

ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΚΑΘΟΡΙΣΜΟΥ ΑΝΑΠΤΥΞΙΑΚΗΣ ΦΑΣΗΣ ΜΥΚΗΤΩΝ ΣΕ ΤΑΥΤΟΧΡΟΝΕΣ ΣΤΕΡΕΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ

Μανούσος Εμμ. Καμπούρης⁽¹⁾, Γεώργιος Ματσανίκας^(1,2)
και Αριστέα Βελεγράκη⁽²⁾.

Τμήμα Ιατρικών Εργαστηρίων, Σχολή Επαγγελματιών Υγείας-Πρόνοιας, ΑΤΕΙ Αθηνών,
Αγ. Σπυρίδωνος, Αιγάλεω 12210.

Ειδικό Εργαστήριο Μυκητολογίας, Εργαστήριο Μικροβιολογίας, Ιατρική Σχολή,
ΕΚΠΑ, Μικράς Ασίας 75-77 Γουδή, 11527

Περίληψη

Προκειμένου να αναπτυχθούν φαινοτυπικές μέθοδοι με αυξημένες δυνατότητες αυτοματοποίησης και υψηλό πληροφοριακό περιεχόμενο που θα αντικαταστήσουν με μικρό κόστος και ελάχιστες διαδικαστικές μεταβολές τις τρέχουσες διαδικασίες μυκητολογικών στερεών καλλιέργειών, πέντε μύκητες καλλιεργήθηκαν σε 3 τυπικά στερεά υποστρώματα και η ανάπτυξή τους καταμετράτο καθημερινά ως αύξηση της διαμέτρου της αποικίας/μυκηλίου. Από τις τιμές προέκυψαν καμπύλες αύξησης ημιδιαμέτρου-χρόνου και επιφανείας-χρόνου που περιγράφουν την μυκητιακή ανάπτυξη, προκειμένου να διαπιστωθεί η κινητική της και να βγουν συμπεράσματα για περεταίρω διαφοροποίηση της μεθόδου ώστε να περιγράψει το δυνατόν περισσότερους μύκητες με επαρκή αναλυτικότητα και διακριτικότητα μέσω των παραστάσεων ανάπτυξης. Γενικά η λογαρίθμηση της επιφανειακής ανάπτυξης προσεγγίζει καλύτερα την τυπική σιγμοειδή καμπύλη, ενώ οι περισσότερες καλλιέργειες έχουν περάσει σε φάση επιβράδυνσης εντός 24 ωρών από την νύξη. Ο καθορισμός της φάσης για διαφοροποίηση του προγράμματος καταμετρήσεων μπορεί να εξαχθεί με μαθηματική επεξεργασία της καμπύλης χωρίς εξειδικευμένο λογισμικό και γνώσεις και διέπεται από απλούς κανόνες. Η καλλιέργεια κάθε στελέχους σε πολυθεσικά τρυβλία, εκτός από μείωση του κόστους και του χρόνου καλλιέργειών, επιτρέπει την απολύτως ταυτόχρονη ανάπτυξη του κάθε στελέχους σε διαφορετικά θρεπτικά υλικά με αποτέλεσμα απόλυτα συγχρονισμένες γραφικές παραστάσεις και δυνατότητα αυτοματοποίησης και μαζικοποίησης της αντίστοιχης διαδικασίας προς σύνταξη βάσεων δεδομένων με αξιόπιστα περιγραφικά και αναλυτικά δεδομένα ανάπτυξης χωρίς χρήση πολύπλοκων προγνωστικών μαθηματικών.

Λέξεις Ευρητηρίου: ταυτόχρονες στερεές καλλιέργειες μυκήτων, καμπύλη ανάπτυξης, φάση τάχιστης ανάπτυξης, αυτοματοποιημένες εφαρμογές

Εισαγωγή

Οι μοριακές δοκιμασίες που αναπτύχθηκαν για να αντιμετωπίσουν τα βασικά μειονεκτήματα των καλλιεργητικών μεθόδων (μεγάλοι χρόνοι, μέτρια ειδικότητα, αδιευκρίνιστη αναλυτική ευαισθησία) [1, 2, 3] πάσχουν από επαναληψιμότητα μεταξύ διαφορετικών εργαστηρίων, είναι δυσχερείς στην υιοθέτηση σε νοσοκομεία και η προτυποποίησή τους, για ευρέως αποδεκτές εξετάσεις αποτελεί ζητούμενο με πολύπλοκο παρασκήνιο [4,5], καθώς ακαδημαϊκά, επιχειρηματικά και τεχνικά δεδομένα μπορούν να συγκρούονται αντί να συντείνουν σε ενιαία πρακτική: η τεχνικά προσφορότερη μέθοδος δεν είναι πάντα η επιστημονικώς ακριβέστερη. Επιπλέον, η

ταυτοποίηση οργανισμών, ιδίως δε μυκήτων, βασίζεται ορθολογικά σε φαινοτυπικά και όχι γονοτυπικά ή γονιδιωματικά κριτήρια σύμφωνα με τα τρέχοντα συστήματα κατάταξης, επί των οποίων υπάρχει αποθησαυρισμένη εμπειρία δεκαετιών, τη στιγμή που η μοριακή μεθοδολογία αδυνατεί να κανονικοποιήσει τα αποτελέσματά της με την υπάρχουσα φαινοτυπική ταξινόμηση και προβαίνει σε αυθαίρετες αναθεωρήσεις [6] ή σε πολύπλοκες διευθετήσεις [6-11]. Επομένως, η συνεχής ποσοτική εκτίμηση της ανάπτυξης μυκήτων επιτρέπει θεωρητικά την ακριβέστερη ταυτοποίηση με μακροσκοπικές μεθόδους, μειώνοντας πολύπλοκους, απαιτητικούς, χρονοβόρους και δυνητικώς μολυσματικούς χειρισμούς όπως η παρασκευή παρασκευασμάτων για μικροσκοπήση. Προϋπόθεση αποτελεί φυσικά η αυστηρή εφαρμογή των γνωστών καλλιεργητικών διαδικασιών, αλλά σε νέα, απαιτητικότερη μορφή που επιτρέπει αναλυτική εξόρυξη δεδομένων και σύνταξη βάσεων δεδομένων, εφαρμογή αυτοματισμών, και μαζική διαχείριση μικροβιολογικού υλικού. Η επίτευξη των ανωτέρω βασικά συνιστά εξορθολογισμό διαδικασιών που πλέον θα ενέχουν μικρό κόστος υλοποίησης και θα μπορούν να εφαρμοστούν σε σχεδόν οποιαδήποτε μικροβιολογική μονάδα, όπως είναι η χρήση για το κάθε στέλεχος ταυτοχρόνων καλλιεργειών σε διαφορετικά στερεά υποστρώματα, μια πρακτική που επί μακρό χρόνο χρησιμοποιείται στις βιοχημικές δοκιμασίες ζυμοειδών μυκήτων και βακτηρίων, όπως στα (ημι)αυτοματοποιημένα συστήματα ταυτοποίησης API, VITEK κλπ, αλλά όχι στις καλλιέργειες μυκηλιακών μυκήτων.

Υλικά, Αρχές και Μέθοδοι

Η προτεινόμενη μεθοδολογία έχει εκτεθεί πρωτότερα [12]. Εν συντομία, προβλέπει την καλλιέργεια μυκήτων με νύξη σε 3 τυπικά υποστρώματα (malt extract agar-MEA, czapek dox agar-CzA, sabouraud agar-SbA) σε δύο θερμοκρασίες επώασης (25° και 35° C) και ημερήσια καταγραφή της ανάπτυξης για διάστημα 10-14 ημερών ανάλογα με το πότε παρουσιαζόταν στατική φάση, με αναστολή της ανάπτυξης του μυκηλίου/αποικίας. Κατόπιν η ανάπτυξη αποδίδεται γραφικά συναρτήσει του χρόνου, είτε ως αύξηση της ημιδιαμέτρου του μυκηλίου ή της αποικίας, είτε ως αύξηση της επιφανείας αυτού (-ής), είτε τέλος με το δεκαδικό λογάριθμο αυτών των δύο φυσικών μεγεθών με χρήση εμπορικού λογισμικού (Microsoft XL®). Η μαθηματική επεξεργασία που δίνει μορφή πλησιέστερη στη σιγμοειδή καμπύλη θεωρείται η προσφορότερη περιγραφική μέθοδος, και για καλλιέργειες όπου δεν λαμβάνει αυτή τη μορφή (είτε ελλείπει στατικής φάσης και φάσης προσαρμογής- 8 περιπτώσεις, είτε ελλείπει φάσης προσαρμογής- 17 περιπτώσεις, βλ Πίνακα 1) θεσπίζονται κανόνες εκτίμησης της μυκητιακής ανάπτυξης οι οποίοι θα επιτρέψουν καλύτερη καταγραφή της με διαφοροποιημένο πρότυπο καταγραφής. Αρχικά οι καλλιέργειες που σε 14 ημέρες δεν παρουσίασαν στατική φάση δεν μελετήθηκαν περαιτέρω, αν και ίσως απλά απαιτείτο μεγαλύτερος πειραματικός χρόνος για να εισέλθουν στη φάση αυτή, κάτι δυσχερές λόγω αφυδάτωσης των τρυβλίων.

ΠΙΝΑΚΑΣ 1. Αποτελέσματα καλλιεργειών

Είδος/Θρεπτικό	CzA		MEA		SbA/CI	
	25° C	35° C	25° C	35° C	25° C	35° C
<i>C. parapsilosis</i>	+	+		-		-
<i>C. neoformans</i>	+	+		-		-
<i>Penicillium</i> sp.	-	+	-	-	-	-
<i>F. dimerum</i>			-	-		
<i>A. flavus</i>	-	-	-	-	-	-

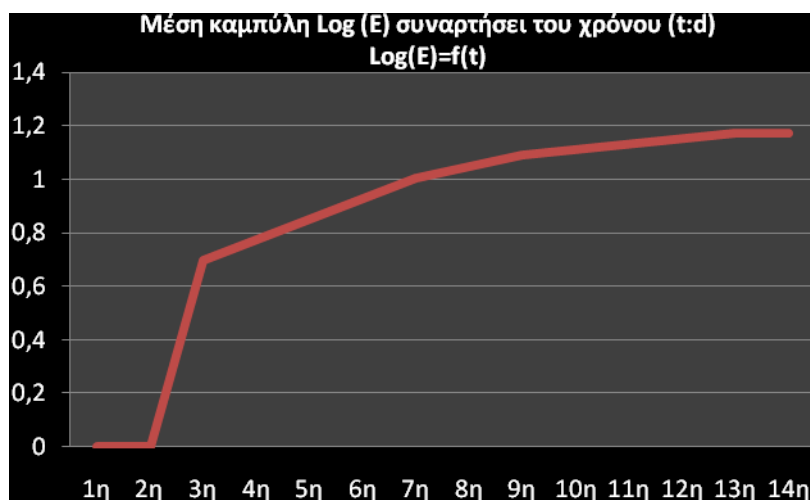
Χρησιμοποιηθέντα στελέχη και αποτελέσματα καλλιέργειας ανά θρεπτικό υλικό και θερμοκρασία: το SbA ήταν εμπλουτισμένο με χλωραμφαινικόλη για αναστολή μη ειδικής ανάπτυξης επιμολυντών. «+» πλήρης σιγμοειδής γραφική παράσταση, «-» γραφική παράσταση όπου δεν αποδίδονται οι φάσεις προσαρμογής και επιτάχυνσης, «κενό» παραστάσεις όπου δεν παρατηρήθηκε μέχρι το τέλος των καταμετρήσεων στατική φάση.

Καθώς η πρώτη μέτρηση έγινε με παρέλευση 24 ωρών, η γραφική παράσταση προεκτάθηκε προς τον αρνητικό οριζόντιο ημιάξονα στις περιπτώσεις όπου υπήρχε έντονη ανάπτυξη από την πρώτη μέτρηση. Σε όσες περιπτώσεις η προέκταση έτεμνε τον κάθετο άξονα στην θετική περιοχή τιμών, η φάση τάχιστης ανάπτυξης του μύκητα θεωρείτο ήδη παρελθούσα (επιβραδυνθείσα καλλιέργεια), αφού για να συμβιβαστεί με αληθές βιολογικό νόημα (εξαρτημένη μεταβλητή 0 για την έναρξη της καμπύλης, καθώς στη νύξη το αρχικό ενοφθάλμισμα είναι σημειακό και δεν έχει ούτε επιφάνεια ούτε διάμετρο) απαιτείται τουλάχιστον ένα σημείο καμψής στην γραφική παράσταση της πρώτης ημέρας, το οποίο θα έχει μεγαλύτερη κλίση. Αντίθετα, όταν η προέκταση της γραφικής παράστασης έτεμνε στην αρνητική περιοχή τον κάθετο άξονα, η φάση τάχιστης ανάπτυξης θεωρείτο δυνητικώς εν εξελίξει ή και εν αναμονή, ανάλογα με την συνολική κινητική εικόνα που έδειχνε η παράσταση, με αποτέλεσμα να μην μπορεί να καταχωρηθεί ως προς την αναπτυξιακή φάση η καλλιέργεια.

Τέλος, το πλεονέκτημα των πολυθεσικών καλλιέργειών σε ανθρωποενέργεια καθορίστηκε με χρονομέτρηση τριών νύξεων εκάστου στελέχους σε ένα τρυβλίο 90 mm, πρακτική που εξομοίωνε χρήση πολυθεσικού τρυβλίου, (το οποίο επιπλέον εξασφαλίζει ταυτόχρονη ανάπτυξη ενός στελέχους σε διαφορετικά υποστρώματα) και σύγκριση με το χρόνο που απαιτεί η νύξη τριών τυπικών τρυβλίων των 90 mm ανά στέλεχος ως είθισται.

Αποτελέσματα

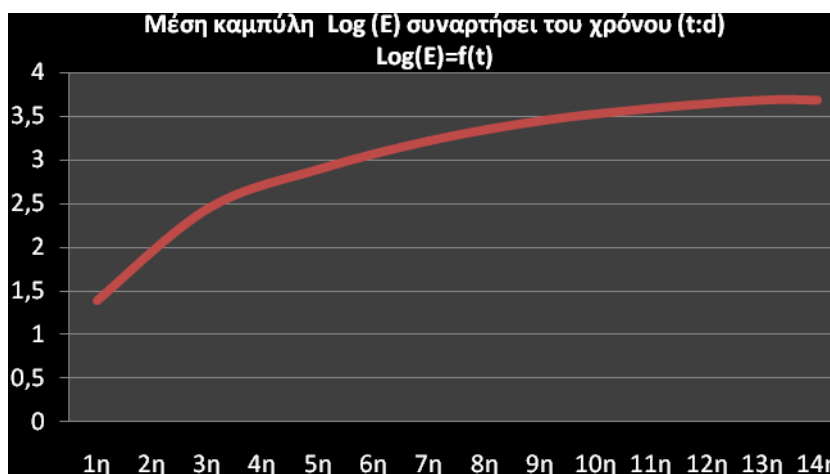
Η μυκητιακή ανάπτυξη σε κάθε περίπτωση εκφράστηκε προσφορότερα με τη χρήση μέσης καμπύλης αντί παράστασης διαδοχικών σημείων, ενώ η ομαλότερη σιγμοειδής μορφή παρεχόταν από τον λογάριθμο της επιφάνειας (Εικόνα 1). Η απόκλιση από τη σιγμοειδή μορφή σε 17 από τις 22 καμπύλες $\text{Log}E=f(t)$, προφανώς οφείλεται στην ελάχιστη διάρκεια της φάσης προσαρμογής (μακράν κάτω των 24 ωρών).



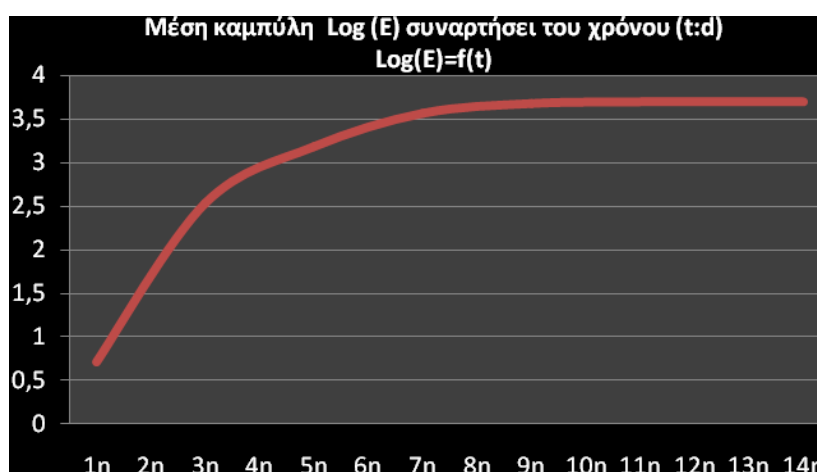
ΕΙΚΟΝΑ 1. *Penicillium* species σε CzA στους 35° C, με σαφή σιγμοειδή μορφή. Η παράσταση δεν αρχίζει από την αρχή των αξόνων λόγω προβλήματος του λογισμικού.

Λαμβάνοντας υπόψη ότι η σημειακή νύξη που χρησιμοποιήθηκε προσδίδει την τιμή «0» στην εξαρτημένη μεταβλητή σε όλες τις παραστάσεις, η κλίση της καμπύλης σε αρκετές περιπτώσεις (16 από τις 17) υποδεικνύει ότι στις 24 ώρες ίσως έχει παρέλθει και η φάση εκθετικής ανάπτυξης, και το πείραμα ιχνηλατεί μια αυξημένης διάρκειας φάση επιβράδυνσης (πχ μύκητας *Aspergillus flavus* σε MEA στους 25°).

Για να κανονικοποιηθεί η πρώτη μέτρηση επί τυπικής σιγμοειδούς καμπύλης, υπολογίστηκε με τον ακόλουθο τρόπο η φάση ανάπτυξης στην οποία ενέπιπτε η πρώτη μέτρηση. Όσες καλλιέργειες έδιναν καμπύλη που έτεμνε το θετικό κάθετο ημιάξονα προεκτεινόμενη προς το αρνητικό τεταρτημόριο (Εικόνα 2), βρίσκονταν σε φάση επιβράδυνσης (16 περιπτώσεις) και εφεξής θα αναφέρονται ως «Επιβραδυνθείσες». Όσες παρουσίαζαν παράσταση που έτεμνε τον αρνητικό κάθετο ημιάξονα προεκτεινόμενη προς το αρνητικό τεταρτημόριο (Εικόνα 3) ήταν σε αδιευκρίνιστη φάση (1 περίπτωση, ο μύκητας *Aspergillus flavus* σε MEA στους 35°C), διότι η κλίση μπορούσε να ερμηνευτεί με την παραδοχή ότι η καλλιέργεια βρισκόταν σε οποιαδήποτε από τις 3 διαφορετικές κάτωθι φάσεις: επιτάχυνσης, τάχιστης ανάπτυξης και επιβράδυνσης, καλλιέργειες αυτού του τύπου εφεξής θα αναφέρονται ως «Ακαταχώρητες». Καθώς κάθε καλλιέργεια περιγραφόταν από 4 μέσες καμπύλες αλλά μπορούσε να βρίσκεται μόνο σε μια φάση, όταν υπήρχαν ασυμβατότητες μεταξύ των διαφορετικών καμπυλών ακολουθείτο μια σειρά από σταθμισμένα κριτήρια για να χαρακτηριστεί η καλλιέργεια ως Επιβραδυνθείσα ή Ακαταχώρητη. Αυτά τα κριτήρια ήταν: α) η σαφήνεια των σημείων τομής, όπου η υψηλή σαφήνεια (Εικόνα 2) υπερτερούσε της χαμηλής (Εικόνα 3) κατά την προέκταση της γραφικής παράστασης, β) η μεγαλύτερη αξιοπιστία των πρωτογενών μεγεθών σε σχέση με τα λογαριθμημένα, τα οποία συμπίεζον τις διαφορές των πρωτογενών δεδομένων κατά την απεικόνιση, γ) η πλειοψηφική αρχή, όπου υπερτερούσε ο χαρακτηρισμός που δινόταν από τις περισσότερες γραφικές παραστάσεις. Καθόλου τυχαία, σε κανένα πείραμα δεν έτυχε να έχουμε διαζευκτικό αποτέλεσμα υψηλής αντίθεσης, δηλαδή η εφαρμογή των τριών ανωτέρω κριτηρίων να δίνει διαφορετικά αποτελέσματα για την ίδια καλλιέργεια. Συνήθως η μειωμένη παράσταση (κατ' εφαρμογήν του κριτηρίου γ) ήταν ταυτόχρονα και μειωμένης σαφήνειας (κατ' εφαρμογήν του κριτηρίου α) ή μειωμένης αξιοπιστίας (κατ' εφαρμογήν του κριτηρίου β).



ΕΙΚΟΝΑ 2. *Fusarium dimerum* σε MEA στους 25° C. Είναι εμφανής η απουσία φάσης προσαρμογής, αλλά και η υψηλή σαφήνεια του σημείου τομής, που κατατάσσει την καλλιέργεια στις Επιβραδυνθείσες.»



ΕΙΚΟΝΑ 3. *Aspergillus flavus* σε MEA στους 35° Είναι εμφανής η απουσία φάσης προσαρμογής, αλλά και η χαμηλή σαφήνεια του σημείου τομής. Η καλλιέργεια κρίθηκε Ακαταχώρητη.

Συμπεράσματα-Συζήτηση

Καθώς σε πολλές περιπτώσεις η φάση τάχιστης ανάπτυξης (στους ζυμομύκητες «φάση εκθετικής ανάπτυξης») παρέρχεται προ της πρώτης μέτρησης 24ώρου, προτείνεται η μέτρηση 4-6 φορές εντός των πρώτων 24 ωρών και μετά ανά 24ωρο για καλύτερη αποτύπωση της ακριβούς κινητικής των μυκήτων που έδειξαν σε συγκεκριμένες συνθήκες ταχεία παρέλευση της εκθετικής φάσης.

Ως ήταν αναμενόμενο, η κινητική του ίδιου στελέχους διέφερε σημαντικά ανά υλικό και θερμοκρασία. Όλες οι πλήρεις σιγμοειδείς παραστάσεις εμφανίστηκαν στο CzA, ενώ η απουσία στατικής φάσης εμφανιζόταν γενικά στους 25° C ανεξαρτήτως υποστρώματος, πλην της περίπτωσης του *F. dimerum* που την εμφάνιζε ανεξαρτήτως θερμοκρασίας σε CzA και SbA αλλά δεν την εμφάνιζε καθόλου σε MEA. Συνεπώς, η μελέτη ενός στελέχους σε πολλαπλούς συνδυασμούς θρεπτικού-θερμοκρασίας και η χάραξη των καμπυλών δημιουργούν την αναπτυξιακή ταυτότητα ενός στελέχους, ενώ μαζική τέτοια μελέτη μπορεί να αποδώσει αναπτυξιακές βιβλιοθήκες με τις οποίες να συγκρίνονται δείγματα ενδιαφέροντος.

Η απόκλιση στην κινητική της ανάπτυξης σε πολλαπλούς συνδυασμούς συνθηκών (ο χρησιμοποιηθείς εδώ θρεπτικό-θερμοκρασία είναι ο πλέον στοιχειώδης) μπορεί να διακρίνει και να αιτιολογεί διαφορές εντός είδους, που παλαιότερα στοιχειοθετούσαν ποικιλομορφία [10], να στοιχειοθετήσει υποειδική ταξινόμηση και να δώσει μια φαινοτυπική βάση στην καθ' υπερβολή υποειδική κατάταξη όπου οδηγεί η μοριακή ταυτοποίηση και ταξινόμηση [6, 10, 13, 14].

Η χρήση των κριτηρίων για το χαρακτηρισμό των μη σιγμοειδούς παράστασης καλλιέργειών επιτρέπει την τροποποίηση του προτύπου καταμετρήσεων ώστε να προσαρμόζεται στην κινητική συγκεκριμένων ομάδων μυκήτων χωρίς να επέρχεται ούτε αδιάκριτη επιβάρυνση της μεθοδολογίας καταγραφής ούτε μείωση της τυποποιησιμότητας και της πιστότητας της μεθόδου.

Η χρήση πολυθεσικών τρυβλίων, που υλοποιούν την αρχή «ένα τρυβλίο για κάθε στέλεχος» και επιτρέπουν συγχρονισμένη ανάπτυξη του αυτού στελέχους σε διαφορετικά θρεπτικά, μειώνει τα έξοδα καλλιέργειας κατά 25 % κατ' εκτίμηση, το χρόνο καλλιέργειας κατά 45% για καλλιέργεια 3 στελεχών (η πλέον σημαντική και επικερδής μείωση θα επέρχεται όταν επεξεργάζονται μεγάλοι αριθμοί δειγμάτων, άνω

των 10), καθιστά εύκολη την αναπτυξιακή μελέτη ακόμη και σε μεγάλο φόρτο εργασίας (περίπου 1 min ανά μέτρηση και 3 min ανά τρυβλίο) και επιτρέπει μελλοντικά αυτοματοποίηση τόσο στη συλλογή όσο και στην επεξεργασία των δεδομένων.

Γενικώς, η όλη διαδικασία μπορεί να αρχίσει να υλοποιείται με ελάχιστες τροποποιήσεις στις εργασίες ρουτίνας, κάτι σημαντικό σε περιόδους μειωμένης πληρότητας των εργαστηρίων σε προσωπικό και μικρές ως μηδενικές επενδύσεις σε πάγια και αναλώσιμα, χάρη στην εξοικονόμηση κονδυλίων από την επιτάχυνση των διαδικασιών καλλιέργειας και τη μείωση της κατανάλωσης τρυβλίων και των συνεπαγόμενων εξόδων μεταφοράς, αποθήκευσης, συντήρησης, επώασης, καταστροφής.

Ευχαριστίες

Στους τεχνολόγους Ιατρικών Εργαστηρίων Χατζημιχαλάκη Κωνσταντίνο και Τζελέπη Κωνσταντίνο για τη συμμετοχή τους στις καλλιέργειες και τις μετρήσεις κατά τη διάρκεια της πτυχιακής τους

Βιβλιογραφία

1. Velegraki A., Kambouris M. E., Kostourou A., Chalevelakis G. and Legakis N. J. (1999). "Rapid extraction of fungal DNA from clinical samples for PCR amplification". *Medical Mycol.* 37, 69-73.
2. Velegraki A., Kambouris M. E., Skiniotis G., Savala M., Mitroussia- Ziouva A. and Legakis N. J. (1999) "Identification of medically significant fungal genera by Polymerase Chain Reaction followed by Restriction Enzyme Analysis". *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 23, 303-12.
3. Kambouris M. E., Reichard U., Legakis N. J. and Velegraki A. (1999) "Sequences from the aspergillopepsin *PEP* gene of *Aspergillus fumigatus*: Evidence on their use in selective PCR identification of *Aspergillus* species in infected clinical samples". *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 25, 255-64.
4. Alexander BD and Pfaller MA. 2006. "Contemporary Tools for the Diagnosis and Management of Invasive Mycoses". *Clin Infect Dis* 43:S15–27,
5. Pappas PG, Kauffman CA, Andes D, Benjamin DK Jr, Calandra TF, Edwards JE Jr, Filler SG, Fisher JF, Kullberg BJ, Ostrosky-Zeichner L, Reboli AC, Rex JH, Walsh TJ, Sobel JD; Infectious Diseases Society of America. Clinical practice guidelines for the management of candidiasis: 2009 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 48(5):503-35.
6. Fredricks DN and Relman DA. 1996. "Sequence-Based Identification of Microbial Pathogens: a Reconsideration of Koch's Postulates" *Clinical Microbiology Reviews* 9 (1): 18–33.
7. Arabatzis M, Kollia K, Menounos P, Logotheti M, Velegraki A. (2004) "Delineation of *Clavispora lusitaniae* clinical isolates by polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism analysis of the ITS1 region: a retrospective study comparing five typing methods." *Med Mycol* 42(1): 27-34
8. Arabatzis M, Bruijnesteijn Van Coppenraet LH et al. (2007) "Diagnosis of common dermatophyte infections by a novel multiplex real-time PCR detection-identification scheme." *Br J Dermatol* 157: 681-9.

9. Tzanakaki G, Kesanopoulos K *et al.* 2006. "Conventional and molecular investigation of meningococcal isolates in relation to two outbreaks in the area of Athens, Greece." *Clin Microbiol Infect* (10):1024-6.
10. Balajee SA, Borman AM, Brandt ME, Cano J, Cuenca-Estrella M, Dannaoui E, Guarro J, Haase G, Kibbler CC, Meyer W, O'Donnell K, Petti CA, Rodriguez-Tudela JL, Sutton D, Velegraki A, Wickes BL. (2009) Sequence-based identification of *Aspergillus*, *Fusarium* and *Mucorales* in the clinical mycology laboratory: Where are we and where should we go from here? *J Clin Microbiol.* 47(4):877-84.
11. Καμπούρης Μ. Ε, Βελεγράκη Α., Λεγάκης Ν. Ι. (2000) "Διαφορική διάγνωση νηματοειδών μυκήτων με άπαξ περιοριστική πέψη προϊόντων αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης". *Αρχαία Ελληνικής Ιατρικής* 17: 171-179.
12. Ματσιανίκας Γ, Τζελέπης Κ, Χατζημιχαλάκης Κ, Βελεγράκη Α και Καμπούρης Μανούσος Εμμ. 2010 «Διερεύνηση καμπύλης ανάπτυξης μυκηλιακών μυκήτων σε στερεά θρεπτικά υποστρώματα». 2^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Τεχνολόγων Ιατρικών Εργαστηρίων 16-17/4/2010 Θεσσαλονίκη, Π12 Βιβλίο Συνεδρίου σελ 14.
13. Gaitanis G, Velegraki A, Alexopoulos EC, Chasapi V, Tsigonia A, Katsambas A. (2006) Distribution of *Malassezia* species in pityriasis versicolor and seborrheic dermatitis in Greece. Typing of the major pityriasis versicolor isolate *M. globosa*. *Br J Dermatol.*;154: 854-9.
14. Βελεγράκη Α. και Καμπούρης Μ. Ε. (2003) «Μικροσυστοιχίες και Πολυπλεκτική Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης: Επαναστατικές μέθοδοι Μοριακής Βιολογίας με εφαρμογές στην Βιοϊατρική Πράξη» *Αρχαία Ελληνικής Ιατρικής*, 20(4): 425-445.

Methodology And Determining Criteria For Growth Phase Of Simultaneous Fungal Solid Cultures

Manousos E. Kambouris¹, George Matsianikas^{1,2}, Aristeia Velegraki².

(1) Dept of Medical Laboratories, Fcty of Health and Caring Professions, Technological Educational Institute of Athens, Ag Spyridonos st., 12210 Athens, GREECE.

(2) Mycology Laboratory, Microbiology Department, Medical School, National & Kapodistrian University of Athens, 75-77 Mikras Asias st., 11527 Athens, GREECE

Summary

To develop automation-friendly and highly informative phenotypic methodologies, able to replace with low cost and few procedures' alterations current fungal solid-media cultures, 5 fungi (3 moulds, 2 yeasts) were cultured onto 3 most common media (SbA, MEA, CzA) at 25⁰ C and 35⁰ C. Growth was estimated daily as a function of diameter increase of the mould mycelia/yeast colonies. The values were plotted by Microsoft XL® commercial software to growth-time charts. Growth is expressed as half-diameter increase, or as surface increase in both raw and logarithmic values. The resulting curves describe the fungal growth so as to establish its kinetics for each isolate in specific medium and temperature conditions and to conclude on possible alterations, in order to achieve, by studying the resulting curves, more accurate description of the growth for more fungi, with better discriminatory and analytical power. The logarithmic values of fungal surface increase were closer to the standard sigmoid curve. Most cultures, though, are already within the deceleration phase of growth after the first 24 hours. Criteria were established to relate the computed, non-sigmoid growth curves to the standard sigmoid curve and to determine its status whenever inconsistencies among the 4 curves plotted for each culture emerged.

Using for each isolate in every temperature a single, multi-cell, multi-substrate Petri dish lowers the cost and allows for virtually simultaneous growth on the different substrates. The latter permits fully synchronized graphic charts, making possible the automated and massive processing of isolates, thus leading to the compilation of databases containing reliable descriptive and analytical growth data without the use of complicated prognostic formulas.

Keywords

Simultaneous solid-phase fungal cultures, growth curve, maximum growth rate phase, automated applications