε πηγές θρεπτικών συστατικών και τελικά το μεταβολισμό τους [19]. Ταυτόχρονα, τα δερματόφυτα παράγουν και άλλους παράγοντες που συμβάλλουν στην εισβολή τους, όπως μαννάνες που δρουν ως ανοσοκατασταλτικοί παράγοντες των λεμφοκυττάρων [20]. Στο επόμενο στάδιο, ακολουθεί η ανάπτυξη υφών και τέλος η παραγωγή αρθροκονιδίων εντός 7 ημερών από την έναρξη της μόλυνσης, επιτρέποντας έτσι στο μύκητα να εξαπλωθεί σε άλλες ανατομικές θέσεις του ξενιστή, σε άλλους ξενιστές ή στο περιβάλλον [7-9].



**Εικόνα 1.** Τα στάδια της παθογένειας της λοίμωξης από δερματόφυτα στο δέρμα [14].

Η παθογένεια της δερματοφυτικής ονυχομυκητίασης είναι λιγότερο μελετημένη [21]. Ωστόσο, μια αξιοσημείωτη πτυχή της αλληλεπίδρασης των δερματοφύτων με τους ξενιστές τους είναι ο σχηματισμός βιοϋμενίων κατά τη μόλυνση των ονύχων. Συγκεκριμένα, αυτά αποτελούν σύνθετες πολυκυτταρικές δομές, οι οποίες προστατεύονται από μία εξωκυττάρια μήτρα και περιβάλλουν τον παθογόνο μικροοργανισμό, προσδίδοντας του αυξημένη λοιμογονικότητα, βέλτιστη μικροβιακή επικοινωνία, διαφορική γονιδιακή έκφραση, αντοχή στα αντιμυκητικά και προστασία από τις άμυνες του ξενιστή [15,22,23].

### 1.3 Προδιαθεσικοί παράγοντες και παράγοντες κινδύνου

Η απομάκρυνση των νεκρών κυττάρων του δέρματος, η εξωτερική ξηρότητά του καθώς και τα αντιμικροβιακά πεπτίδια και τα λιπαρά οξέα που εκκρίνονται από αυτό, εμποδίζουν τη μόλυνσή του από παθογόνους μικροοργανισμούς. Επιπλέον, η ξεχωριστή ανατομία του όνυχος είναι επιρρεπής στο να παρέχει εύκολες πύλες εισόδου στα μικρόβια

μέσω της εγγύς και της περιφερικής πτυχής του, οι οποίες όμως προστατεύονται φυσικά από την επιδερμίδα και το παρωνύχιο, αντίστοιχα. Εντούτοις, υπάρχουν παράγοντες που ενισχύουν την προδιάθεση για δερματοφυτία [21,24,25]. Ανάμεσα σε αυτούς είναι το φύλο, το επάγγελμα, το γενετικό υπόστρωμα και η κατάσταση υγείας του ξενιστή, ιδιαίτερα η ανοσολογική, η λοιμογονικότητα του παθογόνου, διάφοροι περιβαλλοντικοί παράγοντες, όπως η αυξημένη θερμοκρασία και η υγρασία, η ανεπαρκής υγιεινή, το χαμηλό κοινωνικοοικονομικό επίπεδο και η επαφή με τα ζώα [10]. Ενδεικτικά, περιστατικά *tinea cruris*, *tinea pedis* και *tinea unguium* περιγράφονται κυρίως σε άντρες, ενώ περιπτώσεις *tinea capitis* συναντώνται πρωτίστως σε νεαρά παιδιά [26]. Επίσης, περιστατικά *tinea faciei* (ή *tinea mask*) αναφέρθηκαν κατά την πανδημία COVID-19 στην Ινδία, τα οποία σχετίζονταν με την αυξημένη χρήση μασκών προσώπου για την αποφυγή μόλυνσης από τον ιό SARS-CoV-2 [27].

Αξίζει να αναφερθεί πως αν και τα δερματόφυτα συνήθως σχετίζονται με επιφανειακές λοιμώξεις, η δερματοφυτία μπορεί να εξελιχθεί σε διηθητική, ιδίως σε ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς και σε άτομα με προδιάθεση [28]. Ειδικότερα, μεταξύ των υποκείμενων νοσημάτων και των παραγόντων που έχουν συσχετιστεί με την εμφάνισή της είναι η λοίμωξη από τον ιό της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας (human immunodeficiency virus, HIV), η μεταμόσχευση συμπαγών οργάνων, η λήψη κορτικοστεροειδών, η μετάλλαξη της πρωτεΐνης που ενεργοποιεί την κασπαση-9, η εξασθένηση της ανοσοαπόκρισης των Th17 κυττάρων, ο ΣΔ και ο προηγούμενος τραυματισμός [29-31].

#### 1.4 Αιτιολογικοί παράγοντες

Στις μέρες μας, το φάσμα των δερματοφυτιών, αναφορικά με τα κύρια παθογόνα που τις προκαλούν, άλλαξε σημαντικά συγκριτικά με πρώτο μισό του 20<sup>ου</sup> αιώνα. Έως το 1950, τα ανθρωπόφιλα *M. audouinii* και *T. schoenleinii* ήταν οι κυρίαρχοι αιτιολογικοί παράγοντες της *tinea capitis* στην Αμερική, καθώς και στη βόρεια και δυτική Ευρώπη, ενώ το ανθρωπόφιλο *T. rubrum* απομονωνόταν εξαιρετικά σπάνια στην Ευρώπη πριν από τη δεκαετία του 1940. Ωστόσο, στα τέλη του 20<sup>ου</sup> αιώνα, το *T. rubrum* αναδείχθηκε ως το κυρίαρχο δερματόφυτο υπεύθυνο για λοιμώξεις στο δέρμα και στους όνυχες παγκοσμίως, με επικράτηση 40-70% στην κεντρική και βόρεια Ευρώπη. Το ζωόφιλο *T. mentagrophytes* ήρθε δεύτερο σε σειρά επικράτησης, ενώ εμφανιζόταν ως ο πιο κοινός αιτιολογικός παράγοντας σε χώρες όπως η Κροατία, η Βενεζουέλα και το Ιράν [1]. Παρόμοια τάση

υπήρχε στις ΗΠΑ και στη νοτιοανατολική Ασία, ενώ στη νότια Ευρώπη τα ζώφιλα δερματόφυτα που απομονώνονταν συχνότερα ήταν τα *T. verrucosum* και *M. canis*. Στην Αφρική και στη δυτική Ασία, το συνηθεστέρα απομονωμένο δερματόφυτο ήταν το ανθρωπόφιλο *T. violaceum* και το ανθρωπόφιλο *E. floccosum*, αντίστοιχα. Βαδίζοντας στον 21<sup>ο</sup> αιώνα, ο επιπολασμός των *T. schoenleinii*, *M. audouinii* και *E. floccosum* μειώθηκε σημαντικά στις χώρες της Ευρώπης και τα δερματόφυτα αυτά αντικαταστάθηκαν από διάφορα *Trichophyton* spp. Σήμερα, το *T. rubrum* αποτελεί παγκοσμίως την πιο κοινή αιτία πρόκλησης δερματοφυτικής λοίμωξης, επηρεάζοντας την Αφρική, την Ασία, τη νότια Αμερική και την Ευρώπη [32].

| Classification | Species  | Primary Host/Habitat | Geographical Distribution                      |
|----------------|--|----------------------|--|
| Anthropophilic | <i>Trichophyton rubrum</i>   | Humans               | Worldwide                                      |
|                | <i>Trichophyton tonsurans</i>  | Humans               | Worldwide                                      |
|                | <i>Epidermophyton floccosum</i>  | Humans               | Worldwide                                      |
|                | <i>Trichophyton digitale</i>   | Humans               | Worldwide                                      |
|                | <i>Trichophyton schoenleinii</i>   | Humans               | Asia, Europe, Africa                           |
| Zoophilic      | <i>Microsporum canis</i>   | Cats                 | Worldwide                                      |
|                | <i>Nannizzia persicolor</i><br>(former name<br><i>Arthroderma persicolor</i> )             | Voles, bats          | Africa, Australia,<br>Europe,<br>North America |
|                | <i>Nannizzia nana</i><br>(former name<br><i>Microsporum nanum</i> )                        | Pigs                 | Worldwide                                      |
|                | <i>Trichophyton equinum</i>  | Horses               | Worldwide                                      |
|                | <i>Trichophyton mentagrophytes</i><br>(former name<br><i>Arthroderma vanbreuseghemii</i> ) | Mice, guinea pigs    | Worldwide                                      |
|                | <i>Trichophyton verrucosum</i>   | Cattle               | Worldwide                                      |
| Geophilic      | <i>Nannizzia gypsea</i><br>(former name<br><i>Microsporum gypseum</i> )                    | Soil                 | Worldwide                                      |

**Εικόνα 2.** Ταξινόμηση των πιο κοινών δερματοφύτων που προκαλούν λοιμώξεις σε ανθρώπους και ζώα [14].



## 1.5 Κλινικές εκδηλώσεις και επιδημιολογία

Όπως προαναφέρθηκε, τα δερματόφυτα γενικά προκαλούν επιφανειακές λοιμώξεις. Ωστόσο, έχουν γίνει αρκετές αναφορές για εν τω βάθι δερματοφυτίες, κατά τις οποίες ο μύκητας εισβάλλει στο χόριο και εξαπλώνεται στους λεμφαδένες, στην κυκλοφορία του αίματος και στον εγκέφαλο [28]. Οι δερματοφυτικές λοιμώξεις εμφανίζονται με διαφορετικές κλινικές μορφές, οι οποίες εξαρτώνται από το είδος του παθογόνου παράγοντα, τη θέση του σώματος που έχει μολυνθεί και την κερατινοποίησή της, καθώς και την ανοσολογική ικανότητα του ξενιστή [13]. Σύμφωνα με το σημείο της λοίμωξης οι δερματοφυτίες ταξινομούνται σε: *tinea capitis* (δερματοφυτία τριχωτού της κεφαλής), *tinea faciei* (δερματοφυτία προσώπου), *tinea barbae* (δερματοφυτία γενείου), *tinea corporis* (δερματοφυτία σώματος ή ψιλού δέρματος), *tinea cruris* (δερματοφυτία μηρογεννητικών πτυχών), *tinea manuum* (δερματοφυτία άκρων χειρών), *tinea pedis* (δερματοφυτία άκρων ποδών), *tinea unguium* (δερματοφυτία ονύχων).

- **Tinea capitis**

Η συγκεκριμένη λοίμωξη μπορεί να εντοπιστεί στο τριχωτό της κεφαλής, στα φρύδια ή στις βλεφαρίδες και κυρίως στους τριχοθύλακες και στο γύρω δέρμα, ενώ προκαλείται από *Trichophyton* spp. και *Microsporum* spp. [33]. Συναντάται συχνότερα σε παιδιά προεφηβικής ηλικίας, από 6 μηνών έως 12 ετών [34], όμως τα τελευταία χρόνια όλο και περισσότερο αυξάνεται το ποσοστό προσβολής και των ενηλίκων [35].

Στην Ευρώπη η *tinea capitis* παρουσιάζεται σε συχνότητα από 0,04% έως 78,6%. Προκαλείται κυρίως από ζωόφιλα δερματόφυτα, και συχνότερα από τα *M. canis* και *T. mentagrophytes*. Επίσης, σημαντικούς αιτιολογικούς παράγοντες αποτελούν τα ανθρωπόφιλα *T. soudanense* στη Γαλλία, *T. tonsurans* στην Ιρλανδία, καθώς και *T. violaceum* στην Ελβετία, στη Σκοτία και στη Σουηδία [36].

Αναφορικά με την Ασία, η συχνότητα εμφάνισης της νόσου κυμαίνεται από 0,01% έως 91,2% και παρατηρείται έντονη διαφοροποίηση των κυρίαρχων παθογόνων δερματοφύτων ανά γεωγραφική περιοχή. Συγκεκριμένα, στην Ινδία κυριαρχούν τα ανθρωπόφιλα *T. violaceum* και *T. tonsurans*, στη δυτική Ασία τα ζωόφιλα *T. mentagrophytes* και *M. canis*, και τα ανθρωπόφιλα *T. violaceum* και *T. verrucosum*, στην ανατολική Ασία το ζωόφιλο *M. canis* και το ανθρωπόφιλο *T. violaceum*, ενώ στη

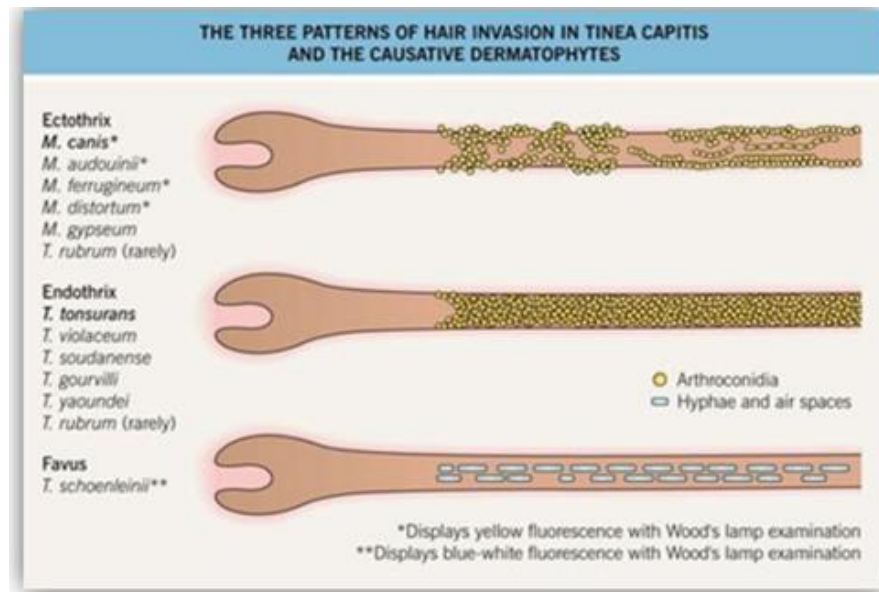
νοτιοανατολική Ασία το ζώοφιλο *M. canis*. Η Ταϊλάνδη αποτελεί εξαίρεση ανάμεσα στις χώρες της νοτιοανατολικής Ασίας, όπου κυρίαρχοι αιτιολογικοί παράγοντες είναι το ανθρωπόφιλο *T. rubrum* και το ζώοφιλο *T. mentagrophytes* [36-38].

Στην Αφρική, η συχνότητα εμφάνισης της νόσου κυμαίνεται από 0,4% έως 87,7% [24]. Στο βόρειο τμήμα της Αφρικανικής ηπείρου επικρατούν το ανθρωπόφιλο *T. violaceum* και το ζώοφιλο *M. canis*, στο νότιο και ανατολικό τμήμα της τα ανθρωπόφιλα *T. violaceum* και *M. audouinii*, ενώ στο δυτικό τμήμα της τα ανθρωπόφιλα *T. soudanense* και *M. audouinii* [3,39].

Στην Αμερική, η συχνότητα εμφάνισης της νόσου κυμαίνεται από 0,04% έως 78,6%. Ειδικότερα, στις ΗΠΑ κυριαρχεί το ανθρωπόφιλο *T. tonsurans* ενώ στην κεντρική Αμερική και στο Μεξικό επικρατεί το ζώοφιλο *M. canis* [36].

Η κλινική εικόνα της διαφέρει και διακρίνεται σε λοιμώξεις ενδοτριχικού τύπου, εξωτριχικού τύπου και άχωρα (favus) [35,40]. Στον ενδοτριχικό παρασιτισμό, οι υφές των μυκήτων εισβάλλουν στον άξονα της τρίχας, χωρίς όμως να επηρεάζεται ο φλοιός της και η επιφάνεια της επιδερμίδας [34]. Οι τρίχες σπάνε στο σημείο ανοίγματος του τριχοθυλακίου, δηλαδή στο σημείο έκφυσης τους από το δέρμα, με αποτέλεσμα την παρουσία μαύρων κουκίδων στο σημείο της λοίμωξης [34,35,40]. Αυτή η εικόνα συνοδεύεται από αρκετές στρογγυλές ξηρές πλάκες, λίγων χιλιοστών, οι οποίες είναι ερυθματώδεις και καλύπτονται από λέπια [35]. Από την άλλη πλευρά, στον εξωτριχικό παρασιτισμό, τα αρθροκονίδια των δερματοφύτων περιβάλλουν εξωτερικά τον άξονα της τρίχας, καταστρέφοντάς την [33]. Συγκεκριμένα, οι τρίχες σπάνε 2-3 mm από την επιφάνεια του δέρματος, με αποτέλεσμα την παρουσία μεμονωμένων ή πολλαπλών γκρίζων πλακών με λέπια και διάμετρο 1-5 cm, οι οποίες ομοιάζουν με κηλίδες αλωπεκίας [34,35,40]. Οι λοιμώξεις ενδοτριχικού τύπου προκαλούνται από ανθρωπόφιλα δερματόφυτα, και συχνότερα τα *T. tonsurans*, *T. soudanense* και *T. violaceum*, ενώ οι λοιμώξεις εξωτριχικού τύπου προκαλούνται κυρίως από ζώοφιλα δερματόφυτα, και συνήθως από το *M. canis* [34,40]. Σημειωτέον, οι βλάβες που προκαλούνται από τα ενδότριχα δερματόφυτα είναι πιο χρόνιες σε αντίθεση με αυτές των εξώτριχων [35]. Τέλος, ο άχωρας είναι μια ιδιαίτερη μορφή tinea capitis που προκαλείται από το ανθρωπόφιλο *T. schoenleinii* [34,35,40]. Οι υφές του μύκητα αναπτύσσονται εντός και κατά μήκος του στελέχους της τρίχας δημιουργώντας γραμμικούς χώρους αέρα [13,34]. Χαρακτηρίζεται από βλάβες κίτρινου χρώματος, οι οποίες περιέχουν κύτταρα της

επιδερμίδας, ουδετερόφιλα και υφές του μύκητα, και ονομάζονται scutula [33,41]. Η συγκεκριμένη λοίμωξη έχει χρόνια εξέλιξη και χωρίς την κατάλληλη θεραπεία μπορεί να προκληθεί ουλωτική αλωπεκία [33,35].



**Εικόνα 3.** Σχηματική αναπαράσταση των ειδών τριχικού παρασιτισμού στην tinea capitis και τα υπεύθυνα παθογόνα δερματοφύτα [41].

Η tinea capitis μπορεί να εξελιχτεί σε έμψυο τριχοφυτία που ονομάζεται Κηρίο του Κέλσον [35]. Πρόκειται για μια ιδιαίτερη μορφή δερματοφυτίας, η οποία χαρακτηρίζεται από επώδυνες πυώδεις και φλυκταινώδεις βλάβες που αρκετές φορές συνοδεύονται από λεμφαδενοπάθεια [33,35,41]. Αυτή η λοίμωξη είναι αποτέλεσμα της ειδικής ανοσολογικής απόκρισης του ξενιστή απέναντι στο ζωόφιλο ή γεώφιλο παθογόνο, όπως *T. mentagrophytes*, *T. verrucosum*, *M. canis*, *N. nana* (πρώην *M. nanum*) και *N. gypsea* (πρώην *M. gypseum*) [35,41].



**Εικόνα 4.** Κηρίο του Κέλσου από *M. canis* σε νεαρό παιδί [41].

- **Tinea faciei**

Η συχνότητα εμφάνισης της λοίμωξης κυμαίνεται από 0,4% έως 4,2% στις διάφορες περιοχές του κόσμου [37,42-54]. Η tinea faciei εμφανίζεται πιο συχνά σε παιδιά <12 ετών [49,55]. Στην Ευρώπη παρουσιάζονται ζωόφιλα δερματόφυτα ως κύριοι αιτιολογικοί παράγοντες της νόσου [30,36,44,45]. Ειδικότερα, στην Ελβετία και στη Σλοβακία επικρατεί το ζωόφιλο *T. mentagrophytes*, στην Ιταλία και στην Ελλάδα το ζωόφιλο *M. canis*, ενώ στη Γερμανία το ανθρωπόφιλο *T. rubrum* [42,58,56,57]. Στην Ασία κυριαρχούν τα *Trichophyton* spp., όπως τα ανθρωπόφιλα *T. rubrum* και *T. tonsurans*, και το ζωόφιλο *T. mentagrophytes* [37,46,51,58].

Οι βλάβες της εμφανίζονται ως δακτυλιοειδείς ερυθρηματώδεις φολιδωτές πλάκες, μονήρεις ή πολλαπλές, με κεντρική κάθαρση [59,60]. Η μόλυνση του ανθρώπου επιτυγχάνεται είτε από την επαφή του με κατοικίδια ζώα, τα οποία φέρουν το ζωόφιλο παθογόνο δερματόφυτο, είτε μέσω αυτοενοφθαλμισμού του μύκητα από λοίμωξη διαφορετικού σημείου του σώματος [61].



**Εικόνα 5.** Φλεγμονώδης tinea faciei από *T. mentagrophytes* [13].

- **Tinea barbae**

Αποτελεί μια σπανιότερη μορφή tinea faciei κατά την οποία επηρεάζονται τα τριχοθυλάκια του γενείου και του μουστακιού των ενήλικων αντρών [62]. Προκαλείται από ανθρωπόφιλα και ζωόφιλα δερματοφύτα, με συχνότερους αιτιολογικούς παράγοντες τα *T. verrucosum*, *T. mentagrophytes*, *T. tonsurans*, *T. benhamiae* και *T. rubrum* [63-67].

Η συγκεκριμένη λοίμωξη εμφανίζεται με δύο κλινικές μορφές. Η πρώτη μορφή ομοιάζει με κάθε επιφανειακή δερματοφυτία του δέρματος, δηλαδή ερυθματώδεις ξηρές και φολιδωτές κηλίδες, ενώ η δεύτερη είναι πιο φλεγμονώδης και χαρακτηρίζεται από ερυθρές βλατίδες και φλυκταινίδια που μπορεί να οδηγήσουν και σε Κηρίο [35,62].



**Εικόνα 6.** Tinea barbae από *T. mentagrophytes* με βλατίδες και φλυκταινίδια [62].

- **Tinea corporis**

Ο όρος tinea corporis αφορά δερματοφυτικές λοιμώξεις του δέρματος σε περιοχές του σώματος εκτός από το πρόσωπο, τις μηρογεννητικές πτυχές, τα χέρια και τα πόδια [68]. Στην Αφρική η συχνότητα εμφάνισής της κυμαίνεται από 2% έως 41%, ενώ σε άλλες περιοχές παγκοσμίως από 2,8% έως 30,3% [3,37,42-54]. Σε παγκόσμιο επίπεδο, τα τελευταία χρόνια, οι κυρίαρχοι αιτιολογικοί παράγοντες είναι τα *Trichophyton* spp., με πιο κοινό το ανθρωπόφιλο *T. rubrum* και ακολούθως το ζωόφιλο *M. canis*, το ανθρωπόφιλο *T. tonsurans* και το γεώφιλο *N. gypsea* (πρώην *M. gypseum*) [14].

Παρατηρούνται δακτυλιοειδείς ερυθρηματώδεις φολιδωτές πλάκες, οι οποίες χαρακτηρίζονται από έντονο κόκκινο/ροζ περίγραμμα [13,61], το μέγεθός τους είναι συνήθως 1-5 cm και μπορεί να είναι μεμονωμένες ή πολλαπλές [69]. Η συγκεκριμένη λοίμωξη είναι γνωστή και με τον όρο «ringworm», διότι όσο εξελίσσεται η λοίμωξη παρατηρείται κεντρική κάθαρση και εντονότερο περίγραμμα στις βλάβες [13,69]. Οι βλάβες που προκαλούνται από ζωόφιλα και γεώφιλα δερματόφυτα είναι πιο φλεγμονώδεις με τη μορφή βλατίδων και φλυκταινών [13].



**Εικόνα 7.** Τυπική εικόνα «ringworm» από *M. canis* [13].

Η tinea corporis εμφανίζεται και με άλλες μορφές που παρουσιάζουν διαφορετική κλινική εικόνα:

- Τα κοκκιώματα Majocchi είναι ερυθρηματώδεις βλατίδες, οζίδια ή φλυκταινίδια που παρατηρούνται κυρίως στα πόδια [13] και προσβάλλουν συχνότερα τις γυναίκες [70]. Οι κύριοι παράγοντες κινδύνου για την εμφάνιση τους είναι το τραύμα, συνήθως λόγω

ξυρίσματος των κάτω άκρων, και η ανοσοκαταστολή. Παρόλο που προκαλούνται κυρίως από ανθρωπόφιλα δερματόφυτα, οι βλάβες είναι επώδυνες και φλεγμονώδεις [70].

- Η *tinea imbricata* (Tokelau) είναι μια δερματοφυτική λοίμωξη που προκαλείται από το ανθρωπόφιλο *T. concentricum* και εντοπίζεται συχνότερα στην Ασία, στη Μέση Ανατολή, στην Ωκεανία και το νότιο τμήμα της Αμερικής. Παρατηρούνται δακτυλιοειδείς φολιδωτές ωχρές κηλίδες, οι οποίες εντοπίζονται κυρίως στον κορμό ή στα άκρα [71].

- Η *tinea corporis gladiatorum* παρατηρείται συχνότερα στο κεφάλι, στο λαιμό και στα χέρια, δηλαδή στις εκτεθειμένες περιοχές που έρχονται σε επαφή κατά την πάλη σώμα με σώμα [13]. Απασχολεί κυρίως τους αθλητές αθλημάτων επαφής, όπως οι παλαιστές, και τα μέλη των οικογενειών τους. Παράγοντες που συμβάλλουν στην εμφάνιση της είναι η υπερίδρωση και η κακή υγιεινή, ενώ προκαλείται κυρίως από το ανθρωπόφιλο *T. tonsurans* [72,73].

- Η *tinea incognito* είναι μια μορφή *tinea corporis* στην οποία εφαρμόστηκαν τοπικά κορτικοστεροειδή [13,74]. Η κλινική της εικόνα δεν είναι ειδική και ομοιάζει με άλλες δερματικές παθήσεις, όπως θυλακίτιδα [35]. Αυτή η μορφή μπορεί να καταλήξει σε βαθιά θυλακίτιδα αν τα δερματόφυτα εισβάλλουν στον υποδόριο ιστό [68].

## • **Tinea cruris**

Ο όρος *tinea cruris* αναφέρεται στις δερματοφυτικές λοιμώξεις της περιοχής των μηροβουβωνικών πτυχών και των γλουτών [13,35]. Είναι γνωστή και ως «φαγούρα Jock» και απασχολεί συχνότερα νεαρούς ενήλικες άντρες [13,35,68]. Η συχνότητα εμφάνισής της κυμαίνεται από 0,3% έως 53,0% [37,42-54]. Ο κύριος αιτιολογικός παράγοντας παγκοσμίως είναι το ανθρωπόφιλο *T. rubrum* και ακολούθως το ζωόφιλο *T. mentagrophytes* και το ανθρωπόφιλο *E. floccosum* [37,75-77]. Αξίζει να σημειωθεί πως τα τελευταία 30 χρόνια έχει παρατηρηθεί μείωση του επιπολασμού του *E. floccosum* στη Γερμανία, στη Χιλή και στην Ταϊλάνδη, ενώ στο Ιράν παραμένει ως κύριος αιτιολογικός παράγοντας της *tinea cruris* [37,51,52,75-77].

Παρατηρούνται δακτυλιοειδείς ερυθρηματώδεις φολιδωτές πλάκες, μεμονωμένες ή πολλαπλές, οι οποίες χαρακτηρίζονται από έντονο κόκκινο/ροζ περίγραμμα και κεντρικό καθαρισμό [13,35]. Σε πιο οξείες μορφές της λοίμωξης μπορεί να εμφανιστούν φλύκταινες γύρω από το ενεργό άκρο [13]. Επίσης, συναντάται έντονος κνησμός και το αίσθημα καύσου στις περιοχές των βλαβών [13,35]. Η λοίμωξη μπορεί να προκληθεί και από αυτοενοφθαλμισμό του παθογόνου από *tinea pedis* ή *tinea unguium* [13,59].



**Εικόνα 8.** *Tinea cruris* στη βουβωνική χώρα [78].

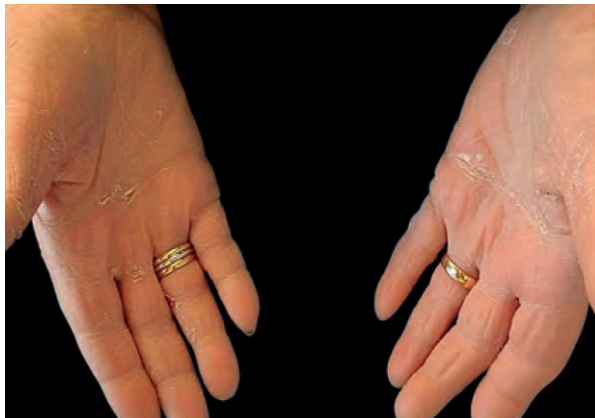
- **Tinea manuum**

Ο όρος *tinea manuum* αναφέρεται στη δερματοφυτία των χεριών και συγκεκριμένα των παλαμών, της ράχης ή των μεσοδακτύλιων πτυχών του ενός ή και των δύο άνω άκρων [79-81]. Ο επιπολασμός της κυμαίνεται από 0,8% έως 12,6% [37,42-54]. Συχνότερος αιτιολογικός της παράγοντας παγκοσμίως είναι το ανθρωπόφιλο *T. rubrum* και ακολούθως τα ζωόφιλα *T. mentagrophytes* και *M. canis* [82]. Ωστόσο, τα τελευταία χρόνια έχει απομονωθεί σε αρκετές περιπτώσεις το ζωόφιλο *T. erinacei* σε διάφορες περιοχές στον κόσμο [83-86]. Αξίζει να σημειωθεί πως το συγκεκριμένο παθογόνο απομονώνεται συχνά από τους σκαντζόχοιρους και είναι πιθανό να προκαλέσει εκτεταμένη μόλυνση σε ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς [87]. Σε γενικά πλαίσια, όταν η *tinea manuum* οφείλεται σε ζωόφιλα δερματόφυτα, οι βλάβες είναι πιο φλεγμονώδεις και εντοπίζονται φλυκταινίδια [13,80].

Η κλινική εικόνα της ραχιαίας μόλυνσης ομοιάζει με αυτή της *tinea corporis*, δηλαδή οι βλάβες είναι δακτυλιοειδείς ερυθρηματώδεις φολιδωτές κηλίδες, ενώ οι βλάβες των παλαμών και των μεσοδακτύλιων περιοχών είναι ξηρές με έντονη λευκή απολέπιση



[13,80,81]. Συχνότερα παρατηρείται το «σύνδρομο δύο ποδιών, ενός χεριού», κατά το οποίο εντοπίζεται παράλληλη δερματοφυτική λοίμωξη συγχρόνως στα δύο πόδια και στο ένα χέρι [13,80].



**Εικόνα 9.** Tinea manuum από *T. rubrum* στην επιφάνεια των παλαμών [81].

- **Tinea pedis**

Ο όρος tinea pedis, γνωστή και ως «πόδι του αθλητή», αναφέρεται στη δερματοφυτία του ποδιού και συγκεκριμένα του πέλματος, του μεσοδακτύλιου χώρου και της ραχιαίας επιφάνειάς του [13,35]. Αποτελεί τη συχνότερη δερματοφυτική λοίμωξη στις αναπτυγμένες χώρες [13] και ο επιπολασμός της κυμαίνεται από 5,9% έως 52,4% [37,42-53]. Οι κύριοι αιτιολογικοί της παράγοντες είναι τα *Trichophyton* spp., με κυρίαρχο το ανθρωπόφιλο *T. rubrum* και ακολούθως το ζωόφιλο *T. mentagrophytes* [88]. Αξίζει να σημειωθεί πως τα κάτω άκρα είναι μια δεξαμενή μυκήτων από την οποία μπορεί να προκύψει αυτοενοφθαλμισμός του παθογόνου μύκητα σε άλλα σημεία του σώματος [88], ενώ έχει παρατηρηθεί συχνά ταυτόχρονη tinea pedis και tinea unguium [13].

Η συγκεκριμένη δερματοφυτία εντοπίζεται με τρεις διαφορετικούς κλινικούς υπότυπους:

- Ο μεσοδακτυλικός τύπος εκδηλώνεται στις μεσοδακτυλικές πτυχές, συνήθως στην 3<sup>η</sup> και στην 4<sup>η</sup>, και εμφανίζεται με ερύθημα και απολέπιση ή λευκή διαβροχή της πτυχής. Σημειώνεται έντονο αίσθημα κνησμού, καύσου και δυσσομία [13,35,69,78,88]. Αυτές οι βλάβες συχνά επεκτείνονται στην επιφάνεια του πέλματος και σπανιότερα στη ραχιαία επιφάνεια του ποδός [35,88]. Αποτελεί τον πιο κοινό τύπο tinea pedis [69,78,88,89].

- Ο υπερκερατωσικός τύπος, γνωστός και ως «πόδι μοκασίνι», χαρακτηρίζεται από ερύθημα και γκριζές ή λευκές ξηρές φολιδωτές πλάκες, οι οποίες εντοπίζονται στην περιοχή του πέλματος, στις φτέρνες και στις πλάγιες πλευρές του ποδιού [13,35,78,88,89]. Αποτελεί μια χρόνια μορφή *tinea pedis* και εμφανίζει αντοχή στη θεραπεία [89].

- Ο δυσιδρωτικός τύπος χαρακτηρίζεται από την παρουσία ερυθήματος και κυστιδίων ή φυσαλίδων στην καμάρα του πέλματος και στις πλάγιες πλευρές του ποδιού, καθώς και από έντονο κνησμό [13,35,89].

Το *T. rubrum* απαντάται συχνότερα στο μεσοδακτύλιο και στον υπερκερατωσικό τύπο, ενώ το *T. mentagrophytes* απαντάται συχνότερα στο μεσοδακτύλιο και στο δυσιδρωτικό τύπο [89].



**Εικόνα 10.** Μεσοδακτυλικός (αριστερά) [90] και υπερκερατωσικός (δεξιά) [78] τύπος *tinea pedis*.

- ***Tinea unguium***

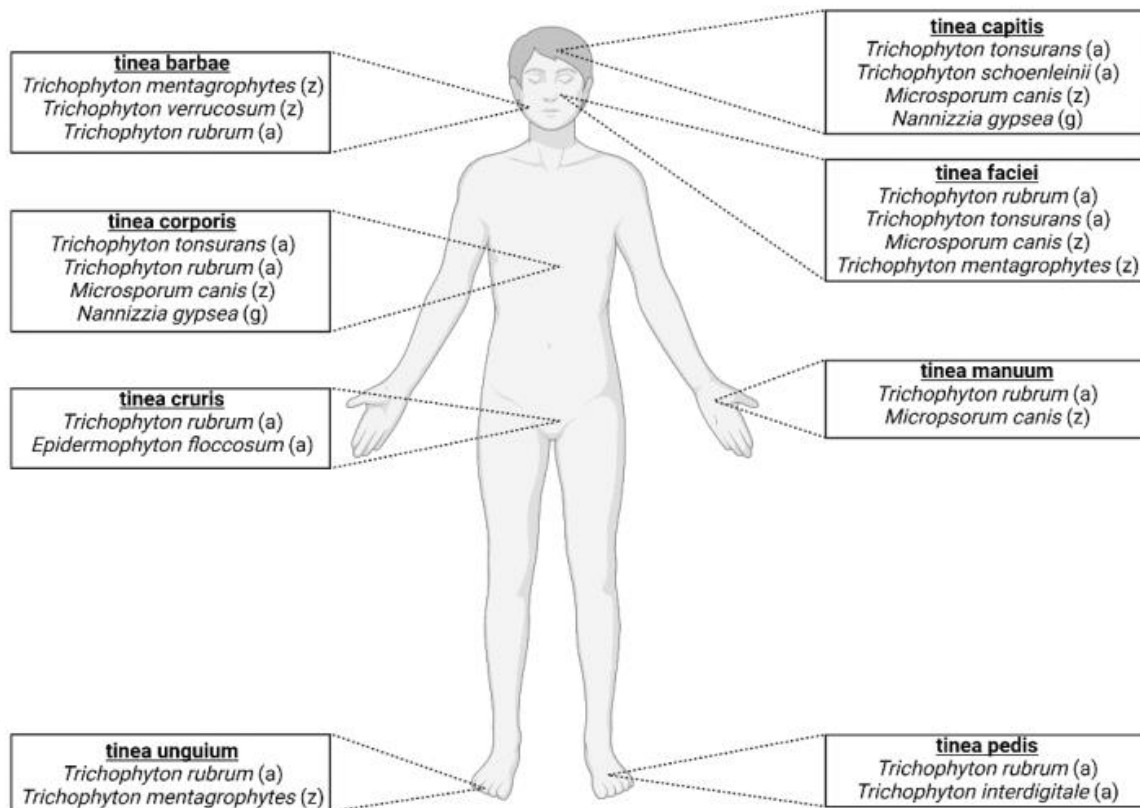
Τα δερματόφυτα ευθύνονται για το 60-70% των περιπτώσεων ονχομυκητίασης παγκοσμίως [91,92] και παρατηρείται η τάση να μολύνουν συχνότερα τους όνυχες των ποδιών [13,35,40]. Σύμφωνα με πρόσφατες μελέτες, έχει παρατηρηθεί υψηλότερος επιπολασμός της *tinea unguium* έναντι άλλων δερματοφυτικών λοιμώξεων, που κυμαίνεται από 3,0% έως 82,9% [37,42-53]. Ο πιο κοινός αιτιολογικός της παράγοντας είναι το ανθρωπόφιλο *T. rubrum*, ακολουθούμενο από το ζώοφιλο *T. mentagrophytes* και το ανθρωπόφιλο *T. interdigitale* [91,92]. Σε σπάνιες περιπτώσεις, συναντάται ως παθογόνο το ζώοφιλο *M. canis*, το οποίο εντοπίζεται κυρίως σε ασθενείς με ιστορικό επαφής με μολυσμένο κατοικίδιο [93].

Η tinea unguium εκδηλώνεται με πέντε κλινικές μορφές:

- Η περιφερική-άπω πλάγια ονυχομυκητίαση αποτελεί την πιο συχνή μορφή [13,35,78,94]. Το παθογόνο προσβάλλει αρχικά την κεράτινη επιφάνεια του όνυχος και ακολούθως επεκτείνεται κάτω από αυτή, στην περιοχή της μήτρας [13,35,94]. Επακόλουθο αυτού είναι η πάχυνση και υπερκεράτωση του όνυχος, και τελικά η λύση του [13,35]. Ο όνυχας αποκτά κιτρινωπή έως καφέ απόχρωση [13,35,78].
- Στην επιφανειακή ονυχομυκητίαση το παθογόνο προσβάλλει την κεράτινη στιβάδα της επιφάνειας του όνυχος και εντοπίζονται λευκές κηλίδες, οι οποίες μπορεί να καλύψουν ολόκληρη την επιφάνειά του [13,35,78]. Συνήθως προκαλείται από το ζωόφιλο *T. mentagrophytes* [13,94].
- Η εγγύς υπονύχια ονυχομυκητίαση αποτελεί αρκετά σπάνια μορφή κατά την οποία η λοίμωξη ξεκινά με την προσβολή της περιοχής της μήτρας του όνυχος από το παθογόνο. Εντοπίζεται ως μια κηλίδα λευκού χρώματος κάτω από την επιδερμίδα που επεκτείνεται περιφερικά. Συχνότερος αιτιολογικός της παράγοντας είναι το ανθρωπόφιλο *T. rubrum* [13,35].
- Η ενδονύχια ονυχομυκητίαση προκαλείται κυρίως από τα ανθρωπόφιλα *T. soudanense* και *T. violaceum* και εκδηλώνεται με λευκόφαιο-γαλακτώδες χρωματισμό και απουσία υπερκεράτωσης ή ονυχόλυσης της κοίτης του όνυχος [13].
- Η ολική δυστροφική ονυχομυκητίαση αποτελεί το τελικό στάδιο της ονυχομυκητίασης κατά το οποίο ο όνυχας παρουσιάζει υπερκεράτωση σε όλη την ονυχιαία πλάκα, θρυμματίζεται και τελικά καταστρέφεται [13].



**Εικόνα 11.** Κλινικές μορφές tinea unguium. Α) Περιφερική-άπω πλάγια ονυχομυκητίαση [78], Β) επιφανειακή ονυχομυκητίαση [94], Γ) εγγύς υπονόχια ονυχομυκητίαση [95], Δ) ενδονύχια ονυχομυκητίαση [95] και Ε) ολική δυστροφική ονυχομυκητίαση [95].



**Εικόνα 12.** Ταξινόμηση της δερματοφυτίας στον άνθρωπο μαζί με την ανατομική θέση της λοίμωξης (τα όργανα ή τους ιστούς) και τους πιο διαδεδομένες δερματοφυτικούς μύκητες που την προκαλούν. (a): ανθρωπόφιλος, (z): ζωόφιλος, (g): γεωφίλος [14].

## 1.6 Εργαστηριακή μικροβιολογική διάγνωση

Η κλινική εικόνα των επιπολής μυκητιάσεων συχνά ομοιάζει με αυτές άλλων δερματοπαθειών [14]. Επομένως, η οριστική διάγνωσή τους πρέπει να πραγματοποιείται με ειδικές μεθόδους [41], οι οποίες αποσκοπούν είτε στον αποκλεισμό της ύπαρξης της λοίμωξης, είτε στην ταυτοποίηση του αιτιολογικού της παράγοντα, συμβάλλοντας στον καθορισμό και στην παρακολούθηση της θεραπείας, στην επιβεβαίωση του θεραπευτικού αποτελέσματος, καθώς και στην αποφυγή της άσκοπης θεραπείας και της μετάδοσης της νόσου [14,96,97].

Η συμβατική μεθοδολογία που ακολουθείται για τη διάγνωση των δερματοφυτιών σε ένα μικροβιολογικό εργαστήριο περιλαμβάνει τρία στάδια: τη συλλογή του κλινικού δείγματος από επιλεγμένο σημείο της βλάβης, την άμεση μικροσκοπική του εξέταση και την καλλιέργειά του. Σε περίπτωση απομόνωσης δερματοφυτικού μύκητα στην καλλιέργεια, ακολουθεί και ένα τέταρτο στάδιο, αυτό της ταυτοποίησης του παθογόνου σε επίπεδο γένους και είδους [97]. Τα τελευταία χρόνια, ωστόσο, η διάγνωση των δερματοφυτικών λοιμώξεων εκσυγχρονίζεται ολοένα και περισσότερο μέσω της χρήσης μη καλλιεργητικών μεθόδων για την άμεση ανίχνευση του παθογόνου απευθείας από το κλινικό δείγμα, όπως της PCR.

- **Συλλογή κλινικού δείγματος**

Η τήρηση ορισμένων διαδικασιών κατά τη συλλογή του κλινικού δείγματος ενισχύει σημαντικά την εγκυρότητα μιας διαγνωστικής δοκιμασίας για την ανίχνευση δερματοφύτων [14]. Ιδανικά, πρέπει να συλλέγεται όσο το δυνατόν περισσότερη ποσότητα δείγματος, και μάλιστα από επιλεγμένο σημείο της αλλοίωσης, προς αποφυγή ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων δεδομένου ότι οι μύκητες δεν είναι ισομερώς κατανομημένοι σε αυτό. Επιπλέον, η λήψη του δείγματος είναι εξαιρετικά σημαντικό να πραγματοποιείται πριν από την έναρξη θεραπείας. Σε περίπτωση που έχει πραγματοποιηθεί χρήση είτε ειδικής (τοπικής ή συστηματικής αντιμυκητικής) είτε μη ειδικής (κορτιζονούχα σκευάσματα και τοπικά αντισηπτικά) αγωγής, η διακοπή της επιβάλλεται για χρονικό διάστημα που ποικίλει. Η μη τήρηση των προαναφερθέντων μπορεί να οδηγήσει σε ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα στην καλλιέργεια. Τέλος, η δειγματοληψία θα πρέπει να λαμβάνει χώρα υπό άσηπτες συνθήκες. Έτσι, προτείνεται, πριν τη λήψη του δείγματος, ο καθαρισμός της περιοχής που εμφανίζει τη βλάβη με διάλυμα αιθυλικής αλκοόλης 70%,

προκειμένου να απομακρυνθούν πιθανοί μικροοργανισμοί που θα μπορούσαν να προκαλέσουν επιμόλυνση της καλλιέργειας [35,97].

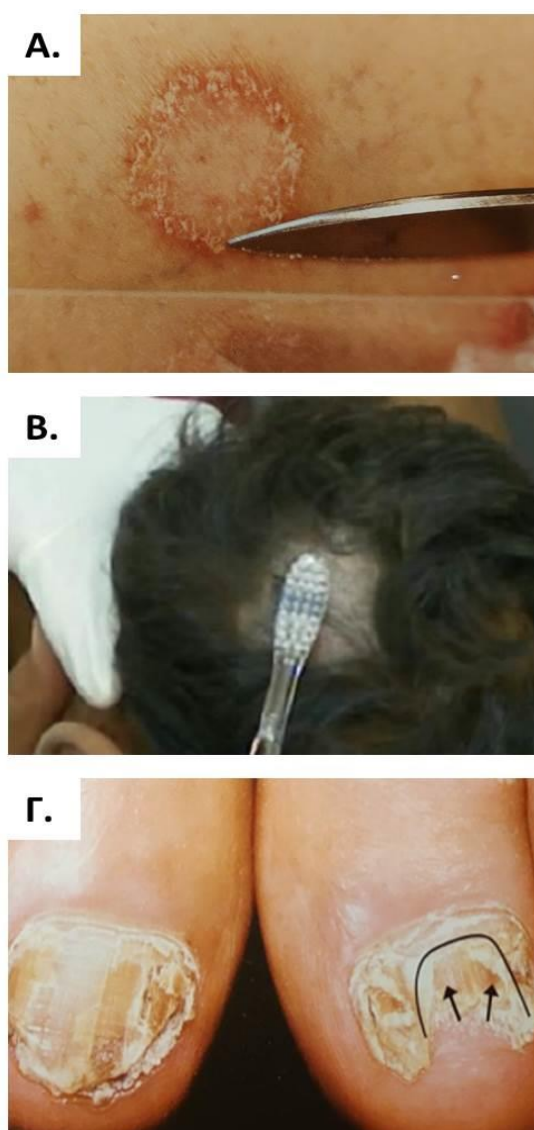
Τα λέπια ψιλού δέρματος συλλέγονται αποξέοντας υπό γωνία, με ήπιες και σταθερές κινήσεις, τις παρυφές της χαρακτηριστικής δακτυλιοειδούς αλλοίωσης, καθώς η λοίμωξη είναι πιο ενεργή σε αυτά τα σημεία, είτε με τη βοήθεια αποστειρωμένου ή μιας χρήσης ξέστρου είτε με το άκρο μιας αντικειμενοφόρου πλάκας. Αν ο ασθενής φέρει πολλαπλές βλάβες, επιλέγονται οι πιο πρόσφατες, διότι στις πιο παλιές τα λέπια δε συνδέονται σφιχτά με τον επιδερμικό ιστό και δεν ανευρίσκονται εκεί στοιχεία του παθογόνου [35,97].

Αναφορικά με τη συλλογή τριχών από το τριχωτό κεφαλής, λαμβάνονται τρίχες και ρίζες τους από την περιφέρεια της περιοχής της βλάβης με τη χρήση ξέστρου ή αντικειμενοφόρου πλάκας. Εναλλακτικά, μπορεί να πραγματοποιηθεί επισταμένο και με σταθερές κινήσεις βούρτσισμα του τριχωτού της κεφαλής με οδοντόβουρτσα μιας χρήσης. Η μέθοδος αυτή εφαρμόζεται κατά προτίμηση στους μικρούς ηλικιακά ασθενείς, στους ασυμπτωματικούς φορείς και σε άτομα που δε φέρουν εμφανείς αλλοιώσεις [35,97]. Στο σημείο αυτό αξίζει να αναφερθεί και η χρήση της λυχνίας Wood, η οποία λειτουργεί επικουρικά για την επιλογή και τη συλλογή των προσβεβλημένων τριχών, ενώ συγχρόνως μπορεί να παρέχει μια προκαταρκτική διάγνωση ορισμένων *tinea capitis*. Συγκεκριμένα, στο υπεριώδες φως της λυχνίας (320-450 nm), οι προσβεβλημένες από *Microsporum* spp. τρίχες εκπέμπουν χαρακτηριστικό πράσινο ή κυανοπράσινο φθορισμό. Ωστόσο, η *tinea capitis* μπορεί να προκληθεί και από άλλα δερματόφυτα, οπότε δεν μπορεί να αποκλειστεί οριστικά η ύπαρξη λοίμωξης κατά την εφαρμογή της συγκεκριμένης μεθόδου. Επίσης, φθορισμός μπορεί να εντοπιστεί και σε άλλες δερματολογικές διαταραχές, όπως βακτηριακές λοιμώξεις, καθώς και μετά από τη χρήση τοπικής αντιμυκητικής αγωγής, παρέχοντας ψευδώς θετικά αποτελέσματα [32,98].

Από την άλλη πλευρά, ο τρόπος συλλογής ξεσμάτων όνυχος καθορίζεται από την κλινική μορφή της λοίμωξης. Έτσι, στην περίπτωση περιφερικής-άπω πλάγιας ονυχομυκητίασης, συλλέγονται τρίμματα από το βαθύτερο σημείο της κοίτης, κυρίως από το σημείο μεταξύ του υγιούς και του κατεστραμμένου τμήματος, ενώ ξέσματα από την επιφάνεια της ονυχιαίας πλάκας θεωρούνται ακατάλληλα. Στην εγγύς υπονύχια ονυχομυκητίαση λαμβάνονται ξέσματα από τη λευκή κηλίδα που εμφανίζεται κοντά στο μηνίσκο, τα οποία συνιστάται να προέρχονται από την κατώτερη και τις ενδιάμεσες στιβάδες της ονυχιαίας πλάκας, ενώ στην ενδονύχια ονυχομυκητίαση συλλέγονται

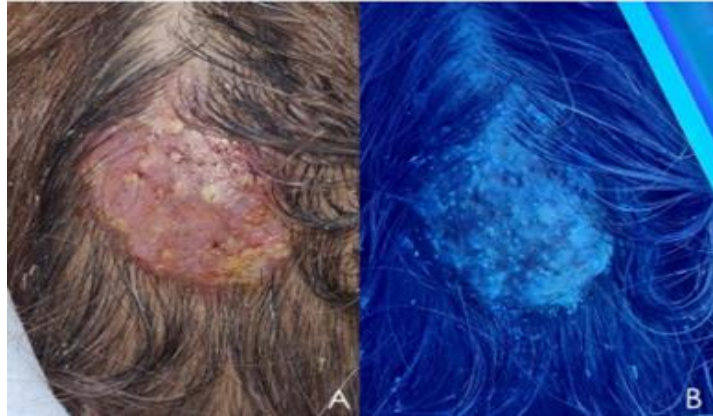
τιμήματα της προσβεβλημένης περιοχής του όνυχος. Τέλος, στην επιφανειακή ονυχομυκητίαση λαμβάνονται εύθρυπτα ξέσματα από την επιφάνεια της ονυχιαίας πλάκας, ενώ στην ολική δυστροφική ονυχομυκητίαση συλλέγονται τρίμματα από πολλαπλά τμήματα της εύθρυπτης και υπερκερατωσικής κοίτης του όνυχος [35,97].

Η συλλογή του κλινικού δείγματος πραγματοποιείται σε πλαστικά (μόνο όνυχες) ή αποστειρωμένα γυάλινα τρυβλία Petri, αντικειμενοφόρες πλάκες και χάρτινα σκουρόχρωμα υλικά μεταφοράς, τα οποία αποθηκεύονται σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι την επεξεργασία του [35,97].



**Εικόνα 13.** Συλλογή Α) λεπιών δέρματος από την παρυφή της βλάβης με τη χρήση ξέστρου, Β) δείγματος τριχωτού κεφαλής με οδοντόβουρτσα και Γ) ξεσμάτων όνυχος από το βαθύτερο σημείο της κοίτης σε περιστατικό περιφερικής-άπω πλάγιας ονυχομυκητίασης [97].





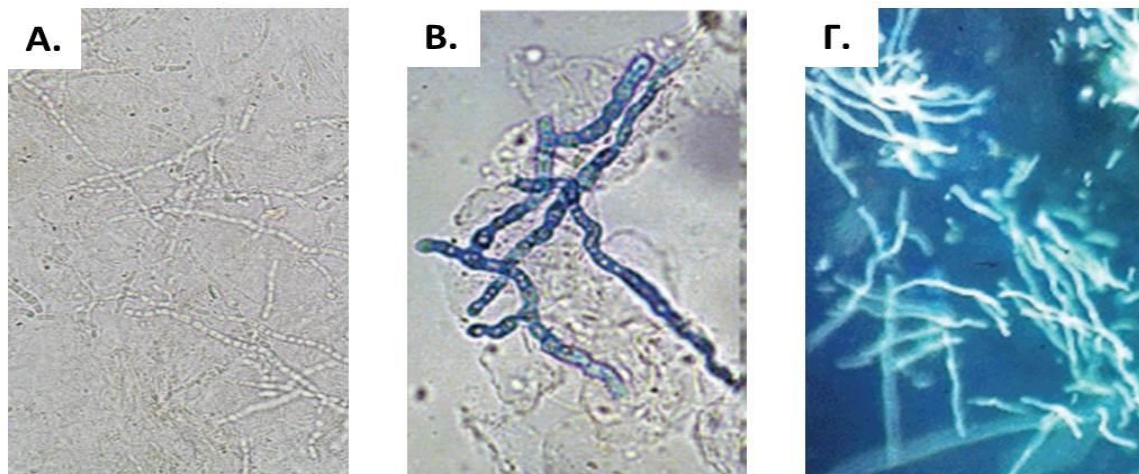
**Εικόνα 14.** Κηρίο του Κέλσου από *M. canis*. A) Κλινική εικόνα της πυώδους φλεγμονώδους πλάκας με αλωπεκία και B) εκτομή κυανοπράσινου φθορισμού κατά την εξέταση με λυχνία Wood [32].

- **Άμεση μικροσκόπηση**

Η μικροσκόπηση νωπού παρασκευάσματος είναι τεχνικά απλή και χαμηλού κόστους, ενώ παρέχει ένα γρήγορο αποτέλεσμα που καταδεικνύει την παρουσία ή μη μυκητικών στοιχείων ενδεικτικών της μόλυνσης στο υπό έλεγχο δείγμα, επιτρέποντας έτσι την άμεση έναρξη θεραπείας. Ωστόσο, θεωρείται μια διαγνωστική τεχνική χαμηλής εξειδίκευσης καθώς η απόδοσή της επηρεάζεται σημαντικά από την εξειδίκευση και την εμπειρία του μικροσκοπιστή, ενώ συγχρόνως δεν επιτρέπει τον προσδιορισμό του γένους ή του είδους του παθογόνου. Ως εκ τούτου, η μη ανεύρεση μυκητικών στοιχείων στα άμεσα παρασκευάσματα δεν μπορεί να αποκλείσει την ύπαρξη μυκητικής λοίμωξης [97].

Σε περίπτωση υποψίας δερματοφυτικής λοίμωξης, κατά την άμεση μικροσκόπηση αναζητούνται υφές και αρθροκονίδια του αιτιολογικού παράγοντα. Αρχικά, το κλινικό δείγμα κατεργάζεται με διάλυμα KOH 10-20% προκειμένου να διαυγαστεί και ακολούθως μικροσκοπείται με μικροσκόπιο ορατού φωτός. Εναλλακτικά, μπορεί να χρησιμοποιηθεί η χρωστική Chlorazol Black E, η οποία προσροφάται εκλεκτικά από τη χιτίνη του κυτταρικού τοιχώματος των δερματοφύτων και οι υφές τους χρωματίζονται κυανόμαυρες. Εντούτοις, η χρήση μικροσκοπίου φθορισμού και των αντίστοιχων χρωστικών που προσκολλούνται στη χιτίνη του κυτταρικού τοιχώματος των μυκήτων, όπως η Calcofluor White και η Blankophor, βελτιώνει αισθητά την ευαισθησία της μεθόδου (82-91% έναντι 74-85% μόνο με κατεργασία με διάλυμα KOH) και επιτρέπει την πιο ταχεία σάρωση του δείγματος [99].





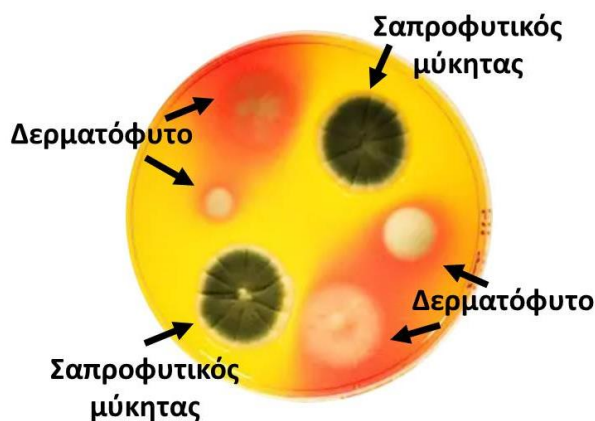
**Εικόνα 15.** Μικροσκόπηση νωπών παρασκευασμάτων ονύχων που έχουν προσβληθεί από δερματόφυτα (αντικειμενικός φακός 40x). Α) Διαύγαση με KOH 20% [32], Β) κατεργασία με χρώση Chlorazol Black E και Γ) κατεργασία με φθορίζουσα χρωστική Calcofluor White [99].

- **Καλλιέργεια και ταυτοποίηση**

Αποτελεί την κύρια εργαστηριακή μέθοδο για τη διάγνωση μυκητικών λοιμώξεων, αφού με αυτή επιτυγχάνεται η απομόνωση του παθογόνου, το οποίο μπορεί ακολούθως να ταυτοποιηθεί και να προσδιοριστεί η *in vitro* ευαισθησία του σε αντιμυκητικούς παράγοντες. Ωστόσο, η καλλιέργεια χαρακτηρίζεται από χαμηλή ευαισθησία καθώς συχνά προκύπτουν ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα, ενώ απαιτούνται 3-4 εβδομάδες για την ολοκλήρωσή της με αποτέλεσμα να καθυστερεί η έναρξη θεραπείας. Στη συνέχεια, ιδιαίτερα στην περίπτωση των δερματοφυτιών, η ταυτοποίηση του αιτιολογικού παράγοντα απαιτεί σημαντική εξειδίκευση και τεχνογνωσία [99].

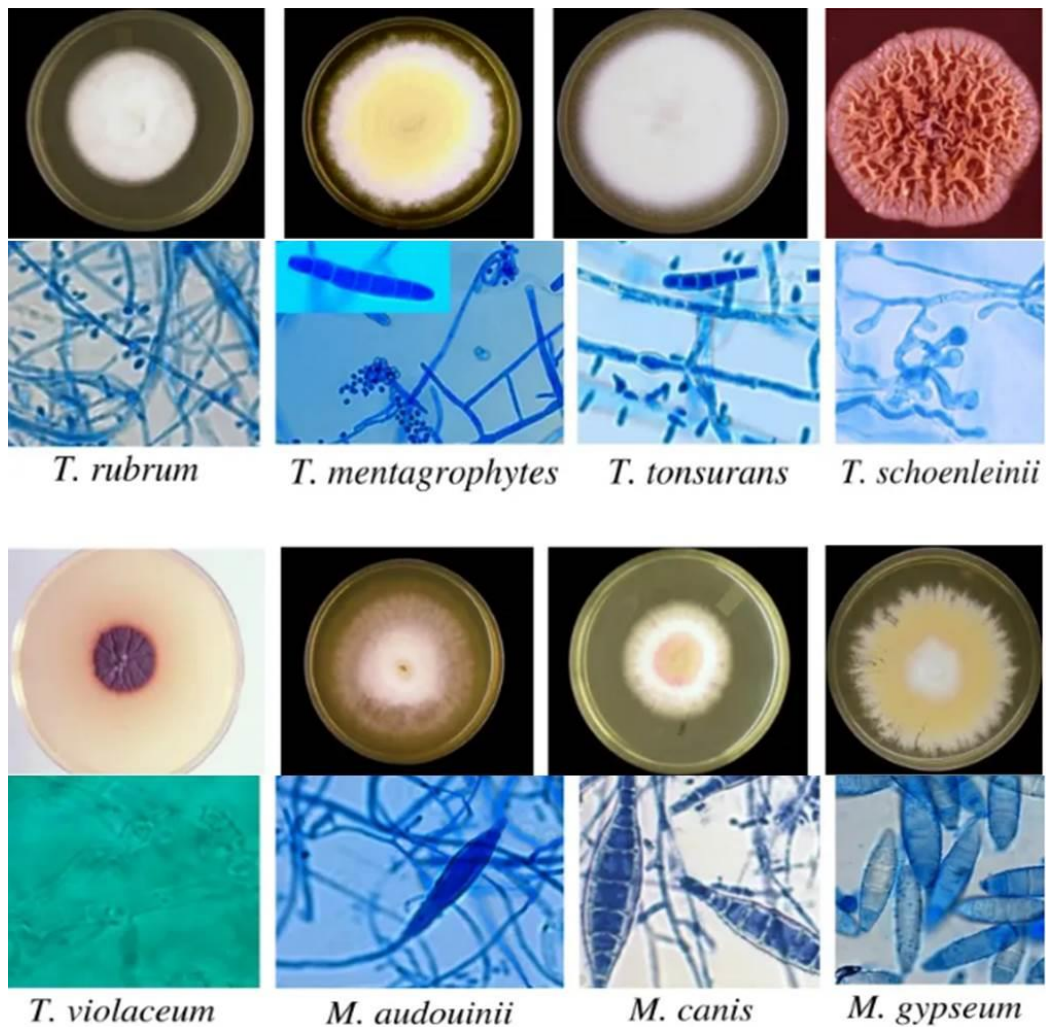
Σε περίπτωση υποψίας δερματοφυτίας, τα κλινικά δείγματα καλλιεργούνται στο ευρέως χρησιμοποιούμενο και εκλεκτικό για την απομόνωση μυκήτων άγαρ Sabouraud με αντιβιοτικά, αλλά και στο άγαρ δερματοφύτων (dermatophyte test medium, DTM). Συγκεκριμένα, το DTM είναι ένα εκλεκτικό θρεπτικό υλικό που διαφοροποιεί τους δερματοφυτικούς από τους σαπροφυτικούς μύκητες, έχει κίτρινο χρώμα και περιέχει άγαρ Sabouraud, αντιβιοτικά και ερυθρό της φαινόλης. Τα δερματόφυτα παράγουν αλκαλικά υποπροϊόντα με αποτέλεσμα την αύξηση του pH και την αλλαγή του χρώματος του υλικού

στο σημείο που αναπτύσσονται σε ερυθρό, σε αντίθεση με τους σαπροφυτικούς μύκητες που παράγουν όξινα υποπροϊόντα με επακόλουθο το pH να παραμένει χαμηλό και να μην παρατηρείται μεταβολή του χρώματος του υλικού στο σημείο ανάπτυξής τους σε αυτό [97].



**Εικόνα 16.** Ανάπτυξη δερματοφυτικών και σαπροφυτικών μυκήτων σε DTM.

Η ταυτοποίηση των δερματοφύτων στηρίζεται στη λεπτομερή παρατήρηση αφενός της μακροσκοπικής μορφολογίας της ώριμης αποικίας τους, δηλαδή της τοπογραφίας, της σύστασης και του χρώματός της, και αφετέρου των μικροσκοπικών χαρακτήρων της (παρουσία ή μη, σχήμα και διάταξη υφών, μακροκονιδίων και μικροκονιδίων) [97]. Ωστόσο, χρήζει μακροχρόνιας εκπαίδευσης και εξειδίκευσης, κάτι που φθίνει στην εποχή του εργαστηριακού αυτοματισμού. Επί του παρόντος, δεν υπάρχουν εμπορικά διαθέσιμες δοκιμασίες για την ταυτοποίηση δερματοφύτων, όπως συμβαίνει στην περίπτωση των ζυμομυκήτων. Η μεθοδολογία της φασματοφωτομετρίας μάζας με μηχανισμό ιοντισμού εκρόφησης με λέιζερ, υποβοηθούμενου από μήτρα, και αναλυτή χρόνου/πτήσης (matrix assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry, MALDI-ToF MS) φαίνεται πολλά υποσχόμενη, αν και έχει μέχρι στιγμής τη δυνατότητα να προσδιορίζει την ταυτότητα μόνο κοινών δερματοφυτικών μυκήτων [100-102]. Τέλος, μπορεί να εφαρμοστεί αλληλούχηση της εσωτερικής μεταγραφόμενης περιοχής (internal transcriber spacer, ITS) ITS1-5.8S-ITS2 του πυρηνικού rDNA του απομονωθέντος στελέχους, όμως οι διαθέσιμες βάσεις δεδομένων περιέχουν πολυάριθμες καταχωρήσεις για δερματοφύτα με εσφαλμένες ταυτοποιήσεις περιπλέκοντας την αξιόπιστη ταυτοποίηση, και ιδιαίτερα μεταξύ του ζωόφιλου *T. mentagrophytes* και του ανθρωπόφιλου *T. interdigitale* [99].



Εικόνα 17. Μακροσκοπική και μικροσκοπική μορφολογία των κυριότερων δερματοφύτων [103]

- **Μη εξαρτώμενες από την καλλιέργεια διαγνωστικές μέθοδοι**

- **PCR**

Το κυριότερο πλεονέκτημα της ενσωμάτωσης μοριακών διαγνωστικών τεχνικών για δερματοφυτίες στην καθ' ημέρα εργαστηριακή πράξη είναι ο εξαιρετικά μειωμένος χρόνος διεκπεραίωσης (λίγες ώρες) συγκριτικά με τον αντίστοιχο της καλλιέργειας (έως και 4 εβδομάδες). Επιπλέον, η PCR παρουσιάζει ~20-30% υψηλότερη ευαισθησία από την καλλιέργεια, γιατί το DNA των βραδέως αναπτυσσόμενων δερματοφύτων μπορεί να ανιχνευθεί ακόμη και παρουσία ταχέως αναπτυσσόμενων μικροοργανισμών που δύναται να επιμολύνουν την καλλιέργεια ή/και αντιμυκητικών παραγόντων (λήψη θεραπείας). Οι ποιοτικές (συμβατικές) PCRs για την ανίχνευση και ταυτοποίηση δερματοφύτων

στοχεύουν κατά κύριο λόγο στα διατηρημένα σημεία της ITS, ενώ ποσοτικές PCRs έχουν επίσης αναπτυχθεί. Μάλιστα, ορισμένες δοκιμασίες PCR πραγματικού χρόνου είναι ήδη εμπορικά διαθέσιμες και είναι παν-δερματοφυτικής φύσης ή/και περιλαμβάνουν ειδικούς εκκινητές για την ανίχνευση περιορισμένου αριθμού παθογόνων [99].

- **Ανοσοχρωματογραφία**

Πρόκειται για μια εύκολη και ταχεία τεχνική που βασίζεται στην ανίχνευση μορίων-στόχων με τη χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων. Πρόσφατα, αναπτύχθηκε και είναι πλέον εμπορικά διαθέσιμη μια δοκιμασία ανοσοχρωματογραφίας για την ανίχνευση ορισμένων δερματοφύτων σε ξέσματα όνυχος. Ειδικότερα, η συγκεκριμένη δοκιμασία χρησιμοποιεί ένα μονοκλωνικό αντίσωμα που αντιδρά ειδικά με έναν πολυσακχαρίτη του κυτταρικού τοιχώματος 7 κοινών δερματοφυτικών μυκήτων, συγκεκριμένα των ανθρωπόφιλων *T. rubrum*, *T. tonsurans*, *T. violaceum* και *E. floccosum*, των ζωόφιλων *T. mentagrophytes* και *M. canis*, και του γεόφιλου *N. gypsea* (πρώην *M. gypseum*) [104-108].

- **Ανοσοπροσροφητική ανάλυση στερεάς φάσεως με σύνδεση ενζύμου (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)**

Επί του παρόντος, έχουν αναπτυχθεί δοκιμασίες ELISA για την ανίχνευση ειδικού για το *M. canis* IgG αντισώματος σε δείγματα ορού ζώων, οι οποίες υπέδειξαν παρόμοια ευαισθησία με αυτή της καλλιέργειας. Ωστόσο, ανάλογες αξιολογήσεις χρησιμοποιώντας ανθρώπινους ορούς δεν έχουν πραγματοποιηθεί ακόμη. Επίσης, δεδομένου ότι η παρουσία αντισωμάτων δύναται να επιμείνει μετά την εκκαθάριση της λοίμωξης, δεν μπορούν να αποκλειστούν ψευδώς θετικά αποτελέσματα [109,110]. Τέλος, το είδος του δείγματος που χρησιμοποιείται στη συγκεκριμένη δοκιμασία (ορός) απαιτεί έναν πιο επεμβατικό τρόπο συλλογής συγκριτικά με άλλες διαγνωστικές προσεγγίσεις.

| Diagnostic Method  | Advantages   | Disadvantages   | Time to Results |
|--------------------|--|---|-----------------|
| Direct examination | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Non-invasive</li> <li>• Low cost</li> </ul>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Unable to determine species</li> </ul>   | Minutes         |
| Wood's lamp        | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Non-invasive</li> <li>• Low cost</li> </ul>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Not all species fluoresce</li> </ul>   | Minutes         |
| Microscopy         | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Can detect unique features of species</li> <li>• Low cost</li> </ul>                      | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Unable to distinguish dead and alive fungi</li> </ul>  | Minutes         |
| Culture            | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Low cost</li> <li>• Easy to perform</li> <li>• Can distinguish between species</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Requires expertise to determine species</li> <li>• Can be contaminated by saprophytes</li> </ul> | Days–Weeks      |
| PCR                | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Highly sensitive</li> <li>• Can distinguish between species</li> </ul>                    | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Unable to distinguish dead and alive fungi</li> </ul>  | Hours–Days      |
| ELISA              | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Highly specific</li> </ul>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>• False positives due to past infections</li> </ul>  | Hours–Days      |
| MALDI-ToF          | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Highly sensitive</li> <li>• Can distinguish between species</li> </ul>                    | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Only detect species in library</li> </ul>  | Minutes–Hours   |
| Genetic analysis   | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Can distinguish between species</li> <li>• Highly sensitive</li> </ul>                    | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Unable to distinguish dead and alive fungi</li> </ul>  | Hours–Days      |

**Εικόνα 18.** Σύγκριση διαγνωστικών μεθόδων για την αντίχνευση δερματοφύτων [14].

## 1.7 Θεραπευτική αντιμετώπιση

Η αντιμυκητική θεραπεία που χορηγείται για την αντιμετώπιση της δερματοφυτίας μπορεί να είναι συστηματική ή/και τοπική και το είδος της εξαρτάται από την ανατομική θέση και την έκταση της λοίμωξης [41,78,111,112].

- **Συστηματική θεραπεία**

- **Τερμπιναφίνη**

Πρόκειται για μία αλλυλαμίνη, η οποία έχει μυκητοκτόνο δράση έναντι των δερματοφύτων [20,47,52]. Συγκεκριμένα, αναστέλλει το ένζυμο εποξειδάση του σκουαλενίου, εμποδίζοντας έτσι τη λειτουργικότητα της κυτταρικής τους μεμβράνης [113]. Οι ανεπιθύμητες ενέργειες που έχουν παρατηρηθεί λόγω της λήψης της είναι

κεφαλαλγία, ναυτία, δυσπεψία, διάρροια, ερύθημα και κνησμός. Τέλος, αναστέλλει το ισοένζυμο CYP2D6 και αλληλεπιδρά με περιορισμένο αριθμό φαρμάκων [112,113].

- **Ιτρακοναζόλη**

Είναι μια τριαζόλη με μυκητοκτόνο δράση έναντι των δερματοφύτων [35,41,113]. Ειδικότερα, αναστέλλει το ένζυμο 14α-δεμεθυλάση της λανοστερόλης, αποτρέποντας τη σύνθεση της εργοστερόλης της κυτταρικής τους μεμβράνης, διαταράσσοντας έτσι τη βιοσύνθεσή της [41,112,113]. Οι συχνότερες ανεπιθύμητες ενέργειες που έχουν παρατηρηθεί λόγω της χρήσης της είναι ζάλη, κόπωση, κεφαλαλγία, κοιλιακό άλγος, διάρροια, δυσπεψία, δερματικό εξάνθημα και υποκαλαιμία, ενώ μπορεί να επηρεαστούν και τα επίπεδα των ηπατικών ενζύμων [35,112,113]. Τέλος, έχουν παρατηρηθεί σημαντικές αλληλεπιδράσεις της με άλλα φάρμακα, καθώς η ιτρακοναζόλη είναι ισχυρός αναστολέας του ισοενζύμου CYP3A4 [35,113].

- **Φλουκοναζόλη**

Πρόκειται για μία τριαζόλη, η οποία έχει μυκητοκτόνο δράση έναντι των δερματοφύτων [41,113]. Ο μηχανισμός δράσης της είναι ίδιος με αυτόν της ιτρακοναζόλης. Οι συχνότερες ανεπιθύμητες ενέργειες που σχετίζονται με τη χορήγησή της είναι κεφαλαλγία, ναυτία, κοιλιακό άλγος, δερματικό εξανθήματα και αύξηση των τρανσαμινασών [112,113]. Τέλος, αποτελεί ισχυρό αναστολέα του ισοενζύμου CYP2C9 και μέτριο αναστολέας του ισοενζύμου CYP3A4, επομένως πρέπει να δίνεται μεγάλη προσοχή όταν συγχωρηγείται με άλλα φάρμακα, ειδικά με υπογλυκαιμικούς παράγοντες και βαρφαρίνη [113].

- **Γκρισεοφουλβίνη**

Έχει μυκητοκτόνο δράση έναντι των δερματοφύτων. Συγκεκριμένα, αναστέλλει τη μίτωση και τη σύνθεση των νουκλεϊκών οξέων τους [35,41]. Έχουν παρατηρηθεί αρκετές παρενέργειες λόγω της λήψης της και απαιτείται μεγαλύτερης διάρκειας θεραπεία από ότι με τα υπόλοιπα αντιμυκητικά [41,114].



|                       | Fluconazole   | Griseofulvin  | Itraconazole  | Terbinafine   |
|-----------------------|---|---|---|---|
| Tinea Capitis         | 6 mg/kg/day ×<br>3–6 weeks                                | 10–15 mg/kg/day<br>(ultramicrosize)<br>20–25 mg/kg/day<br>(microsize suspension)<br>× 6–8 weeks | 5 mg/kg/day ×<br>4–8 weeks  | Adults:250 mg/day ×<br>3–4 weeks.<br>Children:Granules:<br>125 mg (<25 kg),<br>187.5 mg (25–35 kg) or<br>250 mg (>35 kg) ×<br>3–4 weeks |
| Tinea Corporis/Cruris | 2–4 weeks   | 2–4 weeks   | 1 week  | 1 week  |
| Tinea Unguium         | 3–4 months for<br>fingernails.<br>5–7 months for toenails | 1–2 g/day (microsize) or<br>750 mg/day<br>(ultramicrosize) until<br>nails are normal            | 200 mg/day × 12 weeks<br>or 200 mg twice a day<br>(BID) × 1 week/month<br>for 2–4 consecutive<br>months | 12 weeks<br>6 weeks   |
| Tinea pedis           | 4–6 weeks   | 4 weeks   | 1 week  | 2 weeks   |

**Εικόνα 19.** Ενδεδειγμένη δοσολογία και διάρκεια της συστηματικής αντιμυκητικής θεραπείας για την αντιμετώπιση δερματοφυτίας [115].

## • Τοπική θεραπεία

Φαίνεται να είναι περισσότερο αποτελεσματική σε ορισμένες δερματοφυτικές λοιμώξεις. Συγκεκριμένα, στις περισσότερες περιπτώσεις δερματοφυτίας του δέρματος, δηλαδή tinea corporis, tinea cruris και tinea pedis, χορηγείται τοπική αντιμυκητική θεραπεία [78,111]. Αντίθετα, στις tinea capitis και tinea unguium, η θεραπεία αποκλειστικά με τη χρήση τοπικών αντιμυκητικών σκευασμάτων είναι σπανίως αποτελεσματική [111].

### ▪ Τερμπιναφίνη

Η κρέμα τερμπιναφίνης 1% αποτελεί το πρώτης εκλογής τοπικό αντιμυκητικό [78,111].

### ▪ Κυκλοπιροξολαμίνη

Πρόκειται για μια υδροξυπυριδόνη, η οποία χηλικοποιεί τριθενή κατιόντα και έτσι αναστέλλει τα εξαρτώμενα από μέταλλα ένζυμα [112,113]. Διατίθεται με τη μορφή διαλύματος 8% και κρέμας [78,112].

### ▪ Αμορολφίνη

Είναι μία ουσία που αναστέλλει τα ένζυμα Δ14 αναγωγή και Δ7-Δ8 ισομεράση των μυκήτων, παρεμβαίνοντας έτσι στις οδούς σύνθεσης της μυκητικής στερόλης [116]. Διατίθεται με τη μορφή διαλύματος 5% και κρέμας [78].

| Azole                      | Preparations    | Site                             | Frequency of Application | Duration of Use                             |
|----------------------------|-----------------|----------------------------------|--------------------------|---|
| Imidazoles (%)             |                 |                                  |                          |   |
| Clotrimazole (1)           | Cream, lotion   | T. corporis/cruris/pedis/capitis | BD                       | 4-6 weeks                                   |
| Econazole (1)              | Cream           | T. corporis/cruris/pedis/capitis | OD-BD                    | 4-6 weeks                                   |
| Miconazole (1)             | Cream, lotion   | T. corporis/cruris/pedis/capitis | BD                       | 4-6 weeks                                   |
| Oxiconazole (2)            | Cream, lotion   | T. corporis/cruris/pedis/capitis | OD-BD                    | 4 weeks                                     |
| Sertaconazole (2)          | Cream           | T. corporis/cruris/pedis/capitis | BD                       | 4 weeks                                     |
| Luliconazole (1)           | Cream, lotion   | T. corporis/cruris/pedis/capitis | OD                       | 2 weeks                                     |
| Eberconazole (1)           | Cream           | T. corporis/cruris/pedis/capitis | OD                       | 2-4 weeks                                   |
| Triazoles (%)              |                 |                                  |                          |   |
| Efinaconazole (10)         | Solution        | T. pedis                         | OD                       | Up to 52 weeks in co-existing tinea unguium |
| Allylamines                |                 |                                  |                          |   |
| Terbinafine                | Cream, powder   | T. corporis/capitis              | BD                       | 2 weeks                                     |
|                            |                 | T. cruris                        | BD                       | 2 weeks                                     |
|                            |                 | T. pedis                         | BD                       | 4 weeks                                     |
|                            |                 | T. manum                         | BD                       | 4 weeks                                     |
| Naftifine 1%               | Cream           | T. corporis/cruris/pedis/capitis | OD-BD                    | Use 2 weeks beyond resolution of symptoms   |
| Butenafine 1%              | Cream           | T. corporis/cruris/pedis         | OD-BD                    | 2-4 weeks                                   |
| Others                     |                 |                                  |                          |   |
| Amolorfine 0.25%           | Cream           | T. corporis                      | BD                       | 4 weeks                                     |
| Amphotericin B (1 mg) 0.1% | Lipid-based gel | T. corporis                      | BD                       | 2 weeks                                     |
| Ciclopiroxolamine 1%       | Cream, lotion   | T.corporis/cruris/pedis          | BD                       | 2-4 weeks                                   |

**Εικόνα 20.** Φαρμακοτεχνική μορφή, δοσολογία και διάρκεια της τοπικής αντιμυκητικής θεραπείας για την αντιμετώπιση δερματοφυτίας [115].

Αξίζει να σημειωθεί πως στις περιπτώσεις tinea unguium μπορεί να εφαρμοστεί και η θεραπεία με λέιζερ. Ωστόσο, το ποσοστό θεραπευτικής επιτυχίας της είναι αρκετά πιο χαμηλό από αυτό των συστηματικών και τοπικών θεραπειών, ενώ ταυτόχρονα παρουσιάζει υψηλότερο κόστος, με αποτέλεσμα να μην αποτελεί θεραπεία πρώτης επιλογής για τη λοίμωξη [78].

Τέλος, δεν πρέπει να ξεχνάει κανείς πως η θεραπευτική αντιμετώπιση της δερματοφυτίας γίνεται όλο και πιο δύσκολη στις μέρες μας εξαιτίας των μεταβαλλόμενων επιδημιολογικών παραγόντων και της εμφάνισης ανθεκτικών στα αντιμυκητικά παθογόνων. Η συμμόρφωση του ασθενούς στην ενδεδειγμένη δοσολογία και διάρκεια της θεραπείας συμβάλλει σε καθοριστικό βαθμό στην επίτευξη επιτυχούς θεραπευτικού αποτελέσματος. Βέβαια, εκτός από τη λήψη αντιμυκητικής θεραπείας, τα γενικά μέτρα και οι αλλαγές στον καθημερινό τρόπο ζωής παίζουν και αυτά σημαίνοντα ρόλο στην πρόληψη των υποτροπών [115].



## Ειδικό μέρος

### Σκοπός

Πρόσφατα, έχει παρατηρηθεί αξιοσημείωτη αύξηση της επίπτωσης των δερματοφυτιών, προσβάλλοντας το ~20-25% του πληθυσμού παγκοσμίως και επιφέροντας σημαντική οικονομική επιβάρυνση στα συστήματα υγειονομικής περίθαλψης. Η άμεση μικροσκοπηση και η καλλιέργεια αποτελούν το χρυσό πρότυπο στη διάγνωση δερματοφυτικών λοιμώξεων, ωστόσο χαρακτηρίζονται από μειωμένη ειδικότητα και χαμηλή ευαισθησία σε συνδυασμό με αυξημένο χρόνο λήψης αποτελεσμάτων (έως 4 εβδομάδες), αντίστοιχα, καθυστερώντας την έγκαιρη έναρξη της ενδεδειγμένης αντιμυκητικής θεραπείας. Ως εκ τούτου, η ενσωμάτωση μη καλλιεργητικών μεθόδων στη διαγνωστική διαδικασία αποτελεί ελκυστική εναλλακτική προσέγγιση. Σκοπό, λοιπόν, της μελέτης αποτέλεσε η αξιολόγηση δύο εμπορικά διαθέσιμων δοκιμασιών, μιας μοριακής και μιας ανοσοχρωματογραφικής, στην έγκυρη ανίχνευση δερματοφύτων σε ξέσματα όνυχος από ασθενείς με κλινική υποψία ονυχομυκητίασης. Τα ευρήματα θα συνδράμουν στην απάντηση του αν η αξιοποίηση νέων επικουρικών εργαλείων που παρέχουν γρήγορα αποτελέσματα δύναται να βοηθήσει στη βελτίωση της διάγνωσης των δερματοφυτιών.

## **2. Υλικά και μέθοδοι**

### **2.1 Κλινικά δείγματα**

Στα πλαίσια της παρούσας πτυχιακής εργασίας μελετήθηκαν ξέσματα όνυχος από 84 άτομα με κλινική υποψία ονυχομυκητίασης (ιστορικό ασθενούς και χαρακτηριστική μορφολογία αλλοίωσης), οι οποίοι προσήλθαν στα εξωτερικά ιατρεία της Β' Κλινικής Δερματικών και Αφροδισίων Νόσων του Πανεπιστημιακού γενικού νοσοκομείου «Αττικόν». Τα δείγματα είχαν αποσταλεί στο Εργαστήριο Κλινικής Μικροβιολογίας του νοσοκομείου για άμεση μικροσκόπηση και καλλιέργεια για μύκητες προκειμένου να τεκμηριωθεί η διάγνωση.

### **2.2 Άμεση μικροσκόπηση**

Η μικροσκοπική εξέταση νωπών παρασκευασμάτων πραγματοποιήθηκε με μικροσκόπιο φθορισμού (Nikon Eclipse E600) και τα ξέσματα όνυχος κατεργάστηκαν με διάλυμα χρωστικής Blankophor P (Sigma-Aldrich, Αθήνα, Ελλάδα) σε ΚΟΗ 20% (Apllichem, Αθήνα, Ελλάδα). Συγκεκριμένα, σε αντικειμενοφόρο πλάκα τοποθετήθηκαν 2-3 σταγόνες διαλύματος χρωστικής και προστέθηκε το υπό εξέταση δείγμα, το οποίο απλώθηκε σε λεπτή στιβάδα και καλύφθηκε τελικά με καλυπτρίδα. Το παρασκεύασμα αφέθηκε σε θερμοκρασία περιβάλλοντος μέχρι να διαυγαστεί και να σχηματιστεί μια λεπτή στιβάδα επιθηλιακών κυττάρων. Στη συνέχεια, μικροσκοπήθηκε προς αναζήτηση μυκητικών στοιχείων, τα οποία διακρίνονταν λόγω της απεικόνισής τους με έντονο κυανοπράσινο χρώμα.

### **2.3 Καλλιέργεια**

Τα προς εξέταση δείγματα ενοφθαλμίστηκαν σε τρυβλία άγαρ δεξτρόζης Sabouraud εμπλουτισμένο με χλωραμφενικόλη και γενταμυκίνη (Oxoid, Αθήνα, Ελλάδα) και DTM (bioMérieux, Αθήνα, Ελλάδα). Η διαδικασία αυτή έλαβε χώρα σε θάλαμο νηματικής ροής υπό άσηπτες συνθήκες και ακολούθως τα τρυβλία επωάστηκαν στους 30°C για έως και 4 εβδομάδες. Στο διάστημα αυτό, η ανάγνωση των καλλιεργειών γινόταν 2 φορές εβδομαδιαίως προκειμένου να διαπιστωθεί η ανάπτυξη εν δυνάμει παθογόνου μύκητα και

τυχόν επιμολύνσεων από βακτήρια ή/και σαπροφυτικούς μύκητες. Σε περίπτωση απουσίας ανάπτυξης αποικιών, η καλλιέργεια απορριπτόταν ως αρνητική μετά το πέρας 3 εβδομάδων εφόσον η άμεση μικροσκόπηση του δείγματος ήταν αρνητική, ενώ διατηρούνταν στον κλίβανο επώασης για ακόμη μια εβδομάδα όταν υπήρχαν σαφείς ενδείξεις παρουσίας μύκητα από τα άμεσα μικροσκοπικά παρασκευάσματα.

Η απομόνωση ενός δερματοφύτου υποδηλώνει ότι αποτελεί τον αιτιολογικό παράγοντα της λοίμωξης και θέτει αναμφισβήτητα τη διάγνωση. Η ταυτοποίηση των απομονωθέντων ζυμομυκήτων έλαβε χώρα με τη μέθοδο MALDI-ToF MS, χρησιμοποιώντας το σύστημα MALDI Biotyper<sup>®</sup> (Bruker Daltonics, Βρέμη, Γερμανία). Από την άλλη πλευρά, ο προσδιορισμός του γένους και του είδους των απομονωθέντων νηματοειδών μυκήτων πραγματοποιήθηκε με συμβατικές φαινοτυπικές μεθόδους σύμφωνα με τα μακροσκοπικά και τα μικροσκοπικά χαρακτηριστικά των αποικιών τους. Σε περιπτώσεις που απαιτούνταν η διαφοροποίηση κάποιων δερματοφύτων, χρησιμοποιήθηκε και η δοκιμασία υδρόλυσης της ουρίας, η οποία συμβάλει στη διάκριση ειδών που παρουσιάζουν ομοιότητες [97].

## 2.4 Μοριακή ανίχνευση δερματοφύτων

Η ποιοτική ανίχνευση δερματοφύτων με PCR αξιολογήθηκε με τη χρήση της εμπορικά διαθέσιμης δοκιμασίας Dermatophyte PCR Kit (Statens Serum Institut, Κοπεγχάγη, Δανία).

### • Αρχή της μεθόδου

Πρόκειται για μια συμβατική, διπλή PCR, η οποία συνδυάζει μια παν-δερματοφυτική PCR με μια ειδική για το ανθρωπόφιλο *T. rubrum* PCR. Ειδικότερα, περιλαμβάνει δύο ζεύγη εκκινητών, οι οποίοι στοχεύουν αφενός στις περιοχές των γονιδίων που κωδικοποιούν τη συνθετάση I της χιτίνης (chitin synthase I, CSH1) του κυτταρικού τοιχώματος για την ανίχνευση των δερματοφύτων γενικά (μέγεθος PCR προϊόντος 366 bp), και αφετέρου στην ITS2 που κωδικοποιεί την ειδική για το *T. rubrum* αλληλουχία (μέγεθος PCR προϊόντος 203 bp). Επιπλέον, στο μίγμα των εκκινητών έχει προστεθεί ένας εσωτερικός μάρτυρας ελέγχου (internal control, IC), που λειτουργεί ως υπόστρωμα για τους ειδικούς για το *T. rubrum* εκκινητές (μέγεθος PCR προϊόντος 700 bp), προκειμένου

να εξακριβωθεί ότι δεν υπάρχουν ανασταλτικές ουσίες στα υπό έλεγχο δείγματα, η παρουσία των οποίων θα μπορούσε να οδηγήσει σε ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα. Τέλος, η δοκιμασία παρέχει ένα διάλυμα γενωμικό δερματοφυτικό DNA και ένα διάλυμα γενωμικό *T. rubrum* DNA, τα οποία λειτουργούν ως θετικοί μάρτυρες ελέγχου [117].

- **Εφαρμογή της μεθόδου και ερμηνεία των αποτελεσμάτων**

Η δοκιμασία εκτελέστηκε σύμφωνα με τις συστάσεις του κατασκευαστή. Ειδικότερα, ξέσματα όνυχος τοποθετήθηκαν σε πλαστικό φιαλίδιο, προστέθηκαν 100  $\mu\text{L}$  ρυθμιστικού διαλύματος λύσης (buffer A) και ακολούθησε επώαση στους 95°C για 10 min. Αμέσως μετά, προστέθηκαν 100  $\mu\text{L}$  ρυθμιστικού διαλύματος εξουδετέρωσης (buffer B) και πραγματοποιήθηκε παλμική ανάδευση σε αναδευτήρα τύπου vortex. Ακολούθησε η παρασκευή του κοινού διαλύματος (master mix) της PCR, με την αντίδραση για κάθε δείγμα να πραγματοποιείται σε τελικό όγκο 20  $\mu\text{L}$  [117].

**Πίνακας 1.** Συστατικά της αντίδρασης PCR και απαιτούμενοι όγκοι τους για τη διεξαγωγή της δοκιμασίας Dermatophyte PCR Kit [117].

| Συστατικό            | Κλινικό δείγμα   | Θετικός μάρτυρας ελέγχου ( <i>T. rubrum</i> ) | Θετικός μάρτυρας ελέγχου (δερματόφυτο) | Αρνητικός μάρτυρας ελέγχου |
|----------------------|------------------|---|--|----------------------------|
| Μείγμα PCR           | 10 $\mu\text{L}$ | 10 $\mu\text{L}$                              | 10 $\mu\text{L}$                       | 10 $\mu\text{L}$           |
| Μείγμα εκκινητών     | 8 $\mu\text{L}$  | 8 $\mu\text{L}$                               | 8 $\mu\text{L}$                        | 8 $\mu\text{L}$            |
| DNA όνυχα            | 2 $\mu\text{L}$  | -   | -                                      | -                          |
| <i>T. rubrum</i> DNA | -                | 2 $\mu\text{L}$                               | -                                      | -                          |
| Δερματοφυτικό DNA    | -                | -   | 2 $\mu\text{L}$                        | -                          |
| Μείγμα buffers (1:1) | -                | -   | -                                      | 2 $\mu\text{L}$            |

Στη συνέχεια, η PCR πραγματοποιήθηκε σε θερμικό κυκλοποιητή (GeneAmp PCR System 9700, Applied Biosystems) στις παρακάτω συνθήκες:

- Αρχική αποδιάταξη: 94°C για 5 min
- Αποδιάταξη: 94°C για 30 sec
- Υβριδοποίηση: 60°C για 30 sec
- Επιμήκυνση: 72°C για 30 sec
- Τελική επιμήκυνση: 72°C για 3 min

45 κύκλοι ενίσχυσης

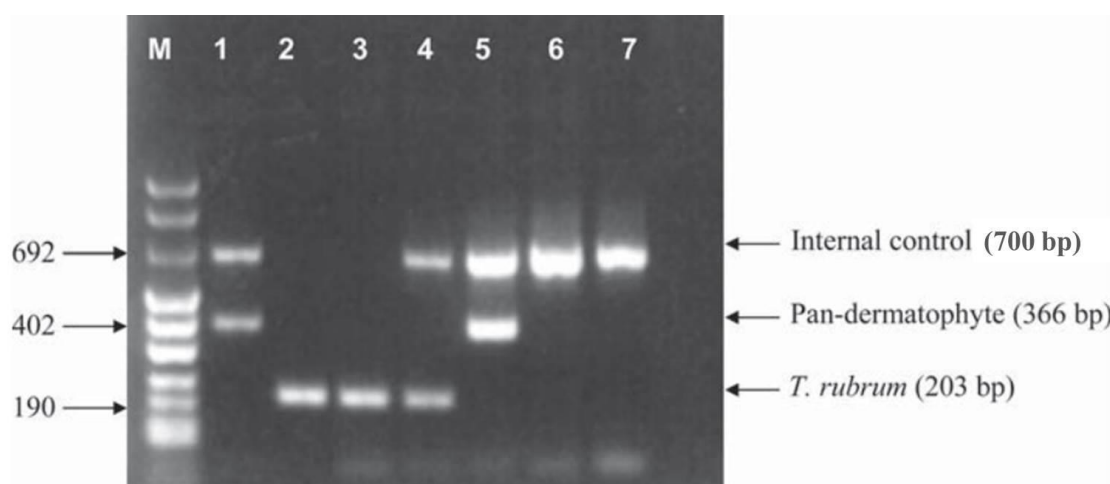
Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR (18  $\mu$ L/βοθρίο) σε πηκτή αγαρόζης (Nirron, Αθήνα, Ελλάδα) 2% w/v, η οποία περιείχε βρωμιούχο αιθίδιο (Invitrogen, Αθήνα, Ελλάδα) σε τελική συγκέντρωση 0,5  $\mu$ g/mL, παράλληλα με ένα μείγμα γραμμικών μορίων DNA γνωστού μοριακού βάρους (100 bp DNA Ladder, Cleaver Scientific, Ρώμη, Ιταλία). Ως ηλεκτροφορητικό διάλυμα χρησιμοποιήθηκε διάλυμα Tris-φωσφορικό οξύ-EDTA (Invitrogen, Αθήνα, Ελλάδα) και η οπτικοποίηση των PCR προϊόντων πραγματοποιήθηκε με έκθεση της πηκτής σε υπεριώδη ακτινοβολία [117].



**Εικόνα 21.** Σχηματική αναπαράσταση της ροής εργασίας για την ηλεκτροφόρηση των PCR προϊόντων σε πηκτή αγαρόζης 2%.

Αναφορικά με την ερμηνεία των αποτελεσμάτων, στην περίπτωση κάθε αρνητικού δείγματος πρέπει να εμφανίζεται μια ζώνη στα 700 bp (IC). Τα θετικά για οποιοδήποτε δερματόφυτο δείγματα αναμένεται να εμφανίζουν επιπλέον μια ζώνη στα 366 bp. Από την

άλλη πλευρά, τα θετικά για *T. rubrum* δείγματα αναμένεται να εμφανίζουν επιπλέον μια έντονη ζώνη στα 203 bp και μια πιο ασθενή ή καμία στα 366 bp λόγω του σχετικά μεγαλύτερου αριθμού αντιγράφων της ITS2 συγκριτικά με της CHS1. Τέλος, η απουσία ζώνης IC δεν αναιρεί τυχόν θετικά αποτελέσματα για το ανιχνευμένο και στοχευμένο *T. rubrum* [117].



**Εικόνα 22.** Ηλεκτροφορητικός έλεγχος PCR προϊόντων σε πηκτή αγαρόζης 2% για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων της δοκιμασίας DermatoPhyte PCR Kit. M: δείκτης μοριακών βαρών, 1: γενωμικό δερματοφυτικό DNA, 2: γενωμικό *T. rubrum* DNA, 3 και 4: δείγματα θετικά για *T. rubrum*, 5: δείγμα θετικό για δερματόφυτο, 6 και 7: δείγματα αρνητικά για δερματόφυτο [118].

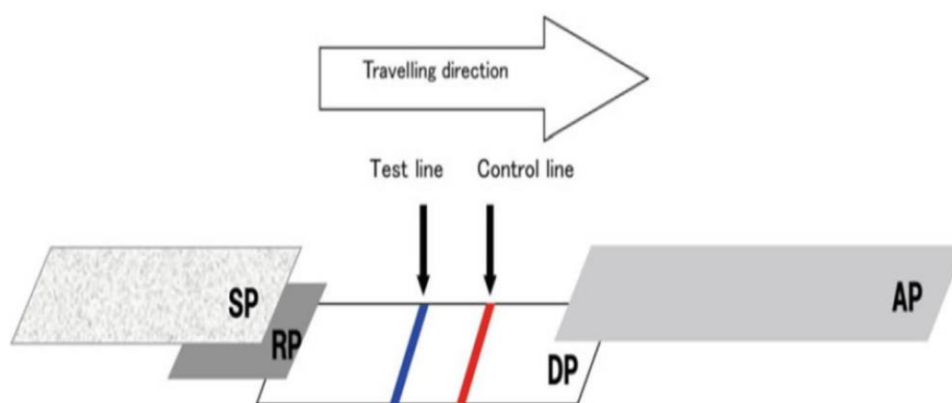
## 2.5 Ανοσοχρωματογραφική ανίχνευση δερματοφύτων

Η δυνατότητα ανίχνευσης δερματοφύτων με ανοσοχρωματογραφία αξιολογήθηκε (όπου αυτό ήταν δυνατό, δηλαδή σε περιπτώσεις επάρκειας κλινικού δείγματος για τη διενέργεια του ελέγχου) με τη χρήση της εμπορικά διαθέσιμης δοκιμασίας Diafactory *trinea unguium* (DTU; JNC Corp., Τόκιο, Ιαπωνία).

- **Αρχή της μεθόδου**

Πρόκειται για μια ταχεία δοκιμασία ανοσοχρωματογραφίας πλευρικής ροής για την ποιοτική ανίχνευση αντιγόνων των δερματοφύτων σε ξέσματα όνυχου, η οποία πραγματοποιείται με τη χρήση ενός ειδικού έναντι των αντιγόνων αυτών αντισώματος που βρίσκεται ακινητοποιημένο σε μια μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Συγκεκριμένα, η

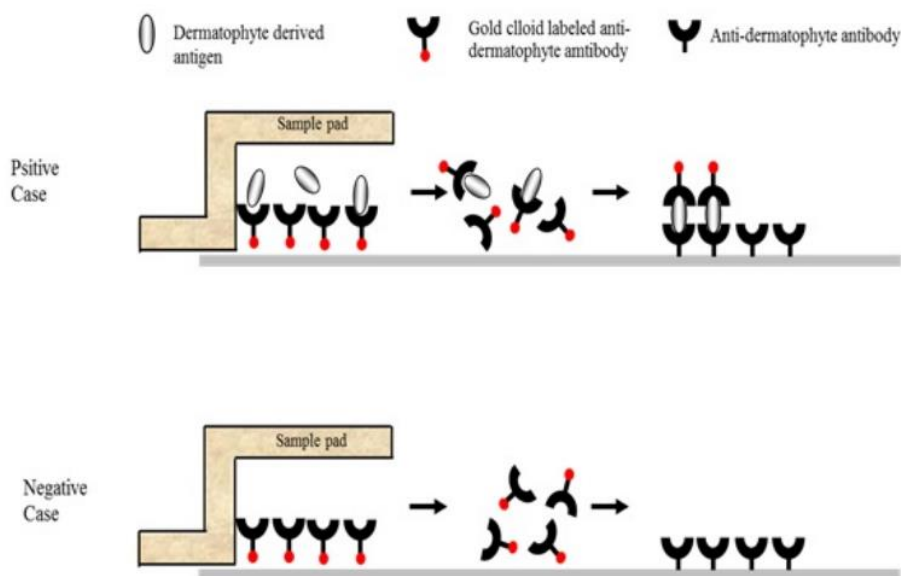
ανοσοχρωματογραφική ταινία αποτελείται από την περιοχή όπου προσροφάται το δείγμα, την περιοχή που περιέχει το κύριο συστατικό της δοκιμασίας (μονοκλωνικό, επισημασμένο με κολλοειδή χρυσό, αντίσωμα έναντι των αντιγόνων των δερματοφύτων), την περιοχή ανίχνευσης (μεμβράνη νιτροκυτταρίνης με ακινητοποιημένο μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι των αντιγόνων των δερματοφύτων στη ζώνη εξέτασης [test line zone, TLZ] και ακινητοποιημένη ηωσίνη Β στη ζώνη ελέγχου [control line zone, CLZ]) και την περιοχή που απορροφάται εν τέλει η περίσσεια υγρού [119].



**Εικόνα 23.** Σχηματική αναπαράσταση της ανοσοχρωματογραφικής ταινίας που χρησιμοποιείται στη δοκιμασία DTU. SP: περιοχή προσρόφησης του δείγματος, RP: περιοχή που περιέχει το κύριο συστατικό της δοκιμασίας, DP: περιοχή ανίχνευσης, AP: περιοχή απορρόφησης της περίσσειας υγρού [105].

Η δοκιμασία περιλαμβάνει τη μεταφορά του συλλεχθέντος δείγματος σε φιαλίδιο που περιέχει ρυθμιστικό διάλυμα εκχύλισης (χημική απομόνωση του αντιγόνου) και τοποθέτηση της ανοσοχρωματογραφικής ταινίας στο μείγμα προκειμένου να διαποτιστεί. Εάν το δείγμα περιέχει δερματοφύτο, το απομονωθέν αντιγόνο θα αλληλεπιδράσει με το ειδικό προς αυτό, επισημασμένο με κολλοειδή χρυσό, αντίσωμα. Το σύμπλοκο που θα σχηματιστεί, θα μετακινηθεί μέσω τριχοειδών δυνάμεων διαμέσου της μεμβράνης της ταινίας, θα προσδεθεί σε ακινητοποιημένο αντίσωμα έναντι των αντιγόνων των δερματοφύτων και θα δημιουργηθεί μια έγχρωμη γραμμή στη TLZ. Το υπόλοιπο δείγμα καθώς και τα δεσμευμένα ή μη σύμπλοκα θα συνεχίσουν τη μετακίνησή τους προς τη CLZ, όπου θα αντιδράσουν με την ακινητοποιημένη χρωστική σχηματίζοντας μια έγχρωμη γραμμή εκεί. Εμφάνιση δύο έγχρωμων γραμμών, μιας στη CLZ και μιας στη

TLZ, υποδεικνύει θετικό αποτέλεσμα, ενώ εμφάνιση μόνο μιας γραμμής στη CLZ υποδεικνύει αρνητικό αποτέλεσμα [119].



**Εικόνα 24.** Αρχή μεθόδου της ανίχνευσης δερματοφυτών με την ανοσοχρωματογραφική δοκιμασία DTU [119].

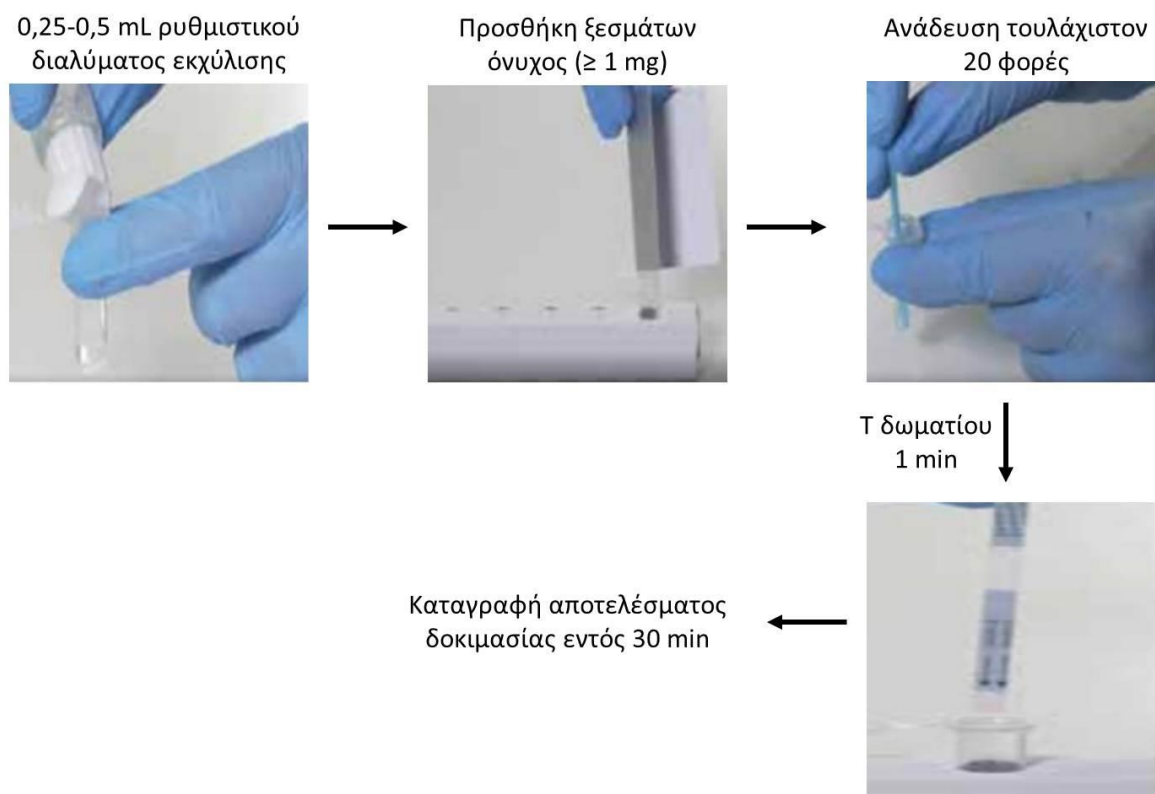
Η δοκιμασία έχει επικυρωθεί για την ανίχνευση αντιγόνων 7 κοινών δερματοφυτικών μυκήτων, συγκεκριμένα των ανθρωπόφιλων *T. rubrum*, *T. tonsurans*, *T. violaceum* και *E. floccosum*, των ζωόφιλων *T. mentagrophytes* και *M. canis*, και του γεώφιλου *N. gypsea* (πρώην *M. gypseum*). Επιπλέον, η απόδοση της δεν έχει φανεί να επηρεάζεται από την παρουσία κοινώς χρησιμοποιούμενων για τη θεραπεία δερματοφυτιών αντιμυκητικών παραγόντων (τερμπιναφίνης, ιτρακοναζόλης και γκρισεοφουλβίνης). Ωστόσο, έχει καταγραφεί διασταυρούμενη αντιδραστικότητα με άλλους μύκητες, και συγκεκριμένα τους *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. niger*, *A. terreus*, *A. fischeri*, *P. lilacinus*, *P. griseofulvum*, *V. botryosa*, *F. solani*, *E. dermatitidis*, *E. spinifera*, *H. werneckii*, *M. circinata* και *M. flavorosea* [119].

- **Εφαρμογή της μεθόδου και ερμηνεία των αποτελεσμάτων**

Η δοκιμασία έλαβε χώρα ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή. Ειδικότερα, ξέσματα όνυχος (ελάχιστο βάρος 1 mg) τοποθετήθηκαν σε πλαστικό φιαλίδιο που περιείχε 0,25-0,5 mL ρυθμιστικού διαλύματος εκχύλισης. Κατόπιν ανάδευσής τους με ράβδο



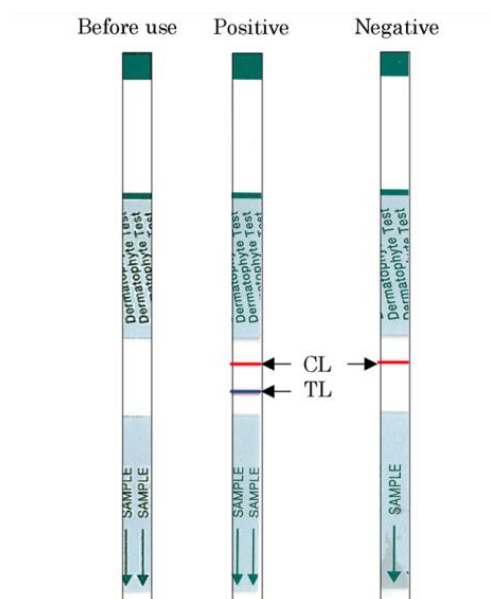
ανάδευσης τουλάχιστον 20 φορές, το μείγμα αφέθηκε σε θερμοκρασία δωματίου για τουλάχιστον 1 min. Ακολούθησε η τοποθέτηση της ανοσοχρωματογραφικής ταινίας στο φιαλίδιο, κρατώντας την από τη επισημασμένη με σκούρο πράσινο χρώμα περιοχή. Τέλος, αυστηρά εντός 30 min, καταγράφηκε το αποτέλεσμα της δοκιμασίας (αρνητικό, θετικό ή άκυρο) [119].



**Εικόνα 25.** Σχηματική αναπαράσταση της ροής εργασίας της ανοσοχρωματογραφικής δοκιμασίας DTU.

Η ερμηνεία του αποτελέσματος της δοκιμασίας για το εκάστοτε δείγμα βασίστηκε στην παρουσία ή μη έγχρωμων γραμμών κατά μήκος της ανοσοχρωματογραφικής ταινίας κατόπιν της οπτικής παρατήρησής της. Συγκεκριμένα, η δοκιμασία είναι θετική για αντιγόνο δερματόφυτου εφόσον εμφανίζονται δύο έγχρωμες γραμμές, μια χρώματος ροζ στη CLZ και μια χρώματος μωβ στη TLZ. Από την άλλη πλευρά, η δοκιμασία θεωρείται αρνητική στην περίπτωση που εμφανίζεται ροζ γραμμή στη CLZ και δεν εμφανίζεται μωβ γραμμή στη TLZ. Η εμφάνιση μωβ ζώνης στη TLZ μετά το πέρας των 30 min αντιστοιχεί σε αρνητικό αποτέλεσμα. Τέλος, η δοκιμασία θεωρείται άκυρη εφόσον μέσα στο διάστημα

των 30 min δεν εμφανιστεί ροζ γραμμή στη CLZ, ακόμα και αν μια μωβ γραμμή έχει εμφανιστεί στη TLZ [119].



**Εικόνα 26.** Ερμηνεία των αποτελεσμάτων της ανοσοχρωματογραφικής δοκιμασίας DTU. CL: ζώνη ελέγχου, TL: ζώνη εξέτασης [108].

## 2.6 Ανάλυση

Ο ορισμός της μεθόδου αναφοράς είναι δύσκολος, καθώς η άμεση μικροσκοπική εξέταση δεν παρέχει ταυτοποίηση σε επίπεδο γένους ή είδους. Από την άλλη πλευρά, είναι γνωστό ότι σε περιστατικά ονυχομυκητίασης το 40% των θετικών στη μικροσκοπία περιπτώσεων ήταν αρνητικές με καλλιέργεια [120]. Έτσι, οι παράμετροι που περιγράφονται στη συνέχεια υπολογίστηκαν λαμβάνοντας υπόψη ως χρυσό κανόνα για ένα αληθώς θετικό για δερματόφυτο δείγμα είτε τη θετική (υφές ή/και αρθροκονίδια) άμεση μικροσκόπηση ή/και τη θετική για δερματόφυτο καλλιέργεια.

Αρχικά, εκτιμήθηκε η κατηγορική συμφωνία μεταξύ της εκάστοτε υπό μελέτη μη εξαρτώμενης από την καλλιέργεια δοκιμασίας (PCR και DTU) και της μεθόδου αναφοράς (όπως ορίστηκε παραπάνω). Ο ακριβής έλεγχος του Fisher (Fisher's exact test) χρησιμοποιήθηκε προκειμένου να αξιολογηθεί εάν υπήρχε σημαντική συσχέτιση μεταξύ των αποτελεσμάτων τους, ενώ η ισχύς της συμφωνίας τους εκτιμήθηκε με τον υπολογισμό

του συντελεστή κάπα του Cohen ( $\kappa$ ). Τα σφάλματα ορίστηκαν ως σημαντικά (major error, MaEs), υποδεικνύοντας ένα ψευδώς θετικό αποτέλεσμα (θετικό με τη PCR/DTU και αρνητικό με τη μέθοδο αναφοράς), και πολύ σημαντικά (very major errors, VmEs), υποδεικνύοντας ένα ψευδώς αρνητικό αποτέλεσμα (αρνητικό με τη PCR/DTU και θετικό με τη μέθοδο αναφοράς).

Επιπλέον, η διαγνωστική ακρίβεια των PCR και DTU εκτιμήθηκε υπολογίζοντας τη θετική προγνωστική αξία (positive predictive value, PPV), την αρνητική προγνωστική αξία (negative predictive value, NPV), την ειδικότητα και την ευαισθησία της κάθε μεθόδου. Ως ευαισθησία ορίστηκε η αναλογία του αριθμού των αληθώς θετικών (PCR/DTU και μέθοδος αναφοράς) αποτελεσμάτων προς τον αριθμό των θετικών άμεσων μικροσκοπικών εξετάσεων ή/και των καλλιιεργειών στις οποίες απομονώθηκαν δερματόφυτα. Ως ειδικότητα ορίστηκε η αναλογία του αριθμού των αληθώς αρνητικών (PCR/DTU και μέθοδος αναφοράς) αποτελεσμάτων προς τον αριθμό των αρνητικών άμεσων μικροσκοπικών εξετάσεων ή/και των καλλιιεργειών στις οποίες αναπτύχθηκαν αποικίες μυκήτων που δεν ταυτοποιούνται ως δερματόφυτα. Ως PPV ορίστηκε η αναλογία του αριθμού των αληθώς θετικών (PCR/DTU και μέθοδος αναφοράς) αποτελεσμάτων προς τον αριθμό των θετικών αποτελεσμάτων με PCR/DTU. Τέλος, ως NPV ορίστηκε η αναλογία του αριθμού των αληθώς αρνητικών (PCR/DTU και μέθοδος αναφοράς) αποτελεσμάτων προς τον αριθμό των αρνητικών αποτελεσμάτων με PCR/DTU.

Τα δεδομένα αναλύθηκαν με τη χρήση του στατιστικού λογισμικού πακέτου GraphPad Prism, έκδοση 8.0, για Windows (GraphPad Software, Σαν Ντιέγκο, Καλιφόρνια, ΗΠΑ).

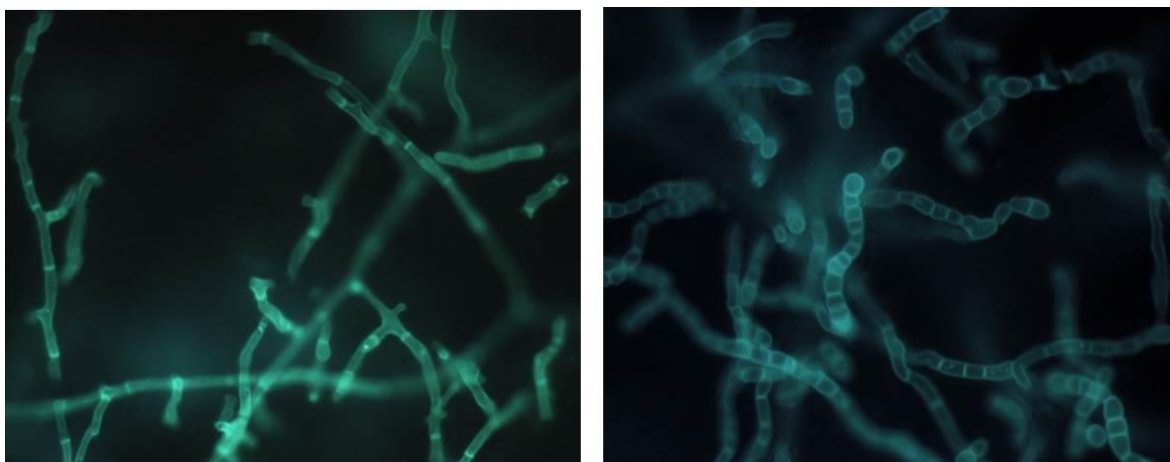
### 3. Αποτελέσματα

#### 3.1 Άμεση μικροσκόπηση και καλλιέργεια

Η μικροσκοπική εξέταση νωπών παρασκευασμάτων υπέδειξε μορφολογικά στοιχεία συμβατά με δερματόφυτο (υφές ή/και αρθροκονίδια) σε 54/84 (64%) δείγματα. Από την άλλη πλευρά, η καλλιέργεια απέδωσε δερματόφυτο μόλις σε 9/84 (11%) δείγματα, εκ των οποίων 6/9 (67%) είχαν θετική άμεση μικροσκόπηση (υφές ή/και αρθροκονίδια). Τα δερματόφυτα στη συνέχεια ταυτοποιήθηκαν ως *T. rubrum* (n=5), *T. interdigitale* (n=3) και *T. mentagrophytes* (n=1).

Επίσης, από την καλλιέργεια 11/84 (13%) δειγμάτων απομονώθηκαν ζυμομύκητες, και συγκεκριμένα *C. parapsilosis* (n=5), *M. guilliermondii* (n=2), *C. albicans* (n=2), *C. orthopsilosis* (n=1) και *C. parapsilosis* μαζί με *C. mucoides* (n=1), εκ των οποίων 1/11 (9%) είχε θετική άμεση μικροσκόπηση (υφές). Τέλος, από την καλλιέργεια 5/84 (6%) δειγμάτων απομονώθηκαν σαπροφυτικοί, εν δυνάμει παθογόνοι, νηματοειδείς μύκητες, και συγκεκριμένα *S. breuvicaulis* (n=1), *A. sydowii* (n=1), *A. niger* species complex (n=1), *A. ochraceus* (n=1) και *F. dimerum* (n=1), εκ των οποίων 3/5 (60%) είχαν θετική άμεση μικροσκόπηση (υφές).

Ως εκ τούτου, η συμφωνία μεταξύ των μεθόδων ήταν μόλις 30% (25/84 δείγματα).



**Εικόνα 27.** Άμεση μικροσκοπική εξέταση (αντικειμενικός φακός 40x) ξεσμάτων όνυχος μετά την κατεργασία τους με διάλυμα χρωστικής Blankophor P σε KOH 20%. Στις καλλιέργειες των δειγμάτων απομονώθηκε *T. mentagrophytes* (αριστερά) και *T. rubrum* (δεξιά) (εικόνες από τη συλλογή του Τμήματος Μυκητολογίας, Εργαστήριο Κλινικής Μικροβιολογίας, Π.Γ.Ν. «Αττικόν»).

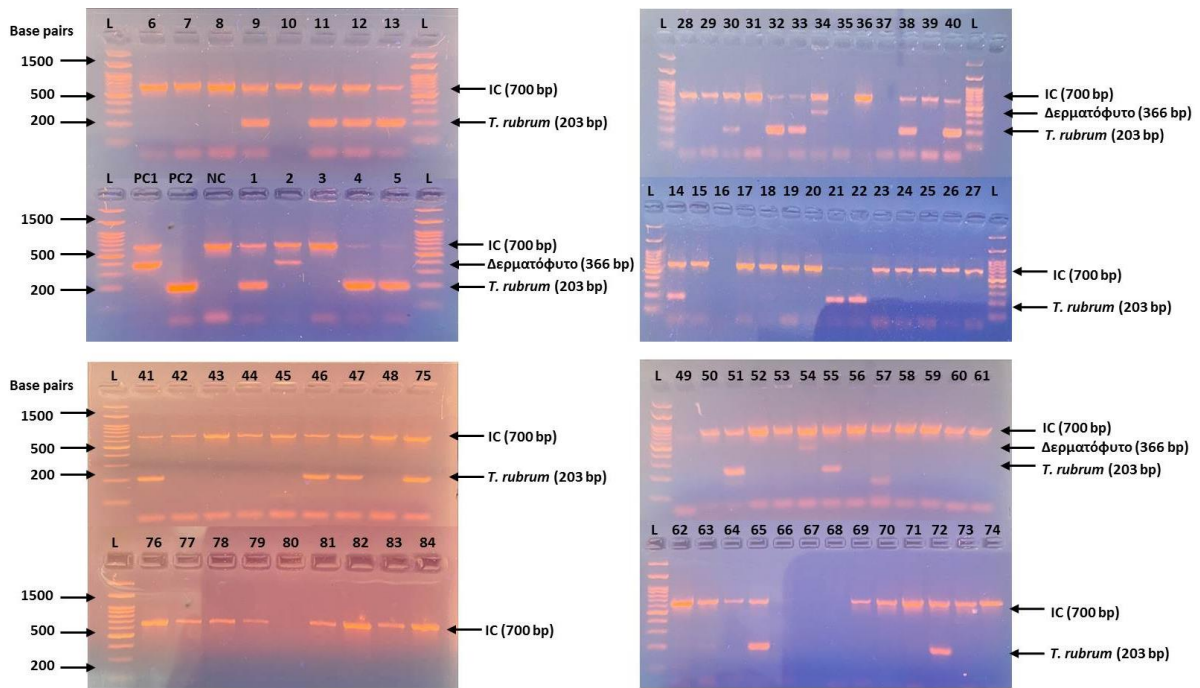
### 3.2 Αξιολόγηση της PCR στην ανίχνευση δερματοφύτων

Σε 8/84 δείγματα διαπιστώθηκε αναστολή της PCR (μη ενίσχυση του IC), και επομένως τα συγκεκριμένα αποκλείστηκαν από τη μετέπειτα συγκριτική ανάλυση. Από αυτά, 3/8 είχαν θετική άμεση μικροσκόπηση, ενώ από την καλλιέργεια 4/8 απομονώθηκαν *C. parapsilosis* (n=1), *S. breuivcaulis* (n=1), *A. niger* species complex (n=1) και *T. rubrum* (n=1).

Λαμβάνοντας, λοιπόν, υπόψη τα εναπομείναντα 76, 27 (36%) βρέθηκαν θετικά με τη PCR, εκ των οποίων 24 (89%) θετικά για *T. rubrum* και 3 (11%) θετικά για άλλο δερματοφύτο. Μεταξύ των 8 δειγμάτων που ήταν θετικά για δερματοφύτο στην καλλιέργεια (10%), 7 επιβεβαιώθηκαν με PCR. Συγκεκριμένα, και τα 3 δείγματα που ήταν PCR θετικά για δερματοφύτο/αρνητικά για *T. rubrum* αναγνωρίστηκαν ως *T. interdigitale* με καλλιέργεια, όμως μόνο 2 βρέθηκαν θετικά με μικροσκοπική εξέταση. Επίσης, 4 δείγματα που ήταν PCR θετικά για *T. rubrum*, αναγνωρίστηκαν ως *T. rubrum* με καλλιέργεια και είχαν θετική άμεση μικροσκόπηση. Αντίθετα, ένα δείγμα που ήταν θετικό με καλλιέργεια (*T. mentagrophytes*), ήταν αρνητικό τόσο με μικροσκοπική εξέταση, όσο και με PCR.

Επιπλέον, μεταξύ των 51 (67%) δειγμάτων που είχαν θετική άμεση μικροσκόπηση, 25 (49%) επιβεβαιώθηκαν με PCR. Από τα 26 δείγματα με θετική μικροσκοπική εξέταση που βρέθηκαν αρνητικά με τη PCR, 24 (92%) είχαν αρνητική καλλιέργεια, ενώ από την καλλιέργεια των υπόλοιπων 2 απομονώθηκαν *A. sydowii* και *F. dimerum*, αντίστοιχα. Μόλις 2 δείγματα με αρνητική άμεση μικροσκόπηση, από την καλλιέργεια των οποίων είχαν απομονωθεί *C. parapsilosis* και *T. interdigitale*, αντίστοιχα, βρέθηκαν PCR θετικά για *T. rubrum* και για άλλο δερματοφύτο, αντίστοιχα.

Τέλος, η PCR ήταν αρνητική σε 11/13 περιπτώσεις που απομονώθηκαν μη δερματοφυτικοί μύκητες στην καλλιέργεια. Ειδικότερα, 2 δείγματα με θετική για *Candida* spp. καλλιέργεια, με ένα μόνο εξ αυτών να έχει θετική άμεση μικροσκόπηση, βρέθηκαν PCR θετικά για *T. rubrum*.



**Εικόνα 28.** Ηλεκτροφορητικός έλεγχος PCR προϊόντων για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων της δοκιμασίας Dermatophyte PCR Kit που διενεργήθηκε στο πλαίσιο της παρούσας μελέτης. L: δείκτης μοριακών βαρών, PC1: γενωμικό δερματοφυτικό DNA, PC2: γενωμικό *T. rubrum* DNA, NC: αρνητικός μάρτυρας ελέγχου, 1, 4, 5, 9, 11-14, 21, 22, 30, 32, 33, 38, 40, 41, 46, 47, 51, 55, 57, 65, 72 και 75: δείγματα θετικά για *T. rubrum*, 2, 34 και 54: δείγματα θετικά για δερματόφυτο, 16, 35, 37, 49, 66-68 και 8: αναστολή της PCR (μη ενίσχυση του IC).

**Πίνακας 2.** Συγκεντρωτικός πίνακας των αποτελεσμάτων που προέκυψαν κατά τη διενέργεια της άμεσης μικροσκοπησης, της καλλιέργειας και της δοκιμασίας Dermatophyte PCR Kit.

| A/α δείγματος | Μικροσκοπηση** | Καλλιέργεια**                       | PCR                    |
|---------------|----------------|-------------------------------------|------------------------|
| 1             | +              | -                                   | + ( <i>T. rubrum</i> ) |
| 2             | +              | <i>T. interdigitale</i>             | + (δερματόφυτο)        |
| 3             | +              | <i>F. dimerum</i>                   | -                      |
| 4             | +              | -                                   | + ( <i>T. rubrum</i> ) |
| 5             | +              | <i>T. rubrum</i>                    | + ( <i>T. rubrum</i> ) |
| 6             | +              | -                                   | -                      |
| 7             | +              | -                                   | -                      |
| 8             | +              | -                                   | -                      |
| 9             | +              | <i>T. rubrum</i>                    | + ( <i>T. rubrum</i> ) |
| 10            | +              | -                                   | -                      |
| 11            | +              | -                                   | + ( <i>T. rubrum</i> ) |
| 12            | +              | -                                   | + ( <i>T. rubrum</i> ) |
| 13            | +              | -                                   | + ( <i>T. rubrum</i> ) |
| 14            | +              | -                                   | + ( <i>T. rubrum</i> ) |
| 15            | +              | -                                   | -                      |
| 16            | +              | -                                   | X*                     |
| 17            | -              | <i>T. mentagrophytes</i>            | -                      |
| 18            | +              | -                                   | -                      |
| 19            | +              | -                                   | -                      |
| 20            | +              | -                                   | -                      |
| 21            | +              | -                                   | + ( <i>T. rubrum</i> ) |
| 22            | +              | -                                   | + ( <i>T. rubrum</i> ) |
| 23            | +              | -                                   | -                      |
| 24            | +              | -                                   | -                      |
| 25            | -              | <i>C. parapsilosis</i>              | -                      |
| 26            | +              | -                                   | -                      |
| 27            | -              | <i>A. ochraceus</i>                 | -                      |
| 28            | -              | -                                   | -                      |
| 29            | +              | -                                   | -                      |
| 30            | +              | -                                   | + ( <i>T. rubrum</i> ) |
| 31            | +              | -                                   | -                      |
| 32            | +              | -                                   | + ( <i>T. rubrum</i> ) |
| 33            | +              | -                                   | + ( <i>T. rubrum</i> ) |
| 34            | +              | <i>T. interdigitale</i>             | + (δερματόφυτο)        |
| 35            | +              | -                                   | X*                     |
| 36            | -              | <i>C. albicans</i>                  | -                      |
| 37            | -              | <i>A. niger</i> species complex     | X*                     |
| 38            | +              | -                                   | + ( <i>T. rubrum</i> ) |
| 39            | +              | -                                   | -                      |
| 40            | +              | -                                   | + ( <i>T. rubrum</i> ) |
| 41            | +              | -                                   | + ( <i>T. rubrum</i> ) |
| 42            | -              | <i>C. parapsilosis, T. mucoides</i> | -                      |
| 43            | +              | -                                   | -                      |
| 44            | +              | -                                   | -                      |
| 45            | -              | -                                   | -                      |
| 46            | +              | <i>T. rubrum</i>                    | + ( <i>T. rubrum</i> ) |
| 47            | +              | -                                   | + ( <i>T. rubrum</i> ) |
| 48            | +              | -                                   | -                      |
| 49            | -              | <i>T. rubrum</i>                    | X*                     |

|    |   |                          |                        |
|----|---|--------------------------|------------------------|
| 50 | + | -                        | -                      |
| 51 | + | -                        | + ( <i>T. rubrum</i> ) |
| 52 | + | -                        | -                      |
| 53 | + | <i>A. sydowii</i>        | -                      |
| 54 | - | <i>T. interdigitale</i>  | + (δερματόφυτο)        |
| 55 | + | <i>C. guilliermondii</i> | + ( <i>T. rubrum</i> ) |
| 56 | - | -                        | -                      |
| 57 | - | <i>C. parapsilosis</i>   | + ( <i>T. rubrum</i> ) |
| 58 | - | -                        | -                      |
| 59 | - | -                        | -                      |
| 60 | - | -                        | -                      |
| 61 | - | -                        | -                      |
| 62 | - | <i>C. albicans</i>       | -                      |
| 63 | + | -                        | -                      |
| 64 | - | -                        | -                      |
| 65 | + | -                        | + ( <i>T. rubrum</i> ) |
| 66 | - | <i>C. parapsilosis</i>   | X*                     |
| 67 | - | -                        | X*                     |
| 68 | + | <i>S. brevicaulis</i>    | X*                     |
| 69 | + | -                        | -                      |
| 70 | + | -                        | -                      |
| 71 | + | -                        | -                      |
| 72 | + | -                        | + ( <i>T. rubrum</i> ) |
| 73 | - | -                        | -                      |
| 74 | - | -                        | -                      |
| 75 | + | <i>T. rubrum</i>         | + ( <i>T. rubrum</i> ) |
| 76 | - | <i>C. guilliermondii</i> | -                      |
| 77 | - | <i>C. parapsilosis</i>   | -                      |
| 78 | - | <i>C. parapsilosis</i>   | -                      |
| 79 | - | -                        | -                      |
| 80 | - | -                        | X*                     |
| 81 | - | -                        | -                      |
| 82 | - | <i>C. orthopsilosis</i>  | -                      |
| 83 | + | -                        | -                      |
| 84 | - | -                        | -                      |

| % θετικά για<br>δερματόφυτο*** | 67% | 10% | 36% |
|--------------------------------|-----|-----|-----|
|--------------------------------|-----|-----|-----|

\*Μη ενίσχυση του IC. Τα δείγματα αυτά αποκλείστηκαν από τη συγκριτική ανάλυση.

\*\*Ως μέθοδος αναφοράς για τη συγκριτική ανάλυση ορίστηκε η + άμεση μικροσκοπηση ή/και η + για δερματόφυτο καλλιέργεια.

\*\*\*76/84 δείγματα που δε διαπιστώθηκε αναστολή της PCR.

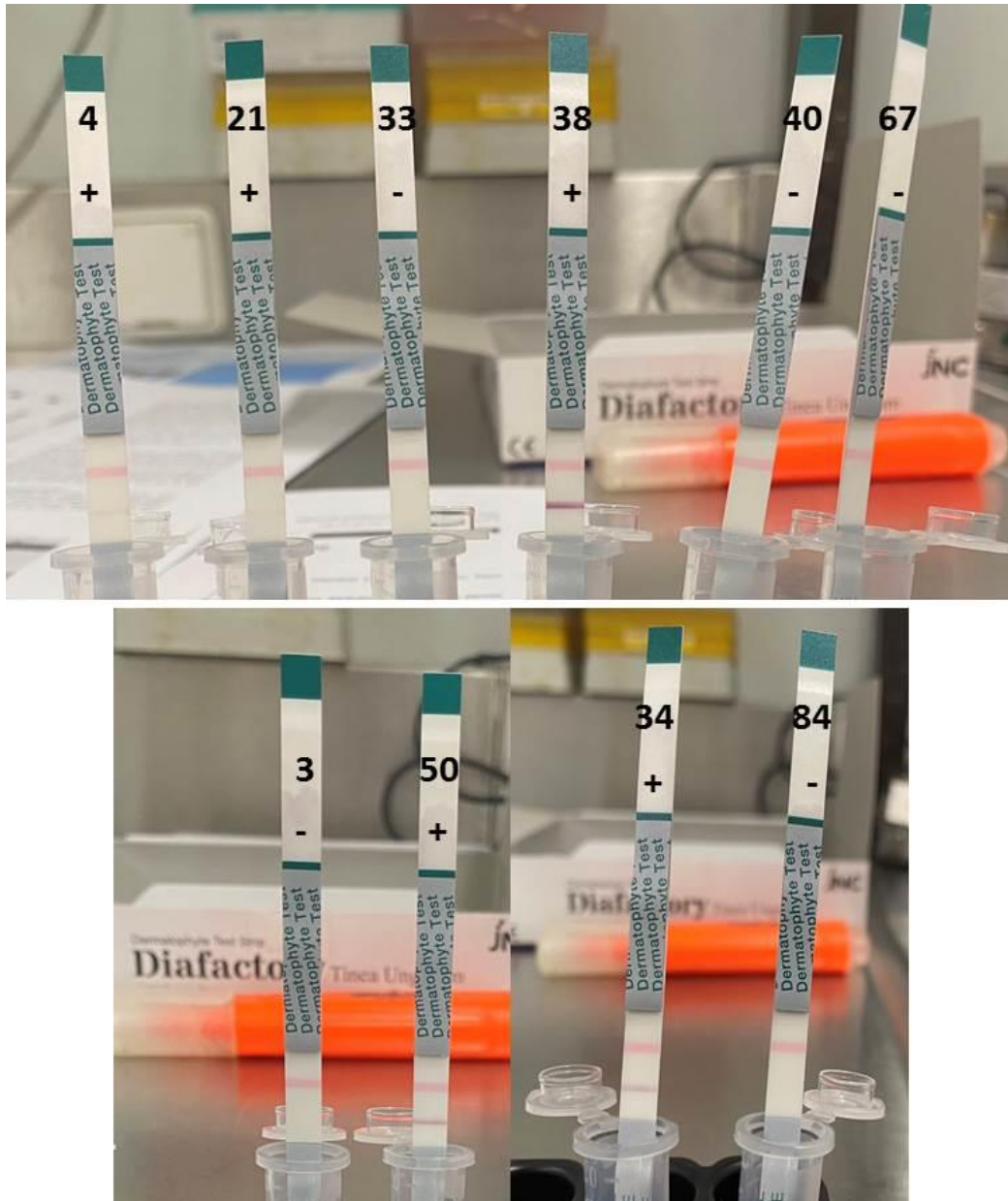


Συγκεντρωτικά, μεταξύ των 53/76 (70%) δειγμάτων που βρέθηκαν θετικά με τη μέθοδο αναφοράς (θετική άμεση μικροσκόπηση ή/και θετική για δερματοφύτο καλλιέργεια), 26 (34%) επιβεβαιώθηκαν με PCR. Από την άλλη πλευρά, μεταξύ των 23/76 (30%) δειγμάτων που βρέθηκαν αρνητικά με τη μέθοδο αναφοράς, μόνο ένα (1%) ήταν θετικό με τη PCR. Επομένως, βρέθηκε μια στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ των αποτελεσμάτων της PCR και της μεθόδου αναφοράς ( $p=0,0002$ ). Η συμφωνία ανάμεσα στις δύο μεθόδους ήταν 63% με  $\kappa=0,34$  (95% CI 0,14-0,53) υποδεικνύοντας οριακά χαμηλή ισχύ. Συγκεκριμένα, εντοπίστηκαν 1% MaEs και 36% VmEs.

Αναφορικά με τη διαγνωστική ακρίβεια της PCR στην ανίχνευση δερματοφύτων, η μέθοδος υπέδειξε ευαισθησία 49% (95% CI 35-63%), ειδικότητα 96% (95% CI 76-100%), PPV 96% (95% CI 79-100%) και NPV 45% (95% CI 31-60%).

### **3.3 Αξιολόγηση της ανοσοχρωματογραφίας στην ανίχνευση δερματοφύτων**

Η ποσότητα μόλις 10/84 δειγμάτων υπήρχε σε περίσσεια προκειμένου να αξιολογηθεί η δυνατότητα ανίχνευσης δερματοφύτων με ανοσοχρωματογραφία. Από αυτά, 5 (50%) βρέθηκαν θετικά για δερματοφύτο με την DTU, εκ των οποίων όλα (100%) είχαν θετική άμεση μικροσκόπηση, 4 ήταν αρνητικά με καλλιέργεια και από την καλλιέργεια του ενός (20%) απομονώθηκε *T. interdigitale*. Μεταξύ των υπόλοιπων 5 δειγμάτων που ήταν αρνητικά για δερματοφύτο στην DTU, 3 (60%) βρέθηκαν θετικά με μικροσκοπική εξέταση, 4 (80%) ήταν αρνητικά με καλλιέργεια και από την καλλιέργεια του ενός απομονώθηκε *F. dimerum*.



**Εικόνα 29.** Ερμηνεία αποτελεσμάτων της ανοσοχρωματογραφικής δοκιμασίας DTU. Δείγματα 4, 21, 34, 38, 50: θετικά για δερματόφυτο (εμφάνιση αχνής ή έντονης μωβ γραμμής στη TLZ και ροζ γραμμής στη CLZ), δείγματα 3, 33, 40, 67, 84: αρνητικά για δερματόφυτο (μη εμφάνιση μωβ γραμμής στη TLZ, εμφάνιση ροζ γραμμής στη CLZ).

Δεδομένης της δυνατότητας ελέγχου μικρού αριθμού δειγμάτων, τα αποτελέσματα θα πρέπει να θεωρηθούν προκαταρκτικά. Ειδικότερα, τα αποτελέσματα της DTU δε βρέθηκε να συσχετίζονται σημαντικά με αυτά της μεθόδου αναφοράς ( $p=0,44$ ). Η συμφωνία μεταξύ των δύο μεθόδων ήταν 70% (30% VmEs) με  $\kappa=0,40$  (95% CI 0-0,85) υποδεικνύοντας οριακά χαμηλή ισχύ.

Αναφορικά με τη διαγνωστική ακρίβεια της DTU στην ανίχνευση δερματοφύτων, η μέθοδος υπέδειξε ευαισθησία 62% (95% CI 26-90%), ειδικότητα 100% (95% CI 20-100%), PPV 100% (95% CI 46-100%) και NPV 40% (95% 7-83%).

Ωστόσο, δεδομένης της εξαιρετικά υψηλής ειδικότητας και PPV (96%) της PCR, σε αντίθεση με την άμεση μικροσκόπηση, αξίζει να σημειωθεί πως μόλις 4/5 θετικά για δερματόφυτο και 3/5 αρνητικά για δερματόφυτο με την DTU επαληθεύθηκαν με μοριακή ανίχνευση. Έτσι, θεωρώντας αυτή τη φορά ως χρυσό πρότυπο για ένα αληθώς θετικό για δερματόφυτο δείγμα τη θετική PCR ή/και τη θετική για δερματόφυτο καλλιέργεια, η ευαισθησία και η NPV αυξάνονται στο 67% (95% CI 24-94%) και 60% (95% 17-93%), αντίστοιχα, ενώ η ειδικότητα και η PPV μειώνονται στο 75% (95% CI 22-99%) και 80% (95% CI 30-99%), αντίστοιχα.

**Πίνακας 3.** Συγκεντρωτικός πίνακας των αποτελεσμάτων που προέκυψαν κατά τη διενέργεια της άμεσης μικροσκόπησης, της καλλιέργειας, της δοκιμασίας Dermatophyte PCR Kit και της δοκιμασίας DTU.

| A/a δείγματος                   | Μικροσκόπηση | Καλλιέργεια             | PCR                    | DTU        |
|---------------------------------|--------------|-------------------------|------------------------|------------|
| 3                               | +            | <i>F. dimerum</i>       | -                      | -          |
| 4                               | +            | -                       | + ( <i>T. rubrum</i> ) | +          |
| 21                              | +            | -                       | + ( <i>T. rubrum</i> ) | +          |
| 33                              | +            | -                       | + ( <i>T. rubrum</i> ) | -          |
| 34                              | +            | <i>T. interdigitale</i> | + (δερματόφυτο)        | +          |
| 38                              | +            | -                       | + ( <i>T. rubrum</i> ) | +          |
| 40                              | +            | -                       | + ( <i>T. rubrum</i> ) | -          |
| 50                              | +            | -                       | -                      | +          |
| 67                              | -            | -                       | X*                     | -          |
| 84                              | -            | -                       | -                      | -          |
| <b>% θετικά για δερματόφυτο</b> | <b>80%</b>   | <b>10%</b>              |                        | <b>50%</b> |

\*Μη ενίσχυση του IC.

## 4. Συζήτηση - Συμπεράσματα

Η διενέργεια εργαστηριακών εξετάσεων είναι απαραίτητη για την οριστική διάγνωση της ονυχομυκητίασης εξαιτίας της έλλειψης παθογνωμονικών κλινικών χαρακτηριστικών της [121]. Η εντός της ημέρας τεκμηρίωση της λοίμωξης από δερματόφυτα στους όνυχες αποτελεί μια σημαντική βελτίωση στο διαγνωστικό αλγόριθμο της *tinea unguium*, επιτρέποντας την άμεση έναρξη ενδεδειγμένης αντιμυκητικής θεραπείας [122], ιδίως συστηματικής καθώς αυτή απαιτεί παρατεταμένη διάρκεια και μπορεί να σχετίζεται με ηπατική τοξικότητα [123].

Στο πλαίσιο της παρούσας μελέτης, η αξιολόγηση τόσο της μοριακής (Dermatophyte PCR Kit), όσο και της ανοσοχρωματογραφικής (DTU), ανίχνευσης δερματοφύτων σε ξέσματα όνυχος υπέδειξε υψηλότερο ποσοστό θετικών δειγμάτων συγκριτικά με αυτό της καλλιέργειας. Από την άλλη πλευρά, οι μη βασιζόμενες στην καλλιέργεια δοκιμασίες υπέδειξαν χαμηλότερο ποσοστό θετικών δειγμάτων συγκριτικά με αυτό της άμεσης μικροσκόπησης. Ειδικότερα, δείγματα αρνητικά με καλλιέργεια, αλλά θετικά με άμεση μικροσκόπηση, θεωρήθηκαν ως θετικά για δερματόφυτο, παρόλο που δε δύναται να αποκλειστεί η πιθανότητα ορισμένες από αυτές τις περιπτώσεις να αντιπροσωπεύουν λοιμώξεις από μη δερματοφυτικούς νηματοειδείς μύκητες (όπως παρατηρήθηκε για τα δείγματα 3, 53 και 68, **Πίνακας 2**). Εντούτοις, δεν είναι σπάνιο να λαμβάνονται αρνητικά αποτελέσματα καλλιέργειας από ασθενείς με *tinea unguium*, εξαιτίας διαφόρων δυσκολιών που σχετίζονται με τη δειγματοληψία (ανεπαρκής ποσότητα ή μη σωστή επιλογή δείγματος) και της πρόσφατης λήψης αντιμυκητικής θεραπείας (μικρή βιωσιμότητα παθογόνου) [97,124]. Μάλιστα, πολυάριθμες μελέτες έχουν αναφέρει ότι η μικροσκοπική εξέταση νωπών παρασκευασμάτων ονύχων χαρακτηρίζεται από χαμηλότερη ειδικότητα και υψηλότερη ευαισθησία συγκρινόμενη με την καλλιέργεια (38-78% έναντι 83-100% και 67-93% έναντι 31-59%, αντίστοιχα) [125], υπογραμμίζοντας τη συμπληρωματικότητα αυτών των δύο διαγνωστικών δοκιμασιών. Ως εκ τούτου, ξέσματα όνυχος με θετική άμεση μικροσκόπηση, αλλά αρνητική καλλιέργεια, θα πρέπει να διερευνώνται πάντα περαιτέρω.

Λαμβάνοντας υπόψη τις έγκυρες δοκιμασίες PCR (ενίσχυση του IC σε 76/84 δείγματα), το ποσοστό ανίχνευσης δερματοφύτων σε ξέσματα όνυχος από άτομα με κλινική υποψία ονυχομυκητίασης ήταν 67% με μικροσκοπική εξέταση, 10% με καλλιέργεια και 36% με PCR. Τα αποτελέσματα αυτά συγκλίνουν με εκείνα προηγούμενων μελετών, οι οποίες ανέφεραν παρόμοιο ποσοστό θετικών δειγμάτων κατά

τη διενέργεια της μοριακής δοκιμασίας (44%) [117,118]. Σε δύο περιπτώσεις, η καλλιέργεια και η PCR απέδωσαν αποκλίνοντα αποτελέσματα, δηλαδή *Candida* spp. σύμφωνα με την καλλιέργεια και *T. rubrum* σύμφωνα με τη PCR. Το εύρημα αυτό μπορεί να αντανάκλα τον ταχύτερα αναπτυσσόμενο *in vitro* ζυμομύκητα σε δείγμα ασθενούς που είχε μεικτή λοίμωξη από *T. rubrum* και *Candida* spp. Εναλλακτικά, μπορεί να οφείλεται σε επιμόλυνση κατά τη δειγματοληψία, όπως στον ενδεχόμενο μη καλό καθαρισμό της περιοχής. Σε κάθε περίπτωση, η απομόνωση *Candida* spp. παρουσία δερματοφύτων έχει περιορισμένη κλινική αξία, καθώς υποδηλώνει συνήθως αποικισμό παρά μική λοίμωξη. Ως εκ τούτου, η ανάπτυξη τους στα καλλιεργητικά μέσα δε θα πρέπει να αξιολογείται, εάν αυτή δεν υποστηρίζεται από συμβατά ευρήματα στα άμεσα μικροσκοπικά παρασκευάσματα και στην κλινική εικόνα του ασθενούς [97]. Από την άλλη πλευρά, ένα δείγμα που βρέθηκε θετικό με καλλιέργεια (*T. mentagrophytes*), ήταν αρνητικό τόσο με μικροσκοπική εξέταση, όσο και με PCR. Εφόσον παρατηρήθηκε ενίσχυση του IC στο συγκεκριμένο δείγμα, απορρίφτηκε η πιθανότητα παρουσίας ανασταλτικών ουσιών της PCR σε αυτό, και κατ' επέκταση η θεώρηση του αποτελέσματος ως ψευδώς αρνητικό. Μια ενδεχόμενη εξήγηση είναι ότι ο μύκητας ήταν μη βιώσιμος ή βιώσιμος αλλά άνισα κατανομημένος στο δείγμα. Μια άλλη πιθανότητα είναι ότι το παθογόνο να έφερε μεταλλάξεις στις θέσεις που αναγνωρίστηκαν από τον υβριδισμό. Περαιτέρω διερεύνηση δεν μπορούσε να πραγματοποιηθεί, καθώς δεν υπήρχε διαθέσιμη επιπλέον ποσότητα του συγκεκριμένου δείγματος.

Επιπλέον, το Dermatophyte PCR Kit υπέδειξε 96% PPV, 45% NPV, 49% ευαισθησία και 96% ειδικότητα, όταν τα αποτελέσματα της δοκιμασίας επιβεβαιώθηκαν με θετική άμεση μικροσκόπηση ή/και καλλιέργεια. Η σύγκριση της ποσοτικής εκτίμησης των προαναφερθέντων παραμέτρων με αυτές προηγούμενων μελετών είναι σε κάποιο βαθμό επισφαλής εξαιτίας της έλλειψης μιας γενικώς αποδεκτής μεθόδου αναφοράς. Ωστόσο, τα προσδιορισθέντα υψηλά ποσοστά ειδικότητας και PPV, τα οποία έχουν περιγραφεί και σε άλλες συγκριτικές μελέτες χρησιμοποιώντας την ίδια μέθοδο αναφοράς (94-100% και 93%, αντίστοιχα) [117,118], σε συγκερασμό με την υψηλή ταχύτητα παροχής διάγνωσης (εντός της ημέρας), καθιστούν το Dermatophyte PCR Kit ως μια ελκυστική δοκιμασία για τη διερεύνηση της *tinea unguium* στην καθ' ημέρα εργαστηριακή πράξη. Μολονότι το κόστος του είναι υψηλότερο συγκριτικά με αυτό των αναλώσιμων και αντιδραστηρίων που απαιτούνται για τη διενέργεια των συμβατικών μεθόδων, χαρακτηρίζεται συγχρόνως από χαμηλότερη ένταση ανθρώπινου/εργατικού δυναμικού. Τέλος, η εγγενής αδυναμία

ανίχνευσης μη δερματοφυτικών παθογόνων ή η διάκριση μεταξύ ανθρωπόφιλων, ζωόφιλων και γεώφιλων ειδών, δεν πρέπει να θεωρούνται σημαντικά ζητήματα. Δεδομένου ότι η *trinea unguium* είναι μια καλοήθης βλάβη των ονύχων, οι οποίοι είναι εύκολα προσβάσιμοι ως κλινικό δείγμα, ένα μέτριο ποσοστό ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων είναι αποδεκτό. Σήμερα, υπάρχουν επίσης εμπορικά διαθέσιμες δοκιμασίες PCR πραγματικού χρόνου για τη διάγνωση της ονυχομυκητίασης, αυξάνοντας ωστόσο σημαντικά το κόστος της εξέτασης σε σύγκριση με το αντίστοιχο της συμβατικής PCR, ενώ η ανάλυση της καμπύλης τήξης των προϊόντων της είναι περιορισμένη τεχνικά στην ικανότητα ανίχνευσης περισσότερων των 3 ειδών [122].

Επί του παρόντος, οι προκαταρκτικές μελέτες που αξιολόγησαν τη διαγνωστική ακρίβεια της DTU στην ανίχνευση δερματοφύτων σε ξέσματα όνυχος συγκριτικά με την άμεση μικροσκόπηση, ανέφεραν ποσοστά ευαισθησίας και ειδικότητας της τάξης του 85-100% και 35-100%, αντίστοιχα [108,126-129]. Από την άλλη πλευρά, μια πρόσφατη συγκριτική μελέτη μεταξύ της ανοσοχρωματογραφικής δοκιμασίας και της καλλιέργειας υπέδειξε 89% PPV, 84% NPV, 96% ευαισθησία και 72% ειδικότητα. Σημειωτέον, η ευαισθησία της μειώθηκε σημαντικά (80%) όταν σε επιμέρους ανάλυση ελήφθησαν υπόψη τα αποτελέσματα της άμεσης μικροσκόπησης [105], υπογραμμίζοντας το ρόλο της επιλογής της καταλληλότερης μεθόδου αναφοράς για την εξαγωγή αντιπροσωπευτικών συμπερασμάτων. Τέλος, σύμφωνα με τα προκαταρκτικά αποτελέσματα της παρούσας μελέτης (μόλις 10/84 δείγματα σε περίσσεια ποσότητα), το ποσοστό ανίχνευσης δερματοφύτων σε ξέσματα όνυχος από άτομα με κλινική υποψία ονυχομυκητίασης ήταν 80% με μικροσκοπική εξέταση, 10% με καλλιέργεια και 50% με DTU. Ειδικότερα, η ανοσοχρωματογραφική δοκιμασία υπέδειξε 100% PPV, 40% NPV, 62% ευαισθησία και 100% ειδικότητα όταν τα αποτελέσματά της επιβεβαιώθηκαν με θετική άμεση μικροσκόπηση ή/και καλλιέργεια.

Δεδομένης της ευκολίας στη χρήση και του μικρού χρόνου διεκπεραίωσης (μέγιστο 30 min), το DTU θα μπορούσε ίσως να χρησιμοποιηθεί από επαγγελματίες υγείας προκειμένου να αποφασίσουν εάν ο ασθενής χρειάζεται να παραπεμφθεί σε ειδικό (δερματολόγο) ή να πραγματοποιήσει επιπλέον εργαστηριακές εξετάσεις. Επιπλέον, θα μπορούσε πιθανώς να χρησιμοποιηθεί στα εργαστήρια, ιδίως σε περίπτωση απουσίας εξειδικευμένου και έμπειρου μικροσκοπιστή ή σύγχρονου εργαστηριακού εξοπλισμού. Αξίζει να αναφερθεί πως η δοκιμασία θα πρέπει να διεξάγεται σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή, δηλαδή αποκλειστικά για τον έλεγχο ξεσμάτων όνυχος, καθώς μια

πρόσφατη αξιολόγηση της DTU για τη διάγνωση της tinea pedis υπέδειξε πως δεν είναι κατάλληλη για την εξέταση λεπιών ψιλού δέρματος (67% PPV) [130].

Συμπερασματικά, η ενσωμάτωση μη εξαρτώμενων από την καλλιέργεια μεθόδων στη διαγνωστική διαδικασία της tinea unguium αποτελεί μια ελκυστική εναλλακτική προσέγγιση. Τόσο η μοριακή (Dermatophyte PCR Kit), όσο και η ανοσοχρωματογραφική (DTU), ανίχνευση δερματοφύτων σε ξέσματα όνυχος μπορεί να χρησιμοποιηθεί επικουρικά ως επιβεβαιωτική μέθοδος σε περίπτωση αμφίβολου αποτελέσματος με τις συμβατικές μεθόδους (θετική άμεση μικροσκόπηση και αρνητική καλλιέργεια) ή σε περιστατικά που χρήζουν άμεσης διάγνωσης (ανοσοκατεσταλμένοι ασθενείς). Συγκεκριμένα, θα μπορούσαν πιθανώς να χρησιμοποιηθούν αντί ή επιπροσθέτως της μικροσκοπικής εξέτασης νωπών παρασκευασμάτων, χωρίς να αντικαταστήσουν την καλλιέργεια, ώστε να μην υπάρχει σημαντικός αρνητικός αντίκτυπος στη διάγνωση άλλων μορφών ονυχομυκητίασης. Τέλος, αξίζει να σημειωθεί πως το αποτέλεσμά τους δεν επηρεάζεται από προηγηθείσα αντιμυκητική θεραπεία, με αποτέλεσμα η λήψη του κλινικού δείγματος να γίνεται χωρίς χρονικό περιορισμό.

## Βιβλιογραφία

- [1] Zhan, P., & Liu, W. (2017). The changing face of dermatophytic infections worldwide. *Mycopathologia*, 182(1-2), 77-86.
- [2] Verma, S. B., Panda, S., Nenoff, P., Singal, A., Rudramurthy, S. M., Uhrlass, S., ... & Vasani, R. (2021). The unprecedented epidemic-like scenario of dermatophytosis in India: I. Epidemiology, risk factors and clinical features. *Indian journal of dermatology, venereology and leprology*, 87(2), 154-175.
- [3] Coulibaly, O., L'Ollivier, C., Piarroux, R., & Ranque, S. (2018). Epidemiology of human dermatophytoses in Africa. *Medical mycology*, 56(2), 145-161.
- [4] Benedict, K., Jackson, B. R., Chiller, T., & Beer, K. D. (2019). Estimation of direct healthcare costs of fungal diseases in the United States. *Clinical Infectious Diseases*, 68(11), 1791-1797.
- [5] Fiammenghi, E., Patalano, A., Conte, V. L., & Calabrò, G. (2015). Cost analysis of inappropriate treatments for suspected dermatomycoses. *Farmeconomia. Health economics and therapeutic pathways*, 16(2), 39-44.
- [6] de Hoog, G. S., Dukik, K., Monod, M., Packeu, A., Stubbe, D., Hendrickx, M., ... & Gräser, Y. (2017). Toward a novel multilocus phylogenetic taxonomy for the dermatophytes. *Mycopathologia*, 182, 5-31.
- [7] Zurita, J., & Hay, R. J. (1987). Adherence of dermatophyte microconidia and arthroconidia to human keratinocytes in vitro. *Journal of Investigative Dermatology*, 89(5), 529-534.
- [8] Vermout, S., Tabart, J., Baldo, A., Mathy, A., Losson, B., & Mignon, B. (2008). Pathogenesis of dermatophytosis. *Mycopathologia*, 166, 267-275.
- [9] Baldo, A., Monod, M., Mathy, A., Cambier, L., Bagut, E. T., Defaweux, V., ... & Mignon, B. (2012). Mechanisms of skin adherence and invasion by dermatophytes. *Mycoses*, 55(3), 218-223.
- [10] Gnat, S., Nowakiewicz, A., Łagowski, D., & Zięba, P. (2019). Host-and pathogen-dependent susceptibility and predisposition to dermatophytosis. *Journal of medical microbiology*, 68(6), 823-836.
- [11] White, T. C., Oliver, B. G., Gräser, Y., & Henn, M. R. (2008). Generating and testing molecular hypotheses in the dermatophytes. *Eukaryotic cell*, 7(8), 1238-1245.
- [12] Borman, A. M., Campbell, C. K., Fraser, M., & Johnson, E. M. (2007). Analysis of the dermatophyte species isolated in the British Isles between 1980 and 2005 and review of



worldwide dermatophyte trends over the last three decades. *Medical mycology*, 45(2), 131-141.

[13] Degreef, H. (2008). Clinical forms of dermatophytosis (ringworm infection). *Mycopathologia*, 166(5-6), 257-265.

[14] Moskaluk, A. E., & VandeWoude, S. (2022). Current topics in Dermatophyte classification and clinical diagnosis. *Pathogens*, 11(9), 957.

[15] Lipner, S. R., & Scher, R. K. (2019). Onychomycosis: Clinical overview and diagnosis. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 80(4), 835-851.

[16] Peres, N. T. D. A., Maranhão, F. C. A., Rossi, A., & Martinez-Rossi, N. M. (2010). Dermatophytes: host-pathogen interaction and antifungal resistance. *Anais brasileiros de dermatologia*, 85, 657-667.

[17] Ogawa, H., Summerbell, R. C., Clemons, K. V., Koga, T., Ran, Y. P., Rashid, A., ... & Tsuboi, R. (1998). Dermatophytes and host defence in cutaneous mycoses. *Medical mycology*, 36, 166-173.

[18] Martinez-Rossi, N. M., Persinoti, G. F., Peres, N. T., & Rossi, A. (2012). Role of pH in the pathogenesis of dermatophytoses. *Mycoses*, 55(5), 381-387.

[19] Monod, M. (2008). Secreted proteases from dermatophytes. *Mycopathologia*, 166(5-6), 285-294.

[20] García-Romero, M. T., & Arenas, R. (2015). New insights into genes, immunity, and the occurrence of dermatophytosis. *Journal of Investigative Dermatology*, 135(3), 655-657.

[21] Grover, C., & Khurana, A. (2012). Onychomycosis: newer insights in pathogenesis and diagnosis. *Indian journal of dermatology, venereology and leprology*, 78, 263.

[22] Gupta, A. K., Daigle, D., & Carviel, J. L. (2016). The role of biofilms in onychomycosis. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 74(6), 1241-1246.

[23] Gupta, A. K., & Foley, K. A. (2018). Evidence for biofilms in onychomycosis. *Giornale italiano di dermatologia e venereologia: organo ufficiale, Societa italiana di dermatologia e sifilografia*, 154(1), 50-55.

[24] Baumgardner, Dennis J. "Fungal infections from human and animal contact." *Journal of Patient-Centered Research and Reviews* 4, no. 2 (2017): 78.

[25] Hainer, B. L. (2003). Dermatophyte infections. *American family physician*, 67(1), 101-109.

[26] Oninla, O., & Oninla, S. (2016). Superficial mycoses in relation to age and gender. *British Journal of Medicine and Medical Research*, 13(5), 1-10.

- [27] Agarwal, A., Hassanandani, T., Das, A., Panda, M., & Chakravorty, S. (2021). 'Mask tinea': tinea faciei possibly potentiated by prolonged mask usage during the COVID-19 pandemic. *Clinical and Experimental Dermatology*, 46(1), 190-193.
- [28] Dogra, S., & Narang, T. (2017). Emerging atypical and unusual presentations of dermatophytosis in India. *Clinical Dermatology Review*, 1(Suppl 1), S12-S18.
- [29] Wang, R., Huang, C., Zhang, Y., & Li, R. (2021). Invasive dermatophyte infection: a systematic review. *Mycoses*, 64(4), 340-348.
- [30] Lanternier, F., Pathan, S., Vincent, Q. B., Liu, L., Cypowyj, S., Prando, C., ... & Puel, A. (2013). Deep dermatophytosis and inherited CARD9 deficiency. *New England Journal of Medicine*, 369(18), 1704-1714.
- [31] Rouzaud, C., Hay, R., Chosidow, O., Dupin, N., Puel, A., Lortholary, O., & Lanternier, F. (2015). Severe dermatophytosis and acquired or innate immunodeficiency: a review. *Journal of Fungi*, 2(1), 4.
- [32] Chanyachailert, P., Leeyaphan, C., & Bunyaratavej, S. (2023). Cutaneous Fungal Infections Caused by Dermatophytes and Non-Dermatophytes: An Updated Comprehensive Review of Epidemiology, Clinical Presentations, and Diagnostic Testing. *Journal of Fungi*, 9(6), 669.
- [33] Elewski, B. E. (2000). Tinea capitis: a current perspective. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 42(1), 1-20.
- [34] Hay, R. J. (2017). Tinea capitis: current status. *Mycopathologia*, 182(1-2), 87-93.
- [35] Αρβανίτη Κ., Βυζαντιάδης Τ.Α., Γιαννάκη Ε., Πατσατσή Α., Τραγιαννίδης Α. (2019). «Εισαγωγή στην Ιατρική Μυκητολογία. Εργαστηριακή διάγνωση-Κλινικές προακτάσεις», Θεσσαλονίκη: Εκδόσεις University Studio Press.
- [36] Rodríguez-Cerdeira, C., Martínez-Herrera, E., Szepietowski, J. C., Pinto-Almazán, R., Frías-De-León, M. G., Espinosa-Hernández, V. M., ... & Saunte, D. M. (2021). A systematic review of worldwide data on tinea capitis: analysis of the last 20 years. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 35(4), 844-883.
- [37] Bunyaratavej, S., Limphoka, P., Kiratiwongwan, R., & Leeyaphan, C. (2019). Survey of skin and nail fungal infections by subject age among Thai adults and the etiological organisms. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 50(6), 1132-1138.
- [38] Udomphan, P., Bunyaratavej, S., Leeyaphan, C., Matthapan, L., Lertrujivanit, K., & Pattanaprichakul, P. (2019). Review of adult tinea capitis cases presenting to Siriraj hospital, Bangkok, Thailand. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 50(5), 905-911.

- [39] Osman, M., Kasir, D., Rafei, R., Kassem, I. I., Ismail, M. B., El Omari, K., ... & Hamze, M. (2022). Trends in the epidemiology of dermatophytosis in the Middle East and North Africa region. *International journal of dermatology*, 61(8), 935-968.
- [40] Greenwood D., Slack R., Peutherer J, Barer M. (2016). «Ιατρική Μικροβιολογία. Μικροβιακές Λοιμώξεις. Παθογένεια, Ανοσία, Εργαστηριακή Διάγνωση & Θεραπεία», Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης.
- [41] Μαρκοπούλου Ε. (2019). «Επιδημιολογική Διερεύνηση Δερματοφυτίας Τριχωτού Κεφαλής 2015-2017» (Διπλωματική Εργασία), Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών.
- [42] Bontems, O., Fratti, M., Salamin, K., Guenova, E., & Monod, M. (2020). Epidemiology of dermatophytoses in Switzerland according to a survey of dermatophytes isolated in Lausanne between 2001 and 2018. *Journal of Fungi*, 6(2), 95.
- [43] Powell, J., Porter, E., Field, S., O'Connell, N. H., Carty, K., & Dunne, C. P. (2022). Epidemiology of dermatomycoses and onychomycoses in Ireland (2001–2020): A single-institution review. *Mycoses*, 65(7), 770-779.
- [44] de Oliveira Pereira, F., Gomes, S. M., Lima da Silva, S., Paula de Castro Teixeira, A., & Lima, I. O. (2021). The prevalence of dermatophytoses in Brazil: a systematic review. *Journal of Medical Microbiology*, 70(3), 001321.
- [45] Shimoyama, H., & Sei, Y. (2019). 2016 Epidemiological survey of dermatomycoses in Japan. *Medical Mycology Journal*, 60(3), 75-82.
- [46] Cai, W., Lu, C., Li, X., Zhang, J., Zhan, P., Xi, L., ... & Yu, X. (2016). Epidemiology of superficial fungal infections in Guangdong, southern China: a retrospective study from 2004 to 2014. *Mycopathologia*, 181, 387-395.
- [47] Dabas, Y., Xess, I., Singh, G., Pandey, M., & Meena, S. (2017). Molecular identification and antifungal susceptibility patterns of clinical dermatophytes following CLSI and EUCAST guidelines. *Journal of Fungi*, 3(2), 17.
- [48] Baranová, Z., Kampe, T., Dorko, E., & Rimárová, K. (2018). Epidemiological and clinical aspects of dermatophytoses in Eastern Slovakia: a retrospective three-year study. *Central European journal of public health*, 26, S72-S75.
- [49] Kromer, C., Celis, D., Hipler, U. C., Zampeli, V. A., Mößner, R., & Lippert, U. (2021). Dermatophyte infections in children compared to adults in Germany: a retrospective multicenter study in Germany. *JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft*, 19(7), 993-1001.
- [50] Mazza, M., Refojo, N., Davel, G., Lima, N., Dias, N., da Silva, C. M. F. P., & Canteros, C. E. (2018). Epidemiology of dermatophytoses in 31 municipalities of the

province of Buenos Aires, Argentina: A 6-year study. *Revista Iberoamericana de Micología*, 35(2), 97-102.

[51] Rezaei-Matehkolaei, A., Makimura, K., de Hoog, S., Shidfar, M. R., Zaini, F., Eshraghian, M., ... & Mirhendi, H. (2013). Molecular epidemiology of dermatophytosis in Tehran, Iran, a clinical and microbial survey. *Medical mycology*, 51(2), 203-207.

[52] Zamani, S., Sadeghi, G., Yazdinia, F., Moosa, H., Pazooki, A., Ghafarinia, Z., ... & Razzaghi-Abyaneh, M. (2016). Epidemiological trends of dermatophytosis in Tehran, Iran: A five-year retrospective study. *Journal de mycologie medicale*, 26(4), 351-358.

[53] Song, G., Zhang, M., Liu, W., & Liang, G. (2022). Changing face of epidemiology of dermatophytoses in Chinese Mainland: A 30 years nationwide retrospective study from 1991 to 2020. *Mycoses*, 65(4), 440-448.

[54] Carrascal-Correa, D. F., Zuluaga, A., & González, A. (2020). Species distribution of the main aetiologic agents causing skin dermatophytosis in colombian patients: a 23-year experience at a mycological reference center. *Mycoses*, 63(5), 494-499.

[55] Borges, A., Brasileiro, A., Galhardas, C., & Apetato, M. (2018). Tinea faciei in a central Portuguese hospital: A 9-year survey. *Mycoses*, 61(4), 283-285.

[56] Atzori, L., Aste, N., Aste, N., & Pau, M. (2012). Tinea faciei due to *microsporum canis* in children: a survey of 46 cases in the District of Cagliari (Italy). *Pediatric Dermatology*, 29(4), 409-413.

[57] Maraki, S., & Mavromanolaki, V. E. (2016). Epidemiology of Dermatophytoses in Crete, Greece a 5-year Survey. *Medical mycology journal*, 57(4), E69-E75.

[58] Ebrahimi, M., Zarrinfar, H., Naseri, A., Najafzadeh, M. J., Fata, A., Parian, M., ... & Babič, M. N. (2019). Epidemiology of dermatophytosis in northeastern Iran; A subtropical region. *Current medical mycology*, 5(2), 16.

[59] Bunyaratavej, S., Kiratiwongwan, R., Komoltri, C., Lertrujiwanit, K., & Leeyaphan, C. (2022). Predictive equation to identify infection due to anthropophilic or zoophilic dermatophytes based on clinical features and risk factors: A ten-year retrospective study. *Indian Journal of Dermatology, Venereology and Leprology*, 88(3), 416-419.

[60] Alkeswani, A., Duncan, J. R., & Theos, A. (2019). Tinea faciei starting at day two of life. *Pediatric Dermatology*, 36(1), e20-e22.

[61] Degreef, H., & Doncker, P. D. (2000). Fighting fungal infections around the globe: itraconazole in perspective. (*No Title*).

[62] Ito, A., Yamada, N., Kimura, R., Anzawa, K., Mochizuki, T., & Yamamoto, O. (2019). Tinea Barbae due to *Trichophyton mentagrophytes* Contracted from Calves. *Acta Dermato-Venereologica*, 99(10), 925-926.

- [63] Kuruvella, T., & Pandey, S. (2020). Tinea Barbae.
- [64] Takeshima, R., Asahina, Y., Yaguchii, T., & Sato, T. (2020). Tinea barbae due to *Trichophyton rubrum* successfully treated using oral fosravuconazole l-lysine ethanolate. *The Journal of dermatology*, 47(7), e254-e255.
- [65] Kirsten, H., Haiduk, J., Nenoff, P., Uhrlaß, S., Ziemer, M., & Simon, J. C. (2019). Tinea barbae profunda due to *Trichophyton mentagrophytes*: Case report and review. *Der Hautarzt*, 70, 601-611.
- [66] Müller, V. L., Kappa-Markovi, K., Hyun, J., Georgas, D., Silberfarb, G., Paasch, U., ... & Schaller, J. (2021). Tinea capitis et barbae caused by *Trichophyton tonsurans*: a retrospective cohort study of an infection chain after shavings in barber shops. *Mycoses*, 64(4), 428-436.
- [67] Baeza-Hernández, G., de la Soledad Vallejo-Ruiz, M., Rubio-Aguilera, R. F., Romero-Maté, A., & Martínez-Morán, C. (2023). An unexpected dermatophyte? Two remarkable cases of tinea barbae by *Trichophyton benhamiae*. *Dermatology Practical & Conceptual*, 13(1).
- [68] Ilkit, M., Durdu, M., & Karakaş, M. (2012). Majocchi's granuloma: a symptom complex caused by fungal pathogens. *Sabouraudia*, 50(5), 449-457
- [69] Ely, J. W., Rosenfeld, S., & Stone, M. S. (2014). Diagnosis and management of tinea infections. *American family physician*, 90(10), 702-711.
- [70] Castellanos, J., Guillén-Flórez, A., Valencia-Herrera, A., Toledo-Bahena, M., Ramírez-Cortés, E., Toussaint-Caire, S., ... & Bonifaz, A. (2021). Unusual inflammatory tinea infections: Majocchi's granuloma and deep/systemic dermatophytosis. *Journal of Fungi*, 7(11), 929.
- [71] Er, Y. X., Lee, S. C., Than, L. T. L., Muslim, A., Leong, K. F., Kwan, Z., ... & Lim, Y. A. L. (2022). Tinea imbricata among the indigenous communities: Current global epidemiology and research gaps associated with host genetics and skin microbiota. *Journal of Fungi*, 8(2), 202.
- [72] Zalewski, A., Goldust, M., & Szepietowski, J. C. (2022). Tinea gladiatorum: Epidemiology, clinical aspects, and management. *Journal of Clinical Medicine*, 11(14), 4066.
- [73] Hiruma, J., Ogawa, Y., & Hiruma, M. (2015). *Trichophyton tonsurans* infection in Japan: Epidemiology, clinical features, diagnosis and infection control. *The Journal of Dermatology*, 42(3), 245-249.
- [74] Romano, C., Maritati, E., & Gianni, C. (2006). Tinea incognito in Italy: a 15-year survey. *Mycoses*, 49(5), 383-387.

- [75] Seebacher, C., Bouchara, J. P., & Mignon, B. (2008). Updates on the epidemiology of dermatophyte infections. *Mycopathologia*, 166, 335-352.
- [76] Imwidthaya, S., Thianprasit, M. E. R. A. N. I., & Omcharoen, V. I. B. O. O. N. (1987). Prevalence of dermatophytosis in Siriraj Hospital. *Journal of the Medical Association of Thailand= Chotmai het thangphaet*, 70(6), 331-334.
- [77] Cruz, R., & Carvajal, L. (2018). Frequency of Epidermophyton floccosum in isolated dermatophyte laboratory from the Region of Valparaiso, Chile. Time frame: 1990-2010. *Revista Chilena de Infectologia: Organo Oficial de la Sociedad Chilena de Infectologia*, 35(3), 262-265.
- [78] Kovitwanichkanont, T., & Chong, A. H. (2019). Superficial fungal infections. *Australian Journal of General Practice*, 48(10), 706-711.
- [79] Mizumoto, J. (2021). Two feet-one hand syndrome. *Cureus*, 13(12).
- [80] Chamorro, M. J., & House, S. A. (2020). Tinea Manuum.
- [81] Errichetti, E., & Stinco, G. (2018). Dermoscopy in tinea manuum. *Anais brasileiros de dermatologia*, 93, 447-448.
- [82] Rhee, D. Y., Kim, M. S., Chang, S. E., Lee, M. W., Choi, J. H., Moon, K. C., ... & Choi, J. S. (2009). A case of tinea manuum caused by Trichophyton mentagrophytes var. erinacei: the first isolation in Korea. *Mycoses*, 52(3), 287-290.
- [83] Kim, J., Tsuchihashi, H., Hiruma, M., Kano, R., & Ikeda, S. (2018). Tinea corporis due to Trichophyton erinacei probably transmitted from a hedgehog the second case report from Japan. *Medical Mycology Journal*, 59(4), E77-E79.
- [84] Choi, E., Huang, J., Chew, K. L., Jaffar, H., & Tan, C. (2018). Pustular tinea manuum from Trichophyton erinacei infection. *JAAD case reports*, 4(6), 518-520.
- [85] Weishaupt, J., Kolb-Mäurer, A., Lempert, S., Nenoff, P., Uhrlaß, S., Hamm, H., & Goebeler, M. (2014). A different kind of hedgehog pathway: tinea manus due to Trichophyton erinacei transmitted by an African pygmy hedgehog (Atelerix albiventris). *Mycoses*, 57(2), 125-127.
- [86] Perrier, P., & Monod, M. (2015). Tinea manuum caused by Trichophyton erinacei: first report in Switzerland. *International Journal of Dermatology*, 54(8), 959-960.
- [87] Phaitoonwattanakit, S., Leeyaphan, C., Bunyaratavej, S., & Chinhiran, K. (2019). Trichophyton erinacei onychomycosis: The first to evidence a proximal subungual onychomycosis pattern. *Case Reports in Dermatology*, 11(2), 198-203.
- [88] Ilkit, M., & Durdu, M. (2015). Tinea pedis: the etiology and global epidemiology of a common fungal infection. *Critical reviews in microbiology*, 41(3), 374-388.

- [89] Field, L. A., & Adams, B. B. (2008). Tinea pedis in athletes. *International journal of dermatology*, 47(5), 485-492.
- [90] Leung, A. K., Lam, J. M., Leong, K. F., & Hon, K. L. (2020). Tinea corporis: an updated review. *Drugs in context*, 9.
- [91] Sigurgeirsson, B., & Baran, R. (2014). The prevalence of onychomycosis in the global population—a literature study. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 28(11), 1480-1491.
- [92] de Berker, D. (2009). Fungal nail disease. *New England Journal of Medicine*, 360(20), 2108-2116.
- [93] Limphoka, P., Bunyaratavej, S., & Leeyaphan, C. (2021). Fingernail onychomycosis caused by *Microsporum canis* in a teenager. *Pediatric Dermatology*, 38(2), 524-525.
- [94] Piraccini, B. M., & Alessandrini, A. (2015). Onychomycosis: a review. *Journal of Fungi*, 1(1), 30-43.
- [95] Faergemann, J., & Baran, R. (2003). Epidemiology, clinical presentation and diagnosis of onychomycosis. *British Journal of Dermatology*, 149(s65), 1-4.
- [96] Kanbe, T. (2008). Molecular approaches in the diagnosis of dermatophytosis. *Mycopathologia*, 166(5-6), 307-317.
- [97] Μιχαήλογλου-Φραγκούλη Ε. (2009). «Επιτολής μυκητιάσεις. Εργαστηριακή διάγνωση», Αθήνα: Εκδόσεις Καύκας.
- [98] Al Aboud, D. M., & Gossman, W. (2019). Wood's Light.
- [99] Kidd, S. E., & Weldhagen, G. F. (2022). Diagnosis of dermatophytes: from microscopy to direct PCR. *Microbiology Australia*, 43(1), 9-13.
- [100] Marvin, L. F., Roberts, M. A., & Fay, L. B. (2003). Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry in clinical chemistry. *Clinica chimica acta*, 337(1-2), 11-21.
- [101] Murray, P. R. (2012). What is new in clinical microbiology—microbial identification by MALDI-TOF mass spectrometry: a paper from the 2011 William Beaumont Hospital Symposium on molecular pathology. *The journal of molecular diagnostics*, 14(5), 419-423.
- [102] L'Ollivier, C., & Ranque, S. (2017). MALDI-TOF-based dermatophyte identification. *Mycopathologia*, 182(1-2), 183-192.
- [103] Sushmita Baniya, «Dermatophytes: Tinea and Lab Diagnosis», [Ηλεκτρονικό]. Available: <https://microbeonline.com/dermatophytes-tinea-and-lab-diagnosis/>. [Πρόσβαση 30 December 2023].

- [104] Tsuboi, R., Mochizuki, T., Ito, H., Kawano, S., Suzuki, Y., Naka, W., ... & Maruyama, R. (2021). Validation of a lateral flow immunochromatographic assay for tinea unguium diagnosis. *The Journal of Dermatology*, 48(5), 633-637.
- [105] Paugam, A., & Challier, S. (2022, June). Dermatophytic onychia: Effectiveness of rapid immunochromatographic diagnostic testing directly on samples compared to culture. In *Annales de Dermatologie et de Vénéréologie* (Vol. 149, No. 2, pp. 108-111). Elsevier Masson.
- [106] Ishida, H., Noriki, S., & Mochizuki, T. (2022). Diagnostic clue for dermatophytoma using the dermatophyte test strip. *The Journal of Dermatology*.
- [107] Mareschal, A., Scherer, E., Lihoreau, T., Bellanger, A. P., Millon, L., & Aubin, F. (2021). Diagnosis of toenail onychomycosis by an immunochromatographic dermatophytes test strip. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 35(6), e367-e369.
- [108] Tsunemi, Y., & Hiruma, M. (2016). Clinical study of Dermatophyte Test Strip, an immunochromatographic method, to detect tinea unguium dermatophytes. *The Journal of Dermatology*, 43(12), 1417-1423
- [109] Peano, A., Rambozzi, L., & Gallo, M. G. (2005). Development of an enzyme-linked immunosorbant assay (ELISA) for the serodiagnosis of canine dermatophytosis caused by *Microsporum canis*. *Veterinary dermatology*, 16(2), 102-107.
- [110] Santana, A. E., Taborda, C. P., Severo, J. S., Rittner, G. M. G., Muñoz, J. E., Larsson Jr, C. E., & Larsson, C. E. (2018). Development of enzyme immunoassays (ELISA and Western blot) for the serological diagnosis of dermatophytosis in symptomatic and asymptomatic cats. *Medical Mycology*, 56(1), 95-102.
- [111] Moriarty, B., Hay, R., & Morris-Jones, R. (2012). The diagnosis and management of tinea. *Bmj*, 345.
- [112] Gupta, A. K., Venkataraman, M., & Quinlan, E. M. (2021). New antifungal agents and new formulations against dermatophytes. *Dermatophytes and Dermatophytoses*, 433-471.
- [113] Lipner, S. R., & Scher, R. K. (2019). Onychomycosis: treatment and prevention of recurrence. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 80(4), 853-867.
- [114] Leung, A. K., Lam, J. M., Leong, K. F., Hon, K. L., Barankin, B., Leung, A. A., & Wong, A. H. (2020). Onychomycosis: An Updated Review. *Recent Patents on Inflammation & Allergy Drug Discovery*, 14(1), 32-45.



- [115] Jartarkar, S. R., Patil, A., Goldust, Y., Cockerell, C. J., Schwartz, R. A., Grabbe, S., & Goldust, M. (2021). Pathogenesis, immunology and management of dermatophytosis. *Journal of Fungi*, 8(1), 39.
- [116] Gupta, A. K., Stec, N., Summerbell, R. C., Shear, N. H., Piguet, V., Tosti, A., & Piraccini, B. M. (2020). Onychomycosis: a review. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 34(9), 1972-1990.
- [117] Brillowska-Dabrowska, A., Saunte, D. M., & Arendrup, M. C. (2007). Five-hour diagnosis of dermatophyte nail infections with specific detection of *Trichophyton rubrum*. *Journal of clinical microbiology*, 45(4), 1200-1204.
- [118] Kondori, N., Abrahamsson, A. L., Ataollahy, N., & Wennerås, C. (2010). Comparison of a new commercial test, Dermatophyte-PCR kit, with conventional methods for rapid detection and identification of *Trichophyton rubrum* in nail specimens. *Medical Mycology*, 48(7), 1005-1008.
- [119] Wakamoto, H., & Miyamoto, M. (2016). Development of a new dermatophyte-detection device using immunochromatography. *J Med Diagn Meth*, 5(216), 2.
- [120] Weinberg, J. M., Koestenblatt, E. K., Tutrone, W. D., Tishler, H. R., & Najarian, L. (2003). Comparison of diagnostic methods in the evaluation of onychomycosis. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 49(2), 193-197.
- [121] Pihet, M., & Le Govic, Y. (2017). Reappraisal of conventional diagnosis for dermatophytes. *Mycopathologia*, 182(1-2), 169-180.
- [122] Heckler, I., Sabalza, M., Bojmehrani, A., Venkataraman, I., & Thompson, C. (2023). The need for fast and accurate detection of dermatomycosis. *Medical Mycology*, 61(5), myad037.
- [123] Campbell, A. W., Anyanwu, E. C., & Morad, M. (2004). Evaluation of the drug treatment and persistence of onychomycosis. *The Scientific World Journal*, 4, 760-777.
- [124] Begum, J., Mir, N. A., Lingaraju, M. C., Buyamayum, B., & Dev, K. (2020). Recent advances in the diagnosis of dermatophytosis. *Journal of basic microbiology*, 60(4), 293-303.
- [125] Ghannoum, M., Mukherjee, P., Isham, N., Markinson, B., Rosso, J. D., & Leal, L. (2018). Examining the importance of laboratory and diagnostic testing when treating and diagnosing onychomycosis. *International journal of dermatology*, 57(2), 131-138.
- [126] Higashi, Y., Miyoshi, H., Takeda, K., Saruwatari, H., Kubo, H., Sakaguchi, I., ... & Kanekura, T. (2012). Evaluation of a newly-developed immunochromatography strip test for diagnosing dermatophytosis. *International Journal of Dermatology*, 51(4), 406-409.

[127] Noriki S, Ishida H. Production of an anti-dermatophyte monoclonal antibody and its application: immunochromatographic detection of dermatophytes. *Med Mycol* 2016;54:808–15.

[128] Tsunemi, Y., Takehara, K., Miura, Y., Nakagami, G., Sanada, H., & Kawashima, M. (2014). Screening for tinea unguium by Dermatophyte Test Strip. *British Journal of Dermatology*, 170(2), 328-331.

[129] Tsunemi, Y., Takehara, K., Miura, Y., Nakagami, G., Sanada, H., & Kawashima, M. (2017). Specimens processed with an extraction solution of the Dermatophyte Test Strip can be used for direct microscopy. *British Journal of Dermatology*, 177(3), e50-e51.

[130] Tsunemi, Y., Takehara, K., Miura, Y., Nakagami, G., Sanada, H., & Kawashima, M. (2015). Diagnosis of tinea pedis by the Dermatophyte Test Strip. *British Journal of Dermatology*, 173(5), 1323-1324.

## Παραρτήματα

### Κατάλογος εικόνων

---

- Εικόνα 1** Τα στάδια της παθογένειας της λοίμωξης από δερματόφυτα στο δέρμα
- Εικόνα 2** Ταξινόμηση των πιο κοινών δερματοφύτων που προκαλούν λοιμώξεις σε ανθρώπους και ζώα
- Εικόνα 3** Σχηματική αναπαράσταση των ειδών τριχικού παρασιτισμού στην *tinea capitis* και τα υπεύθυνα παθογόνα δερματόφυτα
- Εικόνα 4** Κηρίο του Κέλσου από *M. canis* σε νεαρό παιδί
- Εικόνα 5** Φλεγμονώδης *tinea faciei* από *T. mentagrophytes*
- Εικόνα 6** *Tinea barbae* από *T. mentagrophytes* με βλατίδες και φλυκταινίδια
- Εικόνα 7** Τυπική εικόνα «ringworm» από *M. canis*
- Εικόνα 8** *Tinea cruris* στη βουβωνική χώρα
- Εικόνα 9** *Tinea manuum* από *T. rubrum* στην επιφάνεια των παλαμών
- Εικόνα 10** Μεσοδακτυλικός (αριστερά) και υπερκερατωσικός (δεξιά) τύπος *tinea pedis*
- Εικόνα 11** Κλινικές μορφές *tinea unguium*. Α) Περιφερική-άπω πλάγια ονυχομυκητίαση, Β) επιφανειακή ονυχομυκητίαση, Γ) εγγύς υπονύχια ονυχομυκητίαση, Δ) ενδονύχια ονυχομυκητίαση και Ε) ολική δυστροφική ονυχομυκητίαση
- Εικόνα 12** Ταξινόμηση της δερματοφυτίας στον άνθρωπο μαζί με την ανατομική θέση της λοίμωξης (τα όργανα ή τους ιστούς) και τους πιο διαδεδομένες δερματοφυτικούς μύκητες που την προκαλούν. (a): ανθρωπόφιλος, (z): ζωόφιλος, (g): γεωφίλος
- Εικόνα 13** Συλλογή Α) λεπιών δέρματος από την παρυφή της βλάβης με τη χρήση ξέστρου, Β) δείγματος τριχωτού κεφαλής με οδοντόβουρτσα και Γ) ξεσμάτων όνυχος από το βαθύτερο σημείο της κοίτης σε περιστατικό περιφερικής-άπω πλάγιας ονυχομυκητίασης
- Εικόνα 14** Εικόνα 14. Κηρίο του Κέλσου από *M. canis*. Α) Κλινική εικόνα της πυώδους φλεγμονώδους πλάκας με αλοπεκία και Β) εκπομπή
-

---

κυανοπράσινου φθορισμού κατά την εξέταση με λυχνία Wood

- Εικόνα 15** Μικροσκόπηση νωπών παρασκευασμάτων ονύχων που έχουν προσβληθεί από δερματόφυτα (αντικειμενικός φακός 40x). Α) Διαύγαση με KOH 20%, Β) κατεργασία με χρώση Chlorazol Black E και Γ) κατεργασία με φθορίζουσα χρωστική Calcofluor White
- Εικόνα 16** Ανάπτυξη δερματοφυτικών και σαπροφυτικών μυκήτων σε DTM
- Εικόνα 17** Μακροσκοπική και μικροσκοπική μορφολογία των κυριότερων δερματοφύτων
- Εικόνα 18** Σύγκριση διαγνωστικών μεθόδων για την ανίχνευση δερματοφύτων
- Εικόνα 19** Ενδεδειγμένη δοσολογία και διάρκεια της συστηματικής αντιμυκητικής θεραπείας για την αντιμετώπιση δερματοφυτίας
- Εικόνα 20** Φαρμακοτεχνική μορφή, δοσολογία και διάρκεια της τοπικής αντιμυκητικής θεραπείας για την αντιμετώπιση δερματοφυτίας
- Εικόνα 21** Σχηματική αναπαράσταση της ροής εργασίας για την ηλεκτροφόρηση των PCR προϊόντων σε πηκτή αγαρόζης 2%
- Εικόνα 22** Ηλεκτροφορητικός έλεγχος PCR προϊόντων σε πηκτή αγαρόζης 2% για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων της δοκιμασίας Dermatophyte PCR Kit. M: δείκτης μοριακών βαρών, 1: γενωμικό δερματοφυτικό DNA, 2: γενωμικό *T. rubrum* DNA, 3 και 4: δείγματα θετικά για *T. rubrum*, 5: δείγμα θετικό για δερματόφυτο, 6 και 7: δείγματα αρνητικά για δερματόφυτο
- Εικόνα 23** Σχηματική αναπαράσταση της ανοσοχρωματογραφικής ταινίας που χρησιμοποιείται στη δοκιμασία DTU. SP: περιοχή προσρόφησης του δείγματος, RP: περιοχή που περιέχει το κύριο συστατικό της δοκιμασίας, DP: περιοχή ανίχνευσης, AP: περιοχή απορρόφησης της περίσσειας υγρού
- Εικόνα 24** Αρχή μεθόδου της ανίχνευσης δερματοφύτων με την ανοσοχρωματογραφική δοκιμασία DTU
- Εικόνα 25** Σχηματική αναπαράσταση της ροής εργασίας της ανοσοχρωματογραφικής δοκιμασίας DTU
- Εικόνα 26** Ερμηνεία των αποτελεσμάτων της ανοσοχρωματογραφικής δοκιμασίας DTU. CL: ζώνη ελέγχου, TL: ζώνη εξέτασης
-

- Εικόνα 27** Άμεση μικροσκοπική εξέταση (αντικειμενικός φακός 40x) ξεσμάτων όνυχος μετά την κατεργασία τους με διάλυμα χρωστικής Blankophor P σε KOH 20%. Στις καλλιέργειες των δειγμάτων απομονώθηκε *T. mentagrophytes* (αριστερά) και *T. rubrum* (δεξιά) (εικόνες από τη συλλογή του Τμήματος Μυκητολογίας, Εργαστήριο Κλινικής Μικροβιολογίας, Π.Γ.Ν. «Αττικόν»).
- Εικόνα 28** Ηλεκτροφορητικός έλεγχος PCR προϊόντων για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων της δοκιμασίας Dermatophyte PCR Kit που διενεργήθηκε στο πλαίσιο της παρούσας μελέτης. L: δείκτης μοριακών βαρών, PC1: γενωμικό δερματοφυτικό DNA, PC2: γενωμικό *T. rubrum* DNA, NC: αρνητικός μάρτυρας ελέγχου, 1, 4, 5, 9, 11-14, 21, 22, 30, 32, 33, 38, 40, 41, 46, 47, 51, 55, 57, 65, 72 και 75: δείγματα θετικά για *T. rubrum*, 2, 34 και 54: δείγματα θετικά για δερματόφυτο, 16, 35, 37, 49, 66-68 και 8: αναστολή της PCR (μη ενίσχυση του IC)
- Εικόνα 29** Ερμηνεία αποτελεσμάτων της ανοσοχρωματογραφικής δοκιμασίας DTU. Δείγματα 4, 21, 34, 38, 50: θετικά για δερματόφυτο (εμφάνιση αχνής ή έντονης μωβ γραμμής στη TLZ και ροζ γραμμής στη CLZ), δείγματα 3, 33, 40, 67, 84: αρνητικά για δερματόφυτο (μη εμφάνιση μωβ γραμμής στη TLZ, εμφάνιση ροζ γραμμής στη CLZ)
-

## Κατάλογος πινάκων

---

- Πίνακας 1** Συστατικά της αντίδρασης PCR και απαιτούμενοι όγκοι τους για τη διεξαγωγή της δοκιμασίας DermatoPhyte PCR Kit
- Πίνακας 2** Συγκεντρωτικός πίνακας των αποτελεσμάτων που προέκυψαν κατά τη διενέργεια της άμεσης μικροσκόπησης, της καλλιέργειας και της δοκιμασίας DermatoPhyte PCR Kit
- Πίνακας 3** Συγκεντρωτικός πίνακας των αποτελεσμάτων που προέκυψαν κατά τη διενέργεια της άμεσης μικροσκόπησης, της καλλιέργειας, της δοκιμασίας DermatoPhyte PCR Kit και της δοκιμασίας DTU
-