

ASL N. 4 L'Aquila Ospedale San Salvatore	Procedura Operativa Standard	Rev 1.0
Dip. Patologia Clinica U.O. Medicina di Laboratorio	Esame colturale peli e squame per la ricerca dei dermatofiti	Ott. 2002
Settore Batteriologia tel 0862 368688		

1. Principio del test e sinonimi

Semina dello “scraping” (=grattatura) di pelle , unghie o di frammenti di peli su appositi terreni per la diagnosi microbiologica di dermatofitosi .Esame micologico della cute e annessi.Esame colturale per la ricerca di dermatofiti.

2. Applicazione clinica

Pur se la diagnosi clinica di dermatofitosi , nei casi conclamati, non dovrebbe presentare particolari difficoltà, tuttavia la presentazione clinica non è sempre tipica o addirittura è modificata nell’aspetto dall’uso di terapie incongrue a base di corticosteroidi. Pertanto l’esame micologico è importante oltre che per la conferma del sospetto diagnostico, anche perché l’identificazione di specie fornisce utili informazioni dal punto di vista epidemiologico.

3. Campione, conservazione e trasporto

E’ importante il corretto prelievo del campione che presenta delle difficoltà nel raggiungere le ife vive soprattutto nel caso di un campione ungueale.Prima di effettuare il prelievo si disinfetta e sgrassa la pelle con alcool isopropilico 70%.Si usa un bisturi sterile (nel dorso) o anche un vetrino sterile sterilizzato alla fiamma di un becco Bunsen.In particolare:

a) Raccolta delle squame della pelle

Raccogliere le squame alla periferia della lesione, conducendo la “grattatura” dal centro verso la periferia.Dove non sia evidente il margine di avanzamento della lesione , grattare tutta la superficie sospetta.

Le squame vanno lasciate cadere o su una scatola Petri sterile vuota o su un terreno agarizzato idoneo alla crescita dei dermatofiti.

b) Raccolta dei capelli e dei peli

Elaborazione	Verifica		Approvazione
Settore:Batteriologia Nome: Gianfranco Bruno Firma	Sezione: Nome: Firma.	Sezione: Nome: Firma.	Dirigente II liv.: Nome: Firma.

Bisogna raccogliere con una pinza i capelli rotti , quelli opachi e fragili e le squame alla periferia della chierica.Inoltre i capelli raccolti possono essere sottoposti alla fluorescenza della lampada di Wood:i capelli malati emettono una fluorescenza di colore verde .La tecnica è usata dal dermatologo che espone i capelli alla luce UV della lampada di Wood:in questi casi verranno prelevati proprio i capelli fluorescenti.Anche la grattatura della periferia della chierica è indicata per la raccolta del materiale.

c) Unghie

E' il prelievo piu' difficile in quanto i funghi si localizzano nel punto di contatto fra la porzione dell'unghia sana e di quella malata sotto la lamina ungueale.Nella onicomicosi sub ungueale distale e laterale le ife vive sono localizzate nello strato ventrale della lamina, in prossimità delle zone cheratiniche sane.Quindi va tagliata per prima cosa la parte malata della unghia e con un bisturi o vetrino sterile si procede al trattamento dell'unghia a contatto con la porzione sana:è questo il campione cheratinico idoneo all'esame micologico.Nella onicomicosi bianca superficiale il prelievo si presenta facile , dovendosi grattare le zone biancastre dello strato dorsale della lamina ungueale.Laddove l'unghia non è scollata il prelievo è piu' complicato in quanto il raggiungimento della porzione ventrale della lamina è di difficile esecuzione.Nella onicomicosi distrofica primaria è sufficiente asportare una qualsiasi porzione della lamina , essendo questa lamina solitamente tutta parassitata.

Conservazione

Le squame e gli annessi cutanei possono essere conservati per molti giorni, prima di essere inviati in laboratorio per gli esami micologici.La conservazione va eseguita in contenitori sterili (contenitore per urinocoltura, piastra di agar Petri vuota o anche fra due vetrini sigillati).

4. Standard , Controlli, Reagenti

DERMATOSLIDE Biolife®

Dermatoslide si compone di 2 terreni:

Agar 1: DTM “Dermatophyte Test medium” o Terreno di Taplin modificato per la messa in evidenza dei dermatofiti, rileva la reazione dell'ureasi con viraggio del terreno a rosso perché contiene rosso fenolo come indicatore di pH. Contiene cicloeximide che inibisce la crescita dei funghi filamentosi contaminanti, ma non quella dei dermatofiti.Oltre il 97% dei dermatofiti viene identificato con questo medium.

Agar 2: Terreno maltosio per la messa in evidenza dei lieviti e muffe contaminanti.E' un terreno acidificato per inibire la crescita dei batteri.

AGAR SABOURAUD +Caf

Elaborazione	Verifica		Approvazione
Settore:Batteriologia Nome: Gianfranco Bruno Firma	Sezione: Nome: Firma.	Sezione: Nome: Firma.	Dirigente II liv.: Nome: Firma.

Non è particolarmente selettivo in quanto su di esso possono svilupparsi sia funghi filamentosi contaminanti, sia alcuni batteri e sia lieviti presenti nel materiale clinico come saprofiti. Ma è il terreno di riferimento per la morfologia dei dermatofiti che varia al variare del tipo di terreni.

5. Strumentazione

Non applicabile

6. Procedimento dettagliato

1) Esame colturale

Preparazione e prelevamento dei campioni da analizzare

a) Pelle

Prima di prelevare le scaglie, pulire la parte cutanea affetta con alcool etilico o alcool isopropilico al 70%. Il prelevamento dei campioni si fa con strumenti sterili (bisturi o vetrino sterili). Prelevare sulle lesioni secche e desquamanti le scaglie grattando con un bisturino verso la zona di contatto sana. I bisturini usati e gettati possono facilmente danneggiare la pelle (è preferibile usare il dorso della lama). Grattare completamente l'area interessata e in profondità raccogliere più materiale possibile! Evitare di raccogliere le scaglie più spesse che non vanno usate come campioni. Nel caso di processi infiammatori della pelle con presenza di vescicole, togliere le vescicole con forbicette e pinzette. Esaminare il contenuto delle vescicole e se possibile le scaglie prelevate in prossimità. Sulle lesioni infiltrate o granulomatose, effettuare il prelievo possibilmente in profondità e nelle pliche cutanee con un cucchiaino appuntito o un bisturi per vaccinazione. Depositare il campione su carta da filtro o direttamente sullo slide o su capsula Petri vuota.

Dopo avere fatto questo si utilizza un secondo Dermato-slide per contatto diretto, a cominciare dall'agar 1.

b) Peli

Staccare le radici dei peli con una pinzetta. I peli infetti cadono e si staccano più facilmente di quelli sani. Se gli esami sono effettuati alla luce della lampada di Wood, prendere solo i peli fluorescenti, anche se non sembrano patologici a luce normale. Se si vedono i punti neri sollevare il capello dal bulbo usando un lato del bisturi. Non tagliare il capello da usare come campione.

Elaborazione	Verifica		Approvazione
Settore: Batteriologia Nome: Gianfranco Bruno Firma	Sezione: Nome: Firma.	Sezione: Nome: Firma.	Dirigente II liv.: Nome: Firma.

c) Unghie

Si distinguono due tipi di infezioni delle unghie:

a) infezione sotto ungueale:

Togliere con una tronchese la parte distale dell'unghia scollata. Grattare fra la parte malata e l'inizio di quella sana. Nel caso di una grave onicomicosi totale distrofica, tutte le parti grossolane deformate sono rimosse attentamente con le forbici, lime, o bisturi. Pezzi di unghia sono raccolti dal letto ungueale.

b) infezione superficiale:

Prelevare dei campioni più o meno fini sul dorso ungueale. Non effettuare il test con frammenti di unghie estratte. Il miglior modo di prelievo è l'abrasione.

Semina

1-Controllo visivo: Effettuare un controllo visivo della superficie dell'agar lasciando il dermatoslido chiuso. Le superfici secche o contaminate devono essere eliminate.

2-Raccolta del campione con un tampone o una pinzetta: Il campione deve essere ripartito in maniera uniforme sulle due superfici agarizzate (cominciando dall'agar 1) con l'aiuto di un tampone sterile o con una pinzetta. Pressare le parti più grandi contro l'agar con la pinzetta per ottenere un buon contatto fra il campione e la superficie dell'agar. Usare lo slide anche con la tecnica della replica.

3-Incubare. Incubare il dermatoslido a 25-30°C da un minimo di 10 giorni fino a un massimo di un mese. Osservare ogni giorno la superficie dell'agar per segni di crescita e cambiamenti di colore dell'agar 1 (viraggio al rosso).

Interpretazione:

Agar 1: La crescita dei dermatofiti conduce a un cambiamento di colore del mezzo sotto le colonie dal **giallo** al **rosso**, anche quando le colonie sono appena visibili. Con la crescita il colore del mezzo diventerà rosso e un micelio bianco diventerà visibile. Il campione è negativo se nessuna crescita si rende visibile dopo l'incubazione. Alcune muffe saprofiti contaminanti possono altresì crescere sull'agar 1. In questo caso le colonie e il micelio appaiono prima del cambiamento del colore. Alcuni lieviti cicloeximide resistenti possono altresì produrre un cambiamento di colore del mezzo. Si differenziano chiaramente dal fatto che formano colonie lisce senza micelio.

Agar 2: Tutti i lieviti e funghi crescono in questo mezzo maltosato. Comunque se non c'è crescita in agar 1 ma colonie lisce in agar 2 (agar malto), i patogeni sono lieviti cicloeximide sensibili (*Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei*, *Torulopsis glabrata* e altri)

Tranne ove si sospetti una infezione sostenuta da *Trichophyton verrucosum* (specie zoofila responsabile del maggior numero di dermatofitosi dei bovini), che si sviluppa bene a 37°C, in

Elaborazione	Verifica		Approvazione
Settore: Batteriologia Nome: Gianfranco Bruno Firma	Sezione: Nome: Firma.	Sezione: Nome: Firma.	Dirigente II liv.: Nome: Firma.

tutti gli altri casi l'incubazione si effettua a 25-27°C o a temperatura ambiente da 10 giorni a 30 giorni. Osservare le colture ogni giorno.

Molte delle muffe isolate, si comportano solo come contaminanti dell'unghia e dei tessuti peri ungueali, non essendo in grado di esplicare alcun ruolo patogeno.

Esame micologico diretto

Si tratta di un esame semplice e poco costoso. Permette una diagnosi presuntiva di dermatofitosi in attesa dell'esame colturale. Le squame, i frammenti di unghia e peli non si possono osservare direttamente al microscopio. Si ricorre alla chiarificazione del materiale. I pezzi più grandi vanno sminuzzati ulteriormente. Si pone una goccia di soluzione chiarificante (per esempio KOH al 10%-40%) su di un vetrino portaoggetti, vi si immergono i frammenti piccoli e si ricopre con un vetrino copriaoggetto. Ai liquidi chiarificanti possono essere aggiunti dei coloranti. L'ideale è procurarsi il Blu di lattofenolo sostanza chiarificante e colorante. La soluzione chiarificante va fatta agire per almeno 30 minuti. Il vetrino può essere lasciato anche in termostato per qualche ora. I dermatofiti si riconoscono per la presenza di ife settate ialine.

Identificazione dei dermatofiti:

GENERE	MACROCONIDIA	MICROCONIDIA	ALTRO	SPECIE PRINCIPALI
TRICHOPHYTON	Assenti o rari, lisci, solitamente a parete sottile da 1 a 12 setti, singoli o in clusters. Possono essere presenti le clamidospore.	Numerosi, globosi, piriformi o clavati, sessili o peduncolati, singoli o riuniti in grappoli.	Ife a spirali, ife a candeliere, ife a racchetta	<i>T. mentagrophytes</i> <i>Trichophyton rubrum</i> <i>T. violaceum</i> <i>T. tonsurans</i>
EPIDERMOPHYTON	Presenti in grappoli, clavati e lisci	assenti		<i>E. floccosum</i> è l'unica specie patogena per l'uomo
MICROSPORUM	Presenti. Hanno pareti rugose asperulate, echinulate o verrucose. I setti vanno da 1 a 15	rare		<i>M. canis</i> <i>M. audouinii</i> <i>M. gypseum</i>

Per la corretta identificazione della specie di dermatofiti si fa riferimento ai testi di Micologia umana considerando che il 90% delle specie che si rilevano in Italia appartengono a

Elaborazione	Verifica		Approvazione
Settore: Batteriologia Nome: Gianfranco Bruno Firma	Sezione: Nome: Firma.	Sezione: Nome: Firma.	Dirigente II liv.: Nome: Firma.

Microsporum canis, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum* la cui corretta identificazione pertanto deve essere assolutamente necessaria.

Ricordiamo brevemente di distinguere :

- 1) la morfologia della colonia
- 2) il reverse o retro su piastra che evidenzia la eventuale produzione di pigmenti
- 3) il colore della colonia

Per l'esame microscopico prelevare pezzi di colonia fra il centro e la periferia. Si pone in un vetrino portaoggetti, si ricopre con un vetrino coprioggetto e si scalda l'agar per farlo sciogliere. Ha molti limiti questa tecnica perché si rompe facilmente la caratteristica disposizione delle spore.

Tecnica dello scotch: Si preleva il micelio aereo della colonia appoggiandovi sopra, dalla parte adesiva, un pezzo di nastro adesivo. Si pone su un vetrino portaoggetti su cui è stata depositata una goccia di blu di lattofenolo che colora le ife di blu. Si copre con un vetrino coprioggetto e si osserva al microscopio.

Coltura su vetrino: è opportuno usare dei terreni che favoriscano la fruttificazione delle diverse specie di dermatofiti. Si appoggiano due bastoncini di legno al fondo di una piastra Petri. Si pone un vetrino portaoggetti. Si taglia con un bisturi sterile un pezzo di terreno all'Agar di forma quadrata che verrà deposto al centro del vetrino. Si inoculano ai 4 lati del blocchetto di Agar piccole porzioni della colonia del fungo da studiare prelevate nella zona intermedia della colonia. Si appoggia un vetrino di vetro riscaldato che funge da coprioggetto e inoltre fa fondere l'agar. Si aggiungono 5 mL di acqua distillata sterile sul fondo della piastra. Si chiude la piastra e si incuba a temperatura ambiente. Quando la maturazione appare evidente, bisogna staccare il vetrino coprioggetto e depositarlo su un vetrino portaoggetti su cui si è lasciata cadere una goccia di blu di lattofenolo. Si osserva al microscopio ottico.

7. Calcoli

Non applicabile

8. Controllo di qualità interno

Qualora si disponga di ceppi di controllo o si isolino dermatofiti di specie nota, è importante la conservazione dei ceppi che avviene semplicemente inoculando in circa 2 ml di acqua distillata sterile, in provette con tappo a vite la parte mediana della colonia. La sospensione così ottenuta dovrà apparire solo lievemente torbida. Le colture vanno conservate in frigorifero e durano anche per qualche anno. Questi ceppi andranno ripresi per testare i lotti dei reagenti e dei terreni, per uso didattico ecc.

Elaborazione	Verifica		Approvazione
Settore: Batteriologia Nome: Gianfranco Bruno Firma	Sezione: Nome: Firma.	Sezione: Nome: Firma.	Dirigente II liv.: Nome: Firma.

9. Valori di riferimento, Interpretazione, valori critici

Non sviluppo di dermatofiti

10. Linearità e limite di riferimento

Non applicato

11. Limitazione del metodo

Il paziente non deve aver effettuato alcuna terapia antifungina locale; nel caso in cui il paziente sia sotto terapia ed il prelievo si renda necessario, dovrà essere fatto precedere da una attenta detersione e dovrà essere eseguito dopo qualche giorno dall'ultimo trattamento. Ricordiamo che l'esame micologico nel caso di sospetta *Tinea unguium* è sempre poco sensibile. Non usare mezzi disidratati, scaduti. La temperatura di incubazione deve essere inferiore a 30°C e superiore a 25°C tranne nel caso di *T. verrucosum*.

12. Riferimenti bibliografici

P. Fazii: Dermatofiti e Dermatofitosi. Caleidoscopio .gennaio 2002-11-04

L. Ajello, C. Farina, A. Mazzoni, G. Piperno (eds): "Fondamenti di Micologia Clinica", AMCLI editore Milano 1993.

Rippon J. W. M Medical Mycology. The pathogenic fungi and the pathogenic actinomycetes. 3a ed. W.B. Saunders, Philadelphia, 1988.

Elaborazione	Verifica		Approvazione
Settore: Batteriologia Nome: Gianfranco Bruno Firma	Sezione: Nome: Firma.	Sezione: Nome: Firma.	Dirigente II liv.: Nome: Firma.