

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Sara BEIGOT

**PRIMERJAVA POTRDITVE ONIHOMIKOZE,  
POVZROČENE Z DERMATOFITI, Z  
DERMATOFITNIM TESTNIM AGARJEM IN  
STANDARDNO MIKOLOŠKO PREISKAVO**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2008

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Sara BEIGOT

**PRIMERJAVA POTRDITVE ONIHOMIKOZE, POVZROČENE Z  
DERMATOFITI, Z DERMATOFITNIM TESTNIM AGARJEM IN  
STANDARDNO MIKOLOŠKO PREISKAVO**

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij

**THE COMPARISON OF ONYCHOMYCOSIS'S CONFIRMATION,  
CAUSED BY DERMATOPHYTES, WITH DERMATOPHYTE TEST  
MEDIUM AND THE STANDARD MYCOLOGICAL EXAMINATION**

GRADUATION THESIS  
University studies

Ljubljana, 2008

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija mikrobiologije. Temelji na izsledkih praktičnega dela, ki je bilo opravljeno v Mikološkem laboratoriju Dermatovenerološke klinike Kliničnega centra v Ljubljani.

Študijska komisija univerzitetnega študija mikrobiologije je za mentorja diplomskega dela imenovala prof. dr. Alojza Ihana, za somentorico asist. dr. Matejo Dolenc-Voljč in za recenzentko prof. dr. Katjo Seme.

Mentor: prof. dr. Alojz Ihan

Somentorica: asist. dr. Mateja Dolenc-Voljč

Recenzentka: prof. dr. Katja Seme

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Darja ŽGUR BERTOK, univ. dipl. biol.

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: prof. dr. Alojz IHAN, dr.med.

Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo

Članica: asist. dr. Mateja DOLENC-VOLJČ, dr. med.

Univerzitetni klinični center Ljubljana, Dermatovenerološka klinika

Članica: prof. dr. Katja SEME, dr. med.

Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo

Datum zagovora:

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Sara Beigot

## KLJUČNA INFORMACIJSKA DOKUMENTACIJA

- ŠD Dn  
DK UDK 579.61:616.5-071(043)=163.6  
KG Onihomikoza/dermatofiti/dermatofitni testni agar/standardna mikološka preiskava/mikroskopski pregled s KOH/Sabouraudov agar/*Trichophyton rubrum*/*Trichophyton mentagrophytes*  
AV BEIGOT, Sara  
SA IHAN, Alojz (mentor) / DOLENC-VOLJČ Mateja (somentorica) / SEME Katja (recenzentka)  
KZ SI-100 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije  
LI 2008  
IN PRIMERJAVA POTRDITVE ONIHOMIKOZE, POVZROČENE Z DERMATOFITI, Z DERMATOFITNIM TESTNIM AGARJEM IN STANDARDNO MIKOLOŠKO PREISKAVO  
TD Diplomsko delo (Univerziteten študij)  
OP XI, 58 str., 12 pregl., 3 sl., 1 pril., 57 vir.  
IJ sl  
JI sl/en  
AI Onihomikoza je glivična okužba nohtov, ki jo na nohtih nog v dobrih 90 % povzročajo dermatofiti, redkeje kvasovke in nekatere plesni. Povzročitelje dokazujemo s standardno mikološko preiskavo, ki jo opravljajo le nekateri specializirani laboratoriji v Sloveniji. Ker preiskava ni poceni, je časovno zamudna in je za nekatere bolnike zaradi oddaljenosti težje dostopna, se laboratorijska potrditev diagnoze onihomikoze ne uporablja dosledno. Zato smo se odločili preizkusiti dermatofitni testni agar (DTA), ki predstavlja cenejšo, enostavnejšo in hitrejšo metodo detekcije dermatofitov. V Mikološkem laboratoriju Dermatovenerološke klinike UKC v Ljubljani smo 142 bolnikom odvzeli vzorec nohtnine. Iz vsakega vzorca smo pripravili nativni mikroskopski preparat s kalijevim hidroksidom (KOH) in nacepili na Sabouraudov agar in na DTA. Pozitivne kulture so v večini predstavljali dermatofiti (93,7 %), preostanek *Scopulariopsis brevicaulis*; kvasovk nismo izolirali. Med vsemi izoliranimi dermatofiti smo jih s Sabouraudovim agarjem določili 96 %, z DTA le 83 %. Onihomikozo s Sabouraudovim agarjem potrdimo v 52 %, z DTA v 42 %. Specifičnost DTA znaša 90 % in je 10 % nižja od specifičnosti Sabouraudovega agarja. Dobljeni rezultati nakazujejo, da sta občutljivost in specifičnost DTA slabši v primerjavi s Sabouraudovim agarjem. DTA je resnično cenejša, enostavnejša in hitrejša metoda pri dokazovanju dermatofitov, vendar pa pomen teh lastnosti zbledi ob slabši občutljivosti in specifičnosti. Na podlagi izsledkov raziskave, DTA ne moremo priporočiti v širšo uporabo za dokazovanje dermatofitov v vzorcih nohtov nog. Predlagamo, da se dokazovanje onihomikoze nohtov nog opravlja po ustaljeni poti, torej v mikoloških laboratorijih s standardno mikološko preiskavo.

## KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn  
DC UDC 579.61:616.5-071(043)=163.6  
CX Onychomycosis/dermatophyte/Dermatophyte test medium/mycological examination/Potassium hydroxide microscopy/Sabouraud's agar/ *Trichophyton rubrum*/*Trichophyton mentagrophytes*  
AU BEIGOT, Sara  
AA IHAN, Alojz (supervisor) / DOLENC-VOLJČ Mateja (co-advisor) / SEME, Katja (reviewer)  
PP SI-100 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in Microbiology  
PY 2008  
TI THE COMPARISON OF ONYCHOMYCOSIS'S CONFIRMATION, CAUSED BY DERMATOPHYTES, WITH DERMATOPHYTE TEST MEDIUM AND THE STANDARD MYCOLOGICAL EXAMINATION  
DT Graduation Thesis (University studies)  
NO XI, 58 p., 12 tab., 3 fig., 1 ann., 57 ref.  
LA sl  
AL sl/en  
AB Onychomycosis is a fungal infection of nails, which is in more than 90 % caused by dermatophytes on the toenails, the rest are yeasts and some molds. We verify the agents with the standard mycological examination, which can be done only in some specialized laboratories in Slovenia. As the examination is not cheap, it is time-consuming and for some patients who live in distant areas not easily accessible, the mycological confirmation of diagnosis is not used consistently. Therefore we decided to test the Dermatophyte test medium (DTA), which presents cheaper, simpler and quicker method detection of dermatophytes. In the Mycological laboratory, Department of Dermatovenereology in Ljubljana we examined 142 samples of toenails. From each sample we prepared a native microscopic preparation with potassium hydroxide (KOH) and inoculated it on both culture medium, on Sabouraud agar and on DTA. The majority of positive culture was presented by dermatophytes (93,7 %), the remains were *Scopulariopsis brevicaulis*; we did not isolate any yeasts. Among all isolated dermatophytes with Sabouraud agar we determined 96 % of them, with DTA only 83 %. Onychomycosis is with Sabouraud agar confirmed in 52 %, with DTA in 42 %. The specificity of DTA comes to 90 % and is 10 % lower than the specificity of Sabouraud agar. The results indicate that the sensitivity and specificity of DTA are lower in comparison with Sabouraud agar. Although DTA is cheaper, easier and a faster method in proving dermatophytes, the importance of these qualities fades with weak sensitivity and specificity. From the results of these research we cannot recommend DTA for confirming dermatophytes in the samples of toenails for a wide use. We recommend the established way of confirmation of onychomycosis on the toenails; in mycological laboratories with standard mycological examination.

## KAZALO VSEBINE

	<b>KLJUČNA INFORMACIJSKA DOKUMENTACIJA</b>	<b>III</b>
	<b>KEY WORDS DOCUMENTATION</b>	<b>IV</b>
	<b>KAZALO VSEBINE</b>	<b>V</b>
	<b>KAZALO PREGLEDNIC</b>	<b>VIII</b>
	<b>KAZALO SLIK</b>	<b>IX</b>
	<b>KAZALO PRILOG</b>	<b>X</b>
	<b>OKRAJŠAVE IN SIMBOLI</b>	<b>XI</b>
<b>1</b>	<b>UVOD</b>	<b>1</b>
1.1	CILJ DELA IN DELOVNA HIPOTEZA	1
<b>2</b>	<b>PREGLED OBJAV</b>	<b>3</b>
2.1	ONIHOMIKOZA	3
2.1.1	Medicinsko-socialni vidik	3
2.1.2	Razširjenost	4
2.1.3	Oblike onihomikoz	5
2.2	POVZROČITELJI ONIHOMIKOZ	6
2.2.1	Pomembnejše značilnosti gliv	7
2.2.2	Dermatofiti	8
2.2.2.1	Opisi pomembnejših rodov dermatofitov, ki povzročajo onihomikozo	11
2.3	STANDARDNA MIKOLOŠKA PREISKAVA	12
2.3.1	Odvzem kužnine	13
2.3.2	Nativni pregled	13
2.3.3	Kultivacija	14
2.3.3.1	Identifikacija dermatofitov	14
2.4	DTA	16
2.5	ZDRAVLJENJE	18
2.5.1	Preprečevanje	20
<b>3</b>	<b>MATERIAL IN METODE</b>	<b>21</b>
3.1	VZORCI	21
3.1.1	Vzorci nohtov nog	21
3.1.2	Vzorci drugih kužnin s sumom na dermatofitijo	21
3.2	ODVZEM VZORCA	22
3.3	STANDARDNA MIKOLOŠKA PREISKAVA	22

<b>3.3.1</b>	<b>Nativni preparat s KOH</b>	<b>23</b>
<b>3.3.2</b>	<b>Kultivacija kužnine na Sabouraudovem agarju</b>	<b>23</b>
3.4	DTA	24
3.5	VPRAŠALNIK	25
3.6	UPORABLJEN MATERIAL	25
<b>3.6.1</b>	<b>Material potreben pri mikroskopskem pregledu</b>	<b>25</b>
<b>3.6.2</b>	<b>Gojišča za kultivacijo</b>	<b>26</b>
<b>4</b>	<b>REZULTATI</b>	<b>28</b>
4.1	ŠTEVILO PREISKOVANCEV	28
4.2	SPOL IN STAROST PREISKOVANCEV	28
4.3	ŠTEVILO OBOLELIH NOHTOV IN ČAS TRAJANJA SPREMEMB	29
4.4	CENOVNA PRIMERJAVA DTA IN STANDARDNE MIKOLOŠKE PREISKAVE	30
<b>4.4.1</b>	<b>Prihranek pri nepotrebnem zdravljenju</b>	<b>30</b>
4.5	IZVIDI MIKOLOŠKIH PREISKAV	31
<b>4.5.1</b>	<b>Nativni pregled</b>	<b>31</b>
<b>4.5.2</b>	<b>Izvidi kultivacije na Sabouraudovem agarju</b>	<b>32</b>
4.6	REZULTATI DTA	33
4.7	PRIMERJAVA DETEKCIJE DERMATOFITOV MED SABOURAUDOVIM AGARJEM IN DTA	35
<b>4.7.2</b>	<b>Občutljivost in specifičnost gojišč</b>	<b>36</b>
4.7.2.1	Občutljivost	37
4.7.2.2	Specifičnost	38
4.8	REZULTATI DRUGIH KUŽNIN S SUMOM NA DERMATOFITIJU	39
4.9	STATISTIČNA OBDELAVA	40
<b>5</b>	<b>RAZPRAVA IN SKLEPI</b>	<b>41</b>
5.1	RAZPRAVA	41
<b>5.1.1</b>	<b>Preiskovanci in njihovi podatki</b>	<b>42</b>
<b>5.1.2</b>	<b>Direktni nativni mikroskopski pregled</b>	<b>43</b>
<b>5.1.3</b>	<b>Izvidi kultivacije na Sabouraudovem agarju</b>	<b>44</b>
<b>5.1.4</b>	<b>DTA in primerjava s Sabouraudovim agarjem</b>	<b>45</b>
5.2	SKLEPI	49

<b>6</b>	<b>POVZETEK</b>	<b>50</b>
<b>7</b>	<b>VIRI</b>	<b>52</b>
	<b>ZAHVALA</b>	
	<b>PRILOGE</b>	



## KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Zastopanost preiskovancev po spolu, katerim smo odvzeli vzorec nohtov nog v Mikološkem laboratoriju Dermatovenerološke klinike in je pri njih obstajal sum na onihomikozo	28
Preglednica 2: Povprečna starost preiskovancev (v letih), pri katerih je obstajal sum na onihomikozo nohtov nog in smo jim odvzeli vzorec nohtnine	29
Preglednica 3: Povprečno število obolelih nohtov nog pri posameznikih, pri katerih je obstajal sum na onihomikozo in smo jim odvzeli vzorec nohtnine	29
Preglednica 4: Trajanje sprememb na nohtih nog pri preiskovancih, katerim smo odvzeli vzorec nohtnine (navedbe preiskovancev)	30
Preglednica 5: Rezultati nativnih direktnih mikroskopskih pregledov odvzetih vzorcev nohtnin	31
Preglednica 6: Kulture na Sabouraudovem agarju in pripadajoči nativni mikroskopski izvidi, pripravljene iz vzorcev odvzete nohtnine	32
Preglednica 7: Izolirani povzročitelji onihomikoze na Sabouraudovem agarju iz vzorcev nohtov nog	33
Preglednica 8: Rezultati na Sabouraudovem agarju. Kolonije so bile precepljene iz pozitivnih DTA (BioMérieux, Marcy-l'Étoile, Francija), ki so imeli vzporedno negativni Sabouraudov agar	34
Preglednica 9: Trajanje inkubacije DTA (BioMérieux, Marcy-l'Étoile, Francija) do zaznane prve kolonije in prvih znakov pozitivno obarvanega gojišča	35
Preglednica 10: Izolirani dermatofiti na Sabouraudovem agarju in DTA (BioMérieux, Marcy-l'Étoile, Francija) iz vzorcev nohtov nog	35
Preglednica 11: Kontingenčna tabela parov izvidov iz DTA (BioMérieux, Marcy-l'Étoile, Francija) in Sabouraudovega agarja (dejanski rezultati; lažno pozitivni DTA so v skupini DTA negativnih)	36
Preglednica 12: Detekcija dermatofitov iz drugih kužnin s sumom na dermatofitijo na DTA (BioMérieux, Marcy-l'Étoile, Francija) in Sabouraudovem agarju	39

## KAZALO SLIK

Slika 1: Prikaz micelija v vzorcu nohtov nog. Preparat pripravljen s KOH (Elewski, 1998: 420)	31
Slika 2: Zastopanost izoliranih povzročiteljev onihomikoz nohtov nog, izoliranih na Sabouraudovem agarju	33
Slika 3: DTA (BioMérieux, Marcy-l'Etoile, Francija); levo gojišče je pozitivno, desno negativno	34

## **KAZALO PRILOG**

Priloga A: Anketni list

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

DIM	- dermatofitni identifikacijski agar
DTA	- dermatofitni testni agar
KOH	- kalijev hidroksid
S.agar	- Sabouraudov agar
ZZZS	- Zavod za zdravstveno zavarovanje Slovenije

## 1 UVOD

Glivične okužbe nohtov (onihomikoze) so med najbolj razširjenimi glivičnimi okužbami, po epidemioloških podatkih dosega obolevnost na nohtih nog pri odraslih ljudeh približno 8 %. Povzročitelji teh okužb so v več kot 90 % dermatofiti. Povzročitelje onihomikoz poskušamo dokazovati s standardno mikološko preiskavo, ki vključuje nativni mikroskopski pregled in kultivacijo na Sabouraudovem agarju, ki še vedno velja za zlati standard v diagnostiki onihomikoz. Mikološko preiskavo opravljajo le nekateri specializirani laboratoriji v Sloveniji. Ker preiskava ni poceni in je za nekatere bolnike zaradi oddaljenosti težje dostopna, se za potrditev diagnoze onihomikoze ne uporablja dosledno. S tem obstaja nevarnost, da bolniki prejmejo antimikotična zdravila le na podlagi suma, da imajo onihomikozo, in da uživajo sistemska antimikotična sredstva tudi pri neglivičnih boleznih, saj glive povzročajo okoli 50 % patoloških sprememb na nohtih, ostale težave so posledica drugih vzrokov. Poleg tega je na končni mikološki izvid potrebno čakati dolgo, tudi do 6 tednov.

Zaradi vseh naštetih pomanjkljivosti smo se odločili preizkusiti dermatofitni testni agar (BioMérieux, Marcy-I'Etoile, Francija), ki je poenostavljena in cenejša metoda za potrditev okužbe z dermatofiti. S tem agarjem bi na enostaven način odpravili prej omenjene nevšečnosti. Metoda sicer ne omogoča identifikacije dermatofitov, ampak le dokazovanje njihove navzočnosti v kužnini, kar zadostuje za potrditev diagnoze in zdravljenje, saj antimikotična sredstva učinkujejo proti vsem dermatofitom in niso vrstno specifična.

### 1.1 CILJ DELA IN DELOVNA HIPOTEZA

Cilj naše raziskave je primerjati pogostnost osamitve dermatofitov iz nohtov nog vzporedno na dva načina - z DTA (BioMérieux, Marcy-I'Etoile, Francija) in s standardnim mikološkim pregledom. Ugotoviti želimo, ali je DTA (BioMérieux, Marcy-I'Etoile, Francija) v primerjavi s standardno metodo zadosti občutljiva in specifična metoda, da bi ga lahko priporočali za širšo uporabo pri bolnikih s sumom na glivično okužbo nohtov nog. Ob zadostni občutljivosti metode DTA (BioMérieux, Marcy-I'Etoile, Francija) bi le-to lahko uvedli v širšo uporabo za diagnosticiranje onihomikoz. S tem bi hitreje in lažje

določili bolnike, ki potrebujejo sistemsko zdravljenje z antimikotiki. Postopek bi bil prijaznejši tudi za izvajalce in cenovno ugodnejši za plačnika.

Glede na nekatere podobne raziskave in po zagotovilih proizvajalcev, pričakujemo dobro primerljivost obeh načinov potrditve prisotnosti dermatofitov v kužnini obolelih nohtov. Slabše ujemanje obeh metod bi bilo možno pri bolnikih, ki imajo okužbo z nekaterimi plesnimi, pri katerih so z DTA (BioMérieux, Marcy-l'Etoile, Francija) možni lažno pozitivni rezultati. Take okužbe so na nohtih nog zelo redke.

## **2 PREGLED OBJAV**

### **2.1 ONIHOMIKOZA**

Onihomikoza je glivična okužba nohtov, ki jo povzročajo dermatofiti, kvasovke in nekatere plesni. Povzročitelji po svetu niso zastopani v enakih deležih, kar je posledica različnih geografskih in klimatskih razmer ter tudi življenjskega stila (Joish in Armstrong, 2002). Onihomikoza se lahko razvije tako na nohtih rok kot tudi nohtih nog, čeprav so nohti na nogah štiri krat pogosteje prizadeti. Glavni simptomi okužbe se kažejo kot zadebelitev nohta, sprememba v barvi, nohti postajajo krhki in lomljivi ter odstopajo od podlage. Glivična okužba nohtov se lahko pojavi v kateremkoli starostnem obdobju, odstotek obolelih pa narašča s starostjo. Okužba ne izbira med spoloma, saj se pojavlja pri obeh, je pa obolevnost nekoliko višja pri moških (Treating..., 2004).

Več kot 90 % onihomikoz nohtov nog povzročajo dermatofiti, po ameriški raziskavi opravljeni na 670 pacientih celo 93 % (Elewski in sod., 2002). Rich s sodelavci (2003) je testiral 1177 oseb in kot povzročitelja onihomikoze v 92 % določil dermatofite, ostale spremembe povzročajo kvasovke in plesni, ki pa so manj pogosti povzročitelji okužb. Onihomikoza je kronično potekajoča okužba, ki praviloma napreduje in le redko izzveni sama. Povzroča lahko tudi nadaljnje komplikacije, predvsem pri bolnikih, ki imajo oslabljeni imunski sistem. Pri takšnih bolnikih lahko mesto okužbe služi kot rezervoar gliv, ki lahko povzročajo okužbo stopal ali drugih delov telesa (Szepietowski in sod., 2006). Prizadeti deli prav tako predstavljajo vstopno mesto bakterijam, ki lahko povzročajo sekundarno okužbo, predvsem pri nekaterih skupinah bolnikov (Katz, 1998).

#### **2.1.1 Medicinsko-socialni vidik**

Onihomikoza ni samo kozmetični problem, saj se pacienti soočajo z bolečinami, neugodjem, s težavami pri nošenju čevljev, spremembe jih spravljajo v zadrego, kar vodi do negativne samopodobe in posledično negativno vpliva na socialno življenje teh oseb (Drake in sod., 1998). Izsledki poljske raziskave, v katero je bilo vključenih 4000 oseb s potrjeno onihomikozo, dokazujejo, da ta okužba zmanjšuje kakovost življenja. Glivična okužba nohtov psihične težave povzroča predvsem ženskam, višje izobraženim in

prebivalcem večjih mest. Manjšo prizadetost je opaziti pri moških, osebah z nižjo izobrazbo in prebivalcih podeželja, čeprav med prvimi in drugimi ni bilo opaziti razlik v kliničnih znakih nohtov. Osebe se bojijo, da bodo okužbo prenesle na družinske člane, prijatelje ali sodelavce in se zato izmikajo tesnejšim stikom ter se ogradijo z nevidnim zidom. Okužba predstavlja velik problem starejšim, ki niso zmožni sami urediti svojih nohtov in morajo zato redno prositi za pomoč ali obiskovati pedikerje, da jim oskrbijo obolele nohte (Szepietowski in sod., 2007).

### **2.1.2 Razširjenost**

Pogostnost onihomikoze je v splošni populaciji težko raziskovati. Veliko ljudi zaradi nje ne išče zdravniške pomoči, brez mikološke potrditve diagnoze pa jo zaradi klinične podobnosti lahko zamenjamo z drugimi, neglivičnimi boleznimi nohtov (Dolenc-Voljč, 2001). Ocena prevalence onihomikoze variira od študije do študije, omenim naj le dve večji na to temo. Achilles foot screening project je bil opravljen v različnih Evropskih državah (Belgija, Nemčija, Velika Britanija, Češka, Grčija, Madžarska, Luksemburg), v njo pa je bilo vključenih 13 695 oseb. V študijo so bili zajeti preiskovanci obeh spolov, vseh starosti in ne glede na pridružene zdravstvene težave. 70 % preiskovancev je bilo starih od 18 do 65 let, 12 % je bilo mlajših od 18 let in 18 % starejših od 65 let. Prevalenca onihomikoze med njimi je bila 23 %. Delež obolelih je bil višji pri starejših, več glivičnih obolenj so opazili pri moških (tinea pedis in onihomikoza) (Roseeuw, 1999). Podobna raziskava je potekala v Kanadi, kjer so na podlagi vzorca 15 000 preiskovancev dobili 6,5 % prevalenco glivičnega obolenja nohtov nog (Gupta in sod., 2000).

Mnoge raziskave dokazujejo, da se prevalenca onihomikoze viša s starostjo. Vzroki za to naj bi bili slabša periferna cirkulacija, sladkorna bolezen, ponavljajoče se poškodbe nohtov, daljša izpostavljenost patogenim glivam, nekoliko oslabljen imunski sistem, neaktivnost, zmanjšana zmožnost urejanja nohtov oz. slabša osebna higiena in počasneje rastoči nohti (Elewski, 1998; Tosti in sod., 2005). Prav tako ocenjujejo, da se pri približno eni tretjini pacientov s sladkorno boleznijo razvije onihomikoza, saj bolezen kvarno vpliva na mikrocirkulacijo v nogah, obenem je šibkejši tudi njihov imunski sistem. Onihomikoza



je pogostejša tudi pri osebah z luskavico in pri ljudeh, ki imajo težave s perifernim ožiljem. Okužba nohtov je višja pri športno aktivnih osebah (Tosti in sod., 2005).

Ni dvoma, da je moderni način življenja odgovoren za višjo prevalenco onihomikoze. Ta vključuje nošenje zelo ozkih in nezračnih čevljev, zbiranje v telovadnicah, fitnes centrih, zdraviliščih, kopalniščih, skupnih kopalnicah...Na povišanje vpliva tudi večje število imunokompromitiranih bolnikov (bolniki okuženi z virusom HIV, pacienti, ki prejemajo imunosupresivno terapijo povezano z rakom ali postransplantacijsko oskrbo...) (Elewski, 1998). Pri malem odstotku oseb se lahko onihomikoza razvije zaradi genetskih posebnosti (Jaffe, 1998).

### 2.1.3 Oblike onihomikoz

Po obliki infekcije oz. načinu invazije lahko onihomikoze razdelimo v več skupin:

- distalno-lateralna subungvalna onihomikoza - je najbolj pogosta oblika onihomikoze, ki se prične na distalnem delu, subungvalno, glavni povzročitelj je *Trichophyton rubrum*. Glive okužijo nohtno posteljo, povzročijo hiperkeratozo, lahko tudi oniholizo in zadebelitev nohta. Okužba se ponavadi prične na nohtu palca, z leti se lahko prenese na ostale nohte,
- proksimalna subungvalna onihomikoza – je redkejša oblika okužbe, kjer gliva vstopi skozi kutikulo in napade proksimalen del nohta, nohtna plošča na tem delu postaja bela, razbarvanje pa se z rastjo nohta širi distalno. Ta oblika je pogosta pri imunosupresivnih pacientih, predvsem pri tistih, ki so okuženi z virusom HIV, najpogostejši povzročitelj je *T. rubrum* ( Jaffe, 1998),
- bela superficialna onihomikoza – pojavlja se ponavadi pri HIV pozitivnih posameznikih. Gliva vdre direktno skozi površino nohtne plošče, najpogosteje je to *Trichophyton mentagrophytes* (var. *interdigitale*), ki za sabo pušča bele, krhke in z jasnim robom omejene madeže. To obliko onihomikoze lahko povzročajo dermatofiti, ki proizvajajo keratinaze in so sposobne metabolizirati trši keratin na površini nohtne plošče (Piraccini in Tosti, 2004),
- poleg osnovnih tipov se pojavlja še ena redkejša oblika onihomikoze, imenovana »endonyx« onihomikoza. Ta tip je karakteriziran kot masivna invazija nohtne

plošče, kjer so glive prisotne v celotni debelini nohta, vendar pa ne prihaja do hiperkeratoze ali oniholize. Na nohtu so vidni razpršeni beli madeži. Ta oblika okužbe je verjetno specifična za *Trichophyton soudanense* in verjetno nastane zaradi njegove afinitete do tršega keratina. Tudi *Trichophyton violaceum* v nekaterih primerih povezujejo s to obliko invazije (Tosti in sod., 1999).

Napredovanje kateregakoli tipa onihomikoze, ki se razširi po celotnem nohtu, imenujemo distrofična onihomikoza. Noht je v celoti deformiran, spremeni se barva, je zadebeljen ali celo odlomljen (Jaffe, 1998). V starejši literaturi se je kot samostojna oblika opisovala še okužba s kvasovko kandido (kandidamicetična onihomikoza), ki pa je v novejši literaturi več ne navajajo kot samostojno obliko.

## 2.2 POVZROČITELJI ONIHOMIKOZ

Glive povzročajo med 40 in 50 % vseh patoloških sprememb na nohtih (Jaffe, 1998; Hainer, 2003), kar predstavlja 30 % vseh povrhnjih glivičnih obolenj. Glavni povzročitelji so dermatofiti, v manjšem deležu se pojavljajo kvasovke in plesni (Midgley in sod., 1994).

Med plesnimi, ki povzročajo okužbo nohtov, prevladujejo predvsem vrste iz rodov *Scopulariopsis* in *Aspergillus*, onihomikozo povzročajo tudi nekatere druge plesni: *Fusarium*, *Scytalidium*, *Dendrophoma*, *Penicillium*, *Alternaria* in *Acremonium*, ki pa so opažene redkeje oz. je njihova pojavnost v tesni povezavi z geografskim območjem (Escobar in Carmona-Fonseca, 2003). Za nekatere plesni še ni docela pojasnjeno kdaj povzročajo okužbo. Ali lahko okužijo zdrav noht ali mora biti le-ta predhodno okužen s kakšnim drugim patogenim mikrobom. Skoraj gotovo pa lahko vsaj nekatere med njimi nastopajo tudi kot primarni povzročitelji onihomikoz (Haneke, 1991). Plesni naj bi v povprečju povzročale onihomikoze nohtov nog približno v 4 % (Gupta in sod., 1997).

V italijanski retrospektivni raziskavi, ki je zajela več kot 10 000 oseb s sumom na onihomikozo, so opazili nekatere posebnosti izgleda obolelih nohtov, okuženih z nedermatofitnimi plesnimi. Nohti, ki so bili okuženi s *Scopulariopsis brevicaulis* ali *Alternaria*, so bili pogosto rjavkasto rumeni oz. potemnjeni ali celo črni. Vrste iz rodu

*Fusarium* so ponavadi povzročale superficialno belo onihomikozo, pogosto pridruženo s paronihijo, ki je bila pogostejša pri *Fusarium oxysporum*. Včasih je bila prisotna tudi oniholiza. Nohti beli in krhki kot kreda so vodilni znak okužbe z *Aspergillus* spp, pri *Acremonium* pa se je pogosto pojavljala levkonihija (Romano in sod., 2005).

Kvasovke na nohtih nog zelo redko povzročajo okužbe, so pa pogosteje izolirane iz nohtov rok, kjer povzročajo kronično paronihijo in oniholizo. Glavna povzročiteljica je *Candida albicans* (Haneke, 1991).

Podobno kot drugod, je tudi v Mikološkem laboratoriju Dermatovenerološke klinike UKC v Ljubljani, med dermatofiti kot povzročitelji onihomikoz, najpogosteje izoliran *T. rubrum*, sledi mu *T. mentagrophytes* var. *interdigitale*, v manjših deležih so izolirani še *T. tonsurans*, *Epidermophyton floccosum* in *T. violaceum* (Dolenc-Voljč, 2005).

### **2.2.1 Pomembnejše značilnosti gliv**

Onihomikoze povzročajo mikroorganizmi iz skupine gliv. To so raznoliki, heterotrofni, evkariontski organizmi, ki lahko rastejo večcelično ali kot posamezne celice (kvasovke). Glive obdaja celična stena, ki lahko vsebuje celulozo, večino pa sestavlja hitin, to je polisaharid, ki ga najdemo tudi v eksoskeletu členonožcev. Vse glive vsebujejo lizosomalne encime, s katerimi razgradijo organski material, parazitskim vrstam pa pomagajo pri invaziji v gostitelja. Mnoge glive so zmožne sinteze in shranjevanja glikogena, prav tako imajo marsikatero predeljene hife s septami, ki pa imajo pore, preko katerih prehajajo hranila in razni signali. Mnogo gliv se lahko razmnožuje tako spolno kot nespolno, pri nekaterih poznamo samo nespolni način (Black, 2005).

Od trenutno 70 000 poznanih vrst gliv je za človeka patogenih okoli 300. V naravi so ti organizmi sicer zaželeni, saj so razkrojevalci, predvsem so pomembni pri razgradnji lignina in drugih lesnih komponent, saj za potrebe svoje rasti razgrajujejo ta material (Black, 2005).

Nekatere parazitske vrste pa so višjim organizmom škodljive, saj penetrirajo v tkiva gostitelja in se hranijo z razgrajevanjem le-tega.

Glivične okužbe ali mikoze so klasificirane v tri skupine: površinske infekcije, ki prizadenejo samo s keratinom bogata tkiva v koži, lasih in nohtih. Subkutane okužbe se razvijejo v koži in podkožju in se lahko širijo po limfnih poteh. Tretja skupina so sistemske glivične bolezni, ki prizadenejo notranje organe in povzročajo resne zaplete. Nekatere glive so oportunistične, ki praviloma ne povzročajo okužb pri zdravih ljudeh, bolezen pa se lahko razvije pri osebah z oslabljenim imunskim sistemom, kot so osebe z AIDSom in drugi bolniki, ki so pod vplivom imunosupresivov (Black, 2005).

### **2.2.2 Dermatofiti**

Dermatofiti so najpogostejši povzročitelji glivičnih okužb, ki vsako leto prizadenejo več milijonov ljudi po svetu. V skupino dermatofitov spada več vrst, le-te pa pripadajo trem rodovom: *Epidermophyton* (okužijo kožo in nohte), *Microsporum* (okužba kože, las) in *Trichophyton* (okužba kože, nohtov, las) (Hainer, 2003). So filamentozne glive in povzročajo samo površinske okužbe, torej so zmožne okužbe nohtov, las in povrhnjice, v globlja tkiva ne vdirajo (Larone, 1996). Med vsemi vrstami je približno 30 takih, ki so potencialno patogene za ljudi (Gawkrodger, 2002). Najpogosteje izoliran dermatofit je *Trichophyton rubrum*, ki je posebej prevalenten med onihomikozami, saj je izoliran v okoli 80 % (Yang, 2007). Vsi dermatofiti skupaj pa povzročajo več kot 90 % onihomikoz nohtov nog (Katz, 1998).

Dermatofiti povzročajo dermatofitoze, ki jih poimenujemo tudi tinea, za natančnejši opis dodamo še mesto okužbe. Tako se okužba nohtov z dermatofiti imenuje tinea unguium (Hainer, 2003).

Dermatofiti so splošno razširjeni in pogosti povzročitelji površinskih glivičnih okužb, tudi v Sloveniji. Med letoma 1995 in 2002 so v Ljubljani v Mikološkem laboratoriju Dermatovenerološke klinike UKC zbirali vzorce pacientov s sumom na dermatomikozo. Zbranih je bilo dobrih 42 000 vzorcev (kožne luske, nohti, lasje), med vsemi pozitivnimi

kulturami so bili dermatofiti izolirani v 71,2 %. V največjem deležu se je pojavljal *Microsporum canis* (46,8 % vseh dermatofitov), sledili so *T. rubrum* (36,7 %), *T. mentagrophytes* var. *interdigitale* (7,9 %), *T. mentagrophytes* var. *mentagrophytes* (4,9 %), *M. gypseum* (1,3 %), in *T. verrucosum* (0,9 %), nekateri ostali dermatofiti so bili izolirani samo v nekaj primerih (Dolenc-Voljč, 2005).

Značilnost dermatofitov so povrhnje okužbe. To lastnost jim daje njihova zmožnost uporabe keratina kot vira hranil in energije, ki ga je v povrhnjih tkivih ravno največ (Larone, 1996). Glede na njihovo naravno nišo in način širjenja, jih delimo v tri skupine. Antropofilni se prenašajo med ljudmi, z zoofilnimi se okužimo preko živali, geofilni se nahajajo v zemlji. Do prenosa lahko prihaja tudi posredno z glavniki, klobuki, čevlji, nogavicami (Hainer, 2003).

Najinfektivnejši element dermatofitov predstavljajo artrokonidiji, ki nastanejo s fragmentacijo hif po tvorbi sept. Z opazovanji formiranja artrokonidijev so ugotovili, da je največja produkcija le-teh pri 10 % koncentraciji CO<sub>2</sub>. Do takih pogojev v praksi dejansko prihaja med invazijo glive v nohtu. Kot primer navedimo hiperkeratozo, ki je pogosto opažena pri onihomikozi. Med lokalnim prodiranjem glive, zaradi fiziološkega odziva poškodovane kože, na tem mestu narašča vsebnost CO<sub>2</sub> in se znižuje koncentracija O<sub>2</sub>, kar pripelje do optimalnih pogojev za razvoj artrokonidijev. Artrokonidiji predstavljajo dormantno obliko dermatofitov, ki so tudi odpornejši na različne dejavnike, vključno na nekatera antimikotična sredstva, kar bi naj bila posledica njihove nekoliko debelejšee celične stene (Yazdanparast in Barton, 2006). V isti raziskavi so raziskovalci preučevali vpliv antimikotikov, katerih koncentracija je nižja od inhibitorne, na formiranje dormantnih oblik glive. Ugotovili so, da takšne koncentracije učinkovin v praksi celo sprožijo produkcijo artrokonidijev. Inhibicija tega procesa je bila opažena samo pri itrakonazolu in delno pri terbinafinu. Ob teh rezultatih se ponuja možnost, da se v predelih nohta, kjer se ne doseže priporočena koncentracija antimikotika, ne uničijo hife, ampak se sproži produkcija artrokonidijev in tako dobimo odpornejše oblike glive (Yazdanparast in Barton, 2006). Mikrokonidiji in makrokonidiji naj ne bi igrali pomembnejše vloge pri širjenju bolezni, čeprav jo lahko izzovejo. Teh elementov v kužninah še niso opazili, zato menijo, da ne predstavljajo pomembnejšega vektorja pri dermatofitozah (Larone, 1996).

Odziv na okužbo z dermatofiti je lahko blag do zelo izrazit in je odvisen od odziva gostitelja na glivične metabolne produkte, virulence seva oz. vrste, anatomske lokacije in drugih faktorjev na mestu infekcije. Antropofilne vrste ponavadi povzročajo blage okužbe, medtem ko je vnetje izrazitejše pri okužbah z geofilnimi in zlasti zoofilnimi vrstami (Sterry in sod., 2005). Pri večini dermatofitnih infekcij se na koži pojavi rdečina, luščenje, srbenje, ki jim sčasoma sledi centralno izzvenevanje vnetja (Thomas, 2003).

Dermatofiti spadajo v deblo Ascomycota, kamor spada še približno 30 000 vrst, med njimi tudi kvasovke. Za te glive je značilen hitin v celični steni, spore brez bičkov in septirane hife s centralno poro (razen nekaterih kvasovk, ki ne tvorijo hif). Pri nespolnem razmnoževanju na koncih hif nastajajo spore, imenovane konidiji. V spolni fazi se pri eni glivi oblikuje veliki askogonij, pri drugi pa manjši anteridij. Strukturi se nato združita, njuna jedra se pomešajo, hife, ki vzklijejo iz te strukture imajo po dve jedri. Kasneje pride tudi do združitve teh jeder in nastane zigota, ki se deli in nastane osem jeder v vsakem asku, tako da je na koncu v vsakem asku tudi osem askospor (Black, 2005). Tudi nekateri dermatofiti, predvsem zoofilne in geofilne vrste iz rodov *Microsporum* in *Trichophyton*, so zmožni spolnega razmnoževanja s produciranjem askov in askospor (Weitzman in Summerbell, 1995).

Bistvena lastnost dermatofitov je sposobnost izrabljanja keratina za svojo rast in razvoj. Dermatofiti lahko človeški ali živalski keratin razgradijo in ga nato uporabijo. Ravno ta sposobnost predstavlja lastnost, po kateri se dermatofiti ločijo od mnogih gliv (Wang in sod., 2006). *In vivo* lahko dermatofiti kot vir hranil uporabljajo samo amino kisline in kratke peptide (Monod in sod., 2005). Zato izločajo proteaze in peptidaze, ki igrajo pomembno vlogo tudi v procesu okužbe in predstavljajo primarni virulentni faktor (Tsuboi in sod., 1989). Izločene proteaze hidrolizirajo zunajcelične proteine do peptidov, peptidaze te do amino kislin, ki se nato transportirajo v celico glive. Na ta način razgrajujejo proteine kot so keratin, elastin ter kolagen, razgradnje produkte pa uporabljajo kot hraniva (Wang in sod., 2006).

### 2.2.2.1 Opisi pomembnejših rodov dermatofitov, ki povzročajo onihomikozo

#### *Trichophyton* spp.

Glive tega rodu lahko rastejo v puhastih, zrnatih ali gladkih kolonijah, ki so belo, rjavorumeneno, rumeno, v nekaterih primerih tudi roza oz. vijolično obarvane. Pigment pri pregledu reverza variira od vrste do vrste. Najpogostejši predstavniki producirajo ogromno število mikrokonidijev in redkeje makrokonidije. Velikost, oblika in razporeditev mikrokonidijev ob hifah so značilnosti po katerih jih ločimo med seboj. Kadar so prisotni makrokonidiji, si lahko pomagamo tudi z njimi. Opazujemo njihovo obliko, pogledamo njihovo debelino in gladkost sten (Larone, 1996).

#### Pomembnejše vrste

- *T. rubrum* - ima kot solza oblikovane mikrokonidije, ki so posamično razporejeni ob hifah (ne v gručah), makrokonidiji so dolgi, gladki in s tanko steno. Kolonije so bele do rumeno rjave barve z rdečim reverzom. Pri rasti ne potrebuje posebnih dodatnih rastnih faktorjev (Larone, 1996).
- *T. mentagrophytes* - pri zrnatih kolonijah so mikrokonidiji okrogli in se formirajo v gruče, medtem ko se pri puhastih sevih pojavljajo bolj solzam podobni, jih je manj in so bolj podobni tistim pri *T. rubrum*. Makrokonidiji pri tej vrsti spominjajo na cigare. Pogosto so prisotne tudi spiralno zavite hife. Kolonije so belo ali rumeno rjavo obarvane, z rumenim ali rdečim reverzom. Nima kakšnih posebnih zahtev glede rastnih faktorjev (Larone, 1996).
- *T. tonsurans* - mikrokonidiji pri tej vrsti se zelo razlikujejo v obliki in velikosti (kot solze ali kiji, raztegnjeni ali veliki, okrogli kot balon). Pri starejših kulturah se formirajo tudi klamidokonidiji. Makrokonidiji so redko prisotni, kadar pa so, so nepravilnih oblik in z rahlo odebeljenimi stenami. Rast lahko stimuliramo s tiaminom. Kolonije so bele, rumene ali rjave, reverz pri teh kolonijah je rdeče rjav ali rumen (Larone, 1996).

### *Epidermophyton* sp.

Ta rod se od ostalih dermatofitov razlikuje po posebnih rjavo-rumenih oz. kaki obarvanih kolonijah in oranžnim ali rjavim reverzom. Makrokonidiji so gladki, stena je tanka ali rahlo odebeljena, mikrokonidiji niso prisotni (Larone, 1996). Iz tega rodu je človeku patogen samo *Epidermophyton floccosum* (Weitzman in Summerbell, 1995).

- *E. floccosum* - makrokonidiji so najboljše vidni pri mladih kulturah, so kijasto oblikovani z gladkimi stenami, sestavljeni iz dveh do šestih celic, ponavadi se nahajajo v gručah, vendar jih najdemo tudi posamično. Mikrokonidiji niso prisotni. Njihova značilna kaki barva kolonij je edinstvena znotraj dermatofitov (Larone, 1996).

## 2.3 STANDARDNA MIKOLOŠKA PREISKAVA

Onihomikoza je okužba, ki zahteva dolgotrajno zdravljenje, saj zdravljenje nohtov rok traja dva meseca in tri mesece pri obolenju nohtov nog. Poleg tega je terapija tudi draga in lahko izzove neprijetne stranske učinke. Zaradi tega je pred začetkom zdravljenja potrebno onihomikozo potrditi z mikološko preiskavo, da pacientov po nepotrebem ne obremenjujemo z zdravljenjem, tem bolj, če se odločamo za per oralno (Hainer, 2003). Klinični znaki spremenjenih nohtov nam podajo sum na onihomikozo. Ker glive povzročajo približno polovico patogenih sprememb na nohtih, je potrebna primerna preiskava, ki bo sum na onihomikozo potrdila ali ovrgla. Paciente je tako potrebno napotiti v mikološki laboratorij, kjer opravijo standardno mikološko preiskavo. Ta vključuje dve ločeni metodi, v končnem rezultatu upoštevamo izsledke obeh. Najprej se opravi direktni mikroskopski pregled kužnine s KOH, nato se del materiala nacepi na primerna gojišča in sledi inkubacija pri ustreznih pogojih (Elewski, 1998). Rezultat preiskave je odvisen od več dejavnikov. Pomemben je že pravilen odvzem vzorca. Nadaljnjo vlogo igrajo izkušnje osebe, ki mikroskopira in primerna usposobljenost strokovnjakov, ki odčitavajo kulture, da ločijo med patogenimi mikrobi, med mikroorganizmi, ki se nahajajo na nohtih kot saprofiti in kontaminacijo plošč (Roberts in sod., 2003).



### 2.3.1 Odvzem kužnine

Prvi korak pri odvzemu vzorca je čiščenje nohta z alkoholom, s čimer poskušamo odstraniti čimveč kontaminantov, kot so npr. bakterije ali saprofitne glive. Invazija gliv in lokalizacija okužbe se razlikujejo, zato je tudi vzorec potrebno odvzeti na primernih mestih. Pri distalno subungvalni onihomikozi je potrebno odvzeti vzorec nohtne postelje čim bolj proksimalno, kjer je večja koncentracija viabilnih gliv, hkrati pa je v tem materialu manj kontaminantov. Dobro je postrgati notranji del nohtne plošče in tudi takrat se poskušamo čim bolj približati proksimalnemu delu nohta. Kadar se srečamo s proksimalno subungvalno onihomikozo, je potrebno na proksimalnem delu najprej odluščiti zdravo nohtno ploščo, šele nato lahko odzamemo vzorec nohtne postelje. V primeru bele površinske onihomikoze postrgamo s skalpelom bela območja na površini nohtne plošče. Ob sumu na onihomikozo, ki jo povzročajo kvasovke, postrgamo ob straneh nohta (proksimalno in lateralno), če je prisotna oniholiza, vzamemo material še pod dvignjeno nohtno ploščo (Elewski, 1998).

### 2.3.2 Nativni pregled

Pri direktnem mikroskopskem pregledu odvzetega materiala je potrebno imeti pred očmi dejstvo, da gre zgolj za presejalno metodo, ki nam pove ali so v vzorcu prisotne glive ali ne. S to metodo ni možno določiti povzročitelja, saj je zelo težko ločiti med psevdomicelijem kvasovk in hifami dermatofitov ter nedermatofitnih gliv (Elewski, 1998). Med pregledom vzorca lahko najdemo dolge, valovite, septirane, včasih tudi razvejane hife in zaobljene artrokonidije. Pri takšni sliki sicer lahko posumimo na dermatofite, vendar je za končno potrditev diagnoze in identifikacijo povzročitelja potrebno počakati na rezultate kulture. Potrebno se je tudi zavedati možnosti lažno negativnih rezultatov, ki jih lahko pričakujemo v približno 5-15 % primerov (Larone, 1996).

Zelo pogosto se zgodi, da je nativni pregled pozitiven, kultura pa negativna, za kar obstaja več razlogov. Možno je, da je bilo vzeto premalo vzorca in so se pri deljenju po čistem naključju glivični elementi znašli na stekelcu, namenjenemu mikroskopiranju, v materialu, ki smo ga nanegli na gojišče, pa gliv ni bilo. Do lažno negativnih rezultatov lahko pride

tudi zaradi bakterij v vzorcu. Čeprav so gojišča selektivna in zmanjšujejo razraščanje bakterij, lahko te vseeno v nekaterih primerih prerastejo in onemogočijo rast glivam. Podobne težave se lahko pojavijo s saprofitnimi oz. nepatogenimi glivami iz okolja, ki rastejo hitreje in prav tako preprečijo rast povzročiteljem onihomikoze. Seveda se lahko zgodi, da v vzorcu ni bilo viabilnih gliv, ki bi lahko porasle, med mikroskopiranjem pa jih vseeno detektiramo (Elewski in sod., 2002).

Del pridobljenega vzorca naneseemo na objektno stekelce in mu dodamo kapljico ali dve 10 do 20 % kalijevega hidroksida (KOH), nato stekelce nekajkrat na hitro potegnemo čez plamen gorilnika. Preparat pogledamo pod 400-kratno povečavo, vmes vrtimo mikro-vijak naprej in nazaj za lažjo detekcijo glivičnih elementov (Hainer, 2003).

### **2.3.3 Kultivacija**

Kultivacija na primernem gojišču je metoda, ki nam omogoči osamitev in identifikacijo povzročitelja. Zaradi mesta odvzema kužnine, ki nikoli ni sterilna, je potrebno uporabiti gojišča s katerimi bomo zavrla rast drugih mikroorganizmov in s tem omogočili vzklitje dermatofitov. V ta namen se gojišču dodajajo antibiotiki, ponavadi kloramfenikol in/ali gentamicin, ki inhibirata rast bakterij in cikloheksimid za inhibicijo saprofitnih gliv (Larone, 1996).

Del kužnine, ki je nismo uporabili med mikroskopiranjem, nacepimo na Sabouraudov agar, ki ga inkubiramo pri 28°C nekaj tednov (Roberts in sod., 2003).

#### **2.3.3.1 Identifikacija dermatofitov**

Po približno 4 do 6 tednih inkubacije sledi identifikacija povzročitelja. Pri prepoznavanju izolata kot dermatofita nam pomaga mesto odvzema kužnine, nekaj nam pove že rast na selektivnem gojišču, pri nadaljnji identifikaciji pa si pomagamo z morfološkimi značilnostmi kolonij. Identifikacijski kriteriji vključujejo pigmentacijo kolonij, njihovo teksturo in značilnosti rasti. Ponavadi že na podlagi makroskopskega pregleda lahko določimo dermatofita. Če to ne zadostuje in obstajajo še vedno dvomi, si pomagamo z

natančnejšo metodo, to je mikroskopiranjem. Pripravimo si nativni preparat in se med mikroskopiranjem osredotočimo predvsem na prisotnost, obliko in razporeditev mikrokonidijev in makrokonidijev ter obliko hif, kjer moramo biti pozorni predvsem na spiralno zavite (Larone, 1996). Za lažje opazovanje nekaterih struktur lahko izolate nacepimo na posebne medije, ki izzovejo sporulacijo, predvsem produkcijo makrokonidijev, ki jih kasneje opazujemo med mikroskopiranjem (Weitzman in Summerbell, 1995)

Pri identifikaciji se lahko poslužujemo tudi nekaterih testov, ki nam pomagajo pri razločevanju med dermatofiti. Obstaja serija testnih agarjev z različnimi vitamini in amino kislinami, imenovanih *Trichophyton* agarji, s pomočjo katerih lahko na podlagi različne rasti, kot odziv na sestavo gojišča, določimo njihovo vrsto. Ureazni test nam pomaga pri prepoznavanju majhnega števila ureaza negativnih vrst, med katerimi prevladuje *T. rubrum*. Za razlikovanje med različnimi dermatofiti, predvsem za ločevanje med *T. rubrum* in *T. mentagrophytes*, lahko uporabimo tudi BCP agar (milk solids-glucose agar), kjer izolate med seboj razlikujemo na bazi sproščanja amonijevega iona iz kazeina in katabolne represije tega procesa zaradi prisotnosti glukoze (Weitzman in Summerbell, 1995). Za netipične izolate se uporablja tudi lasni perforacijski test (hair perforation test), ki temelji na zmožnosti izolata, da tvori specializirano invazivno strukturo, s katero predre las in se v njem razrašča. Tudi ta test se v večini primerih uporablja za razlikovanje med netipičnimi izolati *T. mentagrophytes* (pozitiven) in *T. rubrum* (negativen) (Salkin in sod., 1985).

V kolikor smo v dvomih ali naš izolat sploh spada med dermatofite, lahko le-tega nacepimo na dva sorodna medija, ki temeljita na podobnem principu. To sta: dermatofitni testni agar (BioMérieux, Marcy-l'Etoile, Francija) in dermatofitni identifikacijski medij (DIM). Obema se ob rasti dermatofitnih kolonij zaradi pH indikatorja gojišče obarva, kar predstavlja kriterij, po katerem dermatofite ločimo od ostalih mikrobov. Pri obeh se je potrebno zavedati možnosti lažno pozitivnih rezultatov. Salkin je s sodelavci (1997) dokazal, da nekatere glive iz rodov *Alternaria*, *Exophiala*, *Phialophora* in *Wangiella* lahko izzovejo barvno spremembo na DIM in povzročijo lažno pozitivne rezultate.

## 2.4 DTA

DTA (BioMérieux, Marcy-l'Etoile, Francija) je selektivno gojišče, namenjeno kultivaciji in razlikovanju dermatofitov od ostalih mikrobov v kužnini. Gojišče je primarno rumeno oranžne barve, ki se ob rasti dermatofitov in sproščanju njihovih alkalnih produktov obarva rdeče (BioMérieux, 2002). Dermatofiti presežek amonijevih ionov, ki se sproščajo pri proteolizi, izločajo v okolje, kar vodi v povišanje pH gojišča. Ta pojav je zelo redko opaziti pri ostalih kliničnih izolatih in tako predstavlja osnovo za zaznavanje prisotnosti dermatofitov na tem gojišču (Weitzman in Summerbell, 1995). Kot pH indikator je gojišču dodan fenol rdeče.

DTA (BioMérieux, Marcy-l'Etoile, Francija) je selektivno gojišče, ki vsebuje gentamicin in klortetraciklin, ki zavirata rast bakterijam in cikloheksimid, ki preprečuje rast določenim vrstam kvasovk in saprofitnim filamentoznim glivam.

Gojišče se lahko uporablja za detekcijo dermatofitov iz vzorcev različnih mest odvzema (lasje, kožne luske, nohti...). Odvzeti material direktno nanese na površino agarja in inkubiramo pri 25°C približno 14 dni. Odčitati ga je možno že med 3. in 7. dnevom inkubacije, v nekaterih primerih je potrebno inkubacijski čas podaljšati še za nadaljnjih 7 dni. V tem času opazujemo rast na gojišču in spremembo barve iz rumeno-oranžne v rdečo. S tem testom ne moremo identificirati vrste dermatofita, lahko potrdimo le njegovo prisotnost v vzorcu in ga na podlagi barvne spremembe gojišča ločimo od ostalih mikroorganizmov. Identifikacijo lahko izvedemo z direktnim mikroskopskim pregledom ali drugimi nadaljnjimi testi (BioMérieux, 2002).

V primerjavi s standardno mikološko preiskavo je ta metoda hitrejša, enostavnejša in tudi cenovno ugodnejša, saj v ZDA kultura v centralnem laboratoriju stane 25 dolarjev, en test DTA pa le 1 dolar (Elewski in sod., 2002). Na končni izvid kulture iz laboratorija je potrebno čakati 4 do 6 tednov, DTA se v večini primerov lahko odčita že v roku enega tedna, le nekaj kultur potrebuje še dodatnih 7 dni, da se obarvajo rdeče in le 2 % več kot 14 dni (Sinski in sod., 1972; Elewski in sod., 2002). Po dosedanjih testiranjih naj bi bil ta test zanesljiv, saj je Taplin s sodelavci samo na osnovi barvne spremembe DTA pravilno

identificiral 97 % dermatofitov izmed 1400 vzorcev različnih pacientov (Taplin, 1969, cit. po Salkin, 1973)

Elewski je s sodelavci na primeru 670 pacientov s sumom na onihomikozo pokazala, da je skladnost DTA in laboratorijske kulture 68 %, kar pomeni, da sta bili obe metodi negativni ali obe pozitivni za dermatofite. DTA je bil skupno pogosteje pozitiven (51 %) kot kultura iz mikološkega laboratorija (44 %) (Elewski in sod., 2002). Podobno raziskavo je izvedel Rich s sodelavci (2003), vendar je v študijo vključil samo diabetike s sumom na onihomikozo. 184 diabetikom so odvzeli vzorec nohtov in nacepili na DTA, drugi del so poslali v mikološki laboratorij, kjer so nacepili na Sabouraudov dekstrozni agar. DTA je zaznal dermatofite v 55 %, laboratorijska kultura je kot vzrok okužbe identificirala dermatofite v 42 %. Rezultati obeh gojišč so se ujemali v 62 %, kar pomeni, da sta v takšnem odstotku obe gojišči podali isti rezultat.

DTA (BioMérieux, Marcy-l'Étoile, Francija) je torej poenostavljena, lahko izvedljiva in hitra metoda za dokazovanje dermatofitov v vzorcu. Z njo ugotovimo prisotnost dermatofitov, ne moremo pa jih indentificirati. Ravno zaradi tega bi se ti testi lahko pogosteje uporabljali v laboratorijski diagnostiki onihomikoze na nohtih nog, kjer kot povzročitelji v več kot 90 % nastopajo dermatofiti, sistemska zdravila pa so učinkovita za vse dermatofite in ni potrebna identifikacija rodu ali celo vrste (Elewski in sod., 2002).

Pomanjkljivost DTA (BioMérieux, Marcy-l'Étoile, Francija) predstavljajo lažno pozitivni rezultati, ki jih lahko povzročijo nedermatofiti. Pri dokazovanju onihomikoze pri diabetikih z DTA (BioMérieux, Marcy-l'Étoile, Francija) so lažno pozitivne rezultate povzročili *Fusarium* spp., *S. dimidiatum* in *S. brevicaulis* (Rich in sod., 2003). Z lažno pozitivnimi rezultati povezujejo še nekatere vrste iz rodu *Candida* in *Aspergillus* (BioMérieux, 2002). Lažno pozitivnim rezultatom se lahko izognemo z opazovanjem kolonij (svetle in nesvetleče, tipične za dermatofite) in odčitavanjem le v prvih 14. dneh gojenja. Zatem lahko gojišče prerastejo drugi mikroorganizmi in ga potencialno tudi obarvajo (Elewski in sod., 2002).

Zaradi mnogih dobrih lastnosti DTA (BioMérieux, Marcy-I'Etoile, Francija) se odpira možnost za širšo uporabo v zdravstvenih domovih in drugih sorodnih ustanovah za diagnostiko onihomikoz. Osebni zdravniki in drugi specialisti se zaradi visoke prevalence onihomikoze skoraj dnevno srečujejo s to okužbo, vendar se le redko odločajo za testiranje in bolnike pogosto zdravijo izkustveno. Oviro predstavlja oddaljenost mikoloških laboratorijev, cena preiskave in dolga čakalna doba na izvid preiskave. Vse to lahko rešimo z enostavnejšim testom, DTA (BioMérieux, Marcy-I'Etoile, Francija), ki bo h klinični sliki dodal pravo smer za zdravljenje. (Elewski in sod., 2002). Poleg DTA (BioMérieux, Marcy-I'Etoile, Francija) je priporočljivo vzorec pripraviti s KOH in ga pod mikroskopom pregledati. V dvomljivem primeru, kjer med mikroskopiranjem opazimo septirane hife in klinični znaki zelo spominjajo na onihomikozo, DTA test (BioMérieux, Marcy-I'Etoile, Francija) pa je negativen, se priporoča dodatno testiranje v mikološkem laboratoriju, kjer bodo identificirali povzročitelja (Rich in sod., 2003).

## 2.5 ZDRAVLJENJE

Grizeofulvin in ketokonazol predstavljata prvo generacijo protiglivičnih učinkovin, ki sta bila odobrena za zdravljenje onihomikoz in drugih dermatomikoz pri ljudeh. Od leta 1990 se na tržišču vedno bolj uveljavljajo nove učinkovine, kot so terbinafin, itrakonazol in flukonazol, uporaba tradicionalnih učinkovin pri zdravljenju glivičnih obolenj nohtov pa tone v pozabo (Joish in Armstrong, 2002). Uporaba ketokonazola upada predvsem zaradi njegove hepatotoksičnosti, medtem ko je učinkovitost grizeofulvina v primerjavi z novejšimi sredstvi slabša (Williams, 2003).

Nove učinkovine imajo dve pomembni lastnosti. Zadostno koncentracijo v nohtni plošči dosežejo že v nekaj dnevih, medtem ko je grizeofulvin potreboval več mesecev, njegova pomanjkljivost je tudi hitro izločanje iz nohtov po koncu terapije (že po dveh tednih); nova zdravila pa ostanejo na tarčnem mestu aktivna še več mesecev (Scher, 1998). Pri uporabi novih zdravil je delež zazdravljenih okužb višji, odstotek ponovnih infekcij je nižji. Njihova prednost je še skrajšan čas terapije ter manj stranskih učinkov. Novi oralni antimikotik terbinafin je fungiciden, medtem ko so bila tradicionalna zdravila

(grizeofulvin) fungistatična, zaradi česar je čas zdravljenja z novejšimi antimikotiki krajši (Joish in Armstrong, 2002).

Pri zdravljenju onihomikoz lahko izbiramo med lokalnim in sistemskim zdravljenjem, vendar je sistemsko zdravljenje uspešnejše. Nanos lokalne učinkovine se priporoča samo pri zdravljenju površinske bele onihomikoze in v začetni fazi distalne subungvalne onihomikoze, kjer je prizadet samo distalni konec nohta. Uporabljamo jih lahko še v kombinirani terapiji, kjer naj bi bil odstotek odpravljenih okužb višji in čas trajanja terapije krajši, v vseh drugih primerih pa so površinska sredstva dokaj neučinkovita (Roberts in sod., 2003).

Terbinafin je zdravilo, ki inhibira delovanje skvalen epoksidaze in posledično zavira sintezo ergosterola, ki je sestavni del celične stene (Favre in Ryder, 1996). To privede do pomanjkanja ergosterola, hkrati se akumulira skvalen, kar dodatno zavira rast glivam. Raziskave kažejo, da je terbinafin fungiciden in predstavlja najučinkovitejše antidermatofitno sredstvo *in vitro*, klinične študije to potrjujejo tudi *in vivo*. Pri zdravljenju onihomikoz se lahko uporablja tudi itrakonazol, ki ima širši spekter delovanja in učinkuje na mnoge glive, vključno na kvasovke, dermatofite in nekatere druge plesni (Roberts in sod., 2003). Tudi itrakonazol zavira biosintezo ergosterola, ki je najpomembnejši sterol v celični membrani gliv. Zaradi tega se spremenita prepustnost membrane in sestava maščob v njej. *In vitro* je proti dermatofitom manj učinkovit kot terbinafin, za oba pa je značilno, da sta prisotna v nohtih še dolgo po zaključku zdravljenja. Zato lahko itrakonazol apliciramo pulzno: tednu dni uživanja itrakonazola v obliki tablet sledi tri tedenski premor. Za uspešno zdravljenje tak cikel ponovimo trikrat (Roberts in sod., 2003).

Učinkovitost dnevnega jemanja terbinafina v primerjavi s pulzno terapijo z itrakonazolom sta ocenjevala tudi Evans in Sigurgeirsson (1999). V študijo sta vključila samo osebe s potrjeno onihomikozo iz različnih Evropskih centrov in ugotovila, da je zdravljenje s terbinafinom učinkovitejše, saj je bil odstotek kliničnih in mikoloških ozdravitev višji. Podobna raziskava prav tako daje prednost terbinafinu, saj je delež ponovitev v 5-letnem opazovalnem obdobju dosti nižji pri osebah, ki so se zdravili s terbinafinom (Sigurgeirsson in sod., 2002).

Kot tretja pomembnejša učinkovina se uporablja flukonazol. Ta učinkuje proti vsem dermatofitom in tudi nekaterim drugim povzročiteljem onihomikoz. Priporočeno jemanje flukonazola je enkrat tedensko več mesecev (Chen in sod., 2004).

Uspeh terapije je odvisen od več dejavnikov. Pomembno je pacientovo sodelovanje in seveda učinkovitost antimikotičnega sredstva. Učinkovitost antimikotika je odvisna od penetracije, njegovih interakcij z drugimi zdravili in glivične rezistence (Joish in Armstrong, 2002). Tudi med dermatofiti se že pojavljajo rezistentni sevi na terbinafin. Osborne s sodelavci (2006) je ugotovil, da je rezistenca posledica zamenjave ene amino kisline v skvalen epoksidazi. Vendar pa do takšnih mutacij prihaja zelo redko, tudi dolga izpostavljenost terbinafinu bistveno ne poveča nastanka rezistenc (Osborne s sod., 2003). V takih okoliščinah se priporoča kombinirana terapija, kar pomeni hkratno lokalno in sistemsko zdravljenje. S takim zdravljenjem izkoristimo sinergistični učinek in rezultat zdravljenja je boljši kot pri monoterapiji (Joish in Armstrong, 2002).

### **2.5.1 Preprečevanje**

Kot pri mnogih drugih nalezljivih boleznih, je tudi pri onihomikozi najboljša rešitev preprečevanje okužbe. Osebe, ki so dovzetnejše za tovrstne okužbe (diabetiki, bolniki na zdravljenju s kortikosteroidi in kemoterapiji ali bolniki z dolgotrajnim zdravljenjem z antibiotiki in podobno) moramo poučiti, da pri njih obstaja večja dovzetnost za okužbe z glivami. Zato naj se ognejo okolju, kje se lahko okužijo: skupne kopalnice, območja ob javnih bazenih, zdravilišča, rekreacijski in športni centri. Varujejo naj se poškodb nohtov ter izogibajo nošenju starih in vlažnih športnih copatov ali preozkih čevljev. Pazljivi morajo biti tudi pri osebni higieni (Treating..., 2004).



### **3 MATERIAL IN METODE**

#### **3.1 VZORCI**

##### **3.1.1 Vzorci nohtov nog**

Vzorci smo pet mesecev (od 7.11.2006 do 4.4.2007) zbirali v Mikološkem laboratoriju na Dermatovenerološki kliniki UKC v Ljubljani. Vzorce smo odvzeli bolnikom, ki so bili napoteni v laboratorij z napotnico lečečega zdravnika zaradi suma na onihomikozo nohtov nog.

Izključitveni kriteriji: bolniki predhodno niso smeli biti zdravljeni z antimikotičnimi sredstvi. Zadnje 3 tedne jim je bilo odsvetovano nanašanje mazil in uporaba lakov proti glivam, prav tako so bili iz raziskave izključeni bolniki, ki so se v zadnjih šestih mesecih zdravili z oralnimi antimikotiki. Razlog za takšno izbiro so možni lažno negativni rezultati pri osebah, ki so se predhodno zdravili s katerim od antimikotikov. Med direktnim mikroskopskim pregledom lahko v takih primerih v odvzetem materialu zaznamo glive, na gojišču pa ne bodo porasle, saj smo med mikroskopiranjem najverjetneje opazili neviabilne elemente gliv, ki sicer še niso razpadli, vendar pa takšni deli ne vzklijejo in ne tvorijo kolonij.

Zaradi številčno skromnih napotitev bolnikov s sumom na onihomikozo v naš laboratorij (čemur je botrovalo jesensko-zimsko zatišje), smo odvzeme nohtnine, skladno s strokovnimi priporočili, organizirali tudi izven laboratorija: v domačem okolju in v bližnji ambulanti splošne medicine (Zdravstveni dom Selnica ob Dravi). Tudi pri teh preiskovancih je obstajal sum na onihomikozo nohtov nog.

##### **3.1.2 Vzorci drugih kužnin s sumom na dermatofitijo**

Poleg vzorcev nohtov smo zbrali tudi nekaj drugih kužnin, kjer je obstajal sum na dermatofitijo. Tudi ti pacienti so bili z napotnico napoteni v Mikološki laboratorij Dermatovenerološke klinike UKC. Material smo odvzeli po podobnem postopku kot pri nohtih. Pri tem smo morali biti pozorni le, da smo skarifikat odvzeli z roba žarišča (med

prizadeto in neprizadeto kožo), saj je tam pričakovati največ viabilnih gliv. Če je šlo za spremembe na lasišču, smo v preiskavo dodali tudi nekaj izpuljenih las. Pri klinični diagnostiki mikrosporije smo si pomagali z Woodovo svetilko, ki oddaja UV žarke valovne dolžine, daljše od 365 nm. Če smo z njo posvetili na spremembe na koži ali lasišču v temnem prostoru, so nekatere fluorescirale rumeno-zeleno. Po odvzemu je sledil direktni mikroskopski pregled in kultivacija.

### 3.2 ODVZEM VZORCA

Nohte na nogah smo najprej očistili z alkoholnim vatirancem, da smo odstranili umazanijo, maščobo in čimveč bakterij ter gliv na površini nohta, ki predstavljajo neželene kontaminante pri iskanju povzročiteljev onihomikoz. Nato smo preiskovancu s sterilnim skalpelom odvzeli material za preiskavo. Kužnino smo poskušali pridobiti čim bolj proksimalno, torej čim bližje lunuli, kjer je večja verjetnost, da bomo našli viabilne elemente gliv in se tako izognili lažno negativnim rezultatom, hkrati je tu tudi manjša možnost kontaminacije. Trudili smo se, da je bil ves postopek čim manj moteč za preiskovanca.

Odvzeti material smo sproti nanašali na objektno stekelce in ga razdelili na tri dele. Del smo porabili za pripravo nativnega preparata s KOH in ga mikroskopirali, drugi del smo nanesli na Sabouraudovo gojišče in tretji na DTA. Vsakemu preiskovancu smo dodelili zaporedno številko za spremljanje rezultatov celotne mikološke preiskave (nativni pregled, DTA, kultura).

### 3.3 STANDARDNA MIKOLOŠKA PREISKAVA

Standardna mikološka preiskava vključuje dve različni metodi, takojšen direkten nativni mikroskopski pregled odvzete kužnine in nanos le-te na Sabouraudovo gojišče, čemur sledi inkubacija in identifikacija povzročitelja.

### **3.3.1 Nativni preparat s KOH**

Del kužnine smo nanесли na objektno steklo, dodali kapljico ali dve 10 % raztopine KOH in ga pokrili s krovnim stekelcem. Pripravljen preparat smo pustili stati okoli 20 minut, da se je material zbistril in so bili elementi gliv bolj vidni. Postopek smo pospešili s plamenom gorilnika, skozi katerega smo preparat trikrat na hitro potegnili. Ohlajen preparat smo potem preiskali pod mikroskopom. Najprej pod 100-kratno povečavo in kasneje še pod 400-kratno. Pomagali smo si z mikrometerskim vijakom, ki smo ga vrteli naprej in nazaj in s tem omogočili boljšo vizualizacijo gliv, ki so bolj izstopale od okoliškega materiala.

V preparatih prizadetih nohtov smo iskali hife, spore ali kvasovke. Na podlagi tega pregleda smo bolniku izdali nativni izvid. Če nismo našli nobenega elementa gliv, je bil izvid opisan kot negativen, če smo opazili hife, spore ali kvasovke je bil izvid pozitiven. K pozitivnemu izvidu smo dodali še opisno informacijo o tem, kaj smo dejansko opazili med mikroskopiranjem. To je lahko bil micelij, kvasovke ali spore. Zadnji dve obliki smo tudi ocenili z dvema izrazoma: posamične ali številne.

### **3.3.2 Kultivacija kužnine na Sabouraudovem agarju**

Drugi del vzorca smo zasejali na Sabouraudovo gojišče z dodanim antibiotikom (kloramfenikol) in cikloheksimidom, s katerima smo zavrli rast bakterij in saprofitnih plesni. Na vsako gojišče smo napisali identifikacijsko številko preiskovanca ter mesto odvzema kužnine in jih shranili v termostat naravn na konstanto temperaturo 27,1°C. Po 4 do 6 tednih smo kulture odčitali.

Identifikacija vlaknatih glivičnih povzročiteljev onihomikoz je temeljila na makroskopskih in mikroskopskih morfoloških značilnostih. Opazovali smo barvo kolonij, njen reverz, določali teksturo in upoštevali hitrost rasti.

Kadar na podlagi makroskopskih lastnosti nismo mogli identificirati glive, smo si pomagali še z mikroskopskim pregledom micelija. S sterilno ezo smo postrgali del micelija in ga nanесли na objektno steklo, dodali še kapljico fiziološke raztopine, pokrili material s

krovnim stekelcem in mikroskopirali. Osrednjo pozornost smo posvetili mikrokonidijem in makrokonidijem ter obliki hif. Opazovali smo prisotnost in razporeditev mikrokonidijev, ki so se lahko posamično nahajali ob hifah ali se formirali v gruče, prav tako smo bili pozorni na njihovo obliko, saj se pojavljajo v več različicah. Kot naslednji identifikacijski kriterij so nam služili makrokonidiji, njihova prisotnost, število, oblika in debelost celične stene. Pri identifikaciji *T. mentagrophytes* so nam bile v veliko pomoč spiralno zavite hife, ki so značilen znak te vrste. Ponekod smo zasledili tudi klamidokonidije, ki so nam bili v pomoč pri prepoznavanju.

Ocena makroskopskih značilnosti in mikroskopski pregled micelija sta nas pripeljala do končnega izvida mikološke preiskave, ki je bil nato poslan naročniku (lečečemu zdravniku na osnovni ravni ali določenemu specialistu).

### 3.4 DTA

Za oceno zanesljivosti DTA (BioMérieux, Marcy-l'Étoile, Francija) pri dokazovanju dermatofitov kot povzročiteljev onihomikoze, je bilo potrebno del nohtnine nanesti tudi na DTA (BioMérieux, Marcy-l'Étoile, Francija). Postopek smo izvedli aseptično ob gorilniku, kjer smo s sterilno ezo nanесли odvzeto kužnino z nohta na poševnino gojišča v epruveti. Gojišče smo zaprli z zamaškom in inkubirali v prostoru na sobni temperaturi, ki je bila okoli 24°C. Gojišča smo opazovali vsak dan (razen čez vikende) in si beležili spremembe. Spremljali smo pojavljanje in rast kolonij, njihove značilnosti kot so barva, tekstura in kot najpomembnejši element, spremembo barve gojišča.

Gojišče se je iz rumeno-oranžne barve obarvalo rdeče kot posledica izločanja alkalnih produktov dermatofitov. Samo obarvanje gojišča v rdečo smo odčitali kot pozitiven rezultat, kar pomeni, da so na gojišču porasli dermatofiti. Vse ostale spremembe na DTA (BioMérieux, Marcy-l'Étoile, Francija), kot je porast kolonij brez obarvanja gojišča na rdeče, ali porast kolonij in svetlejša barva gojišča, smo označili kot negativne. To je pomenilo, da z DTA (BioMérieux, Marcy-l'Étoile, Francija) nismo zaznali dermatofitov v vzorcu. Obstaja možnost, da so povzročitelji onihomikoz katere druge glive (plesni ali kvasovke), vendar jih z DTA (BioMérieux, Marcy-l'Étoile, Francija) ne moremo določiti.

Iz micelija nekaterih pozitivnih DTA (BioMérieux, Marcy-l'Etoile, Francija) smo napravili tudi nativni preparat s fiziološko raztopino in ga mikroskopirali. Podobno kot pri preparatu iz kolonij na Sabouraudovem gojišču smo opazovali morfološke značilnosti mikrokonidijev, makrokonidijev ter hif.

Vzorci, ki so nam podali neskladne rezultate, torej ko je bil DTA (BioMérieux, Marcy-l'Etoile, Francija) pozitiven, na Sabouraudovem agarju pa dermatofitov nismo izolirali, smo dodatno analizirali. Kolonije iz pozitivnih DTA (BioMérieux, Marcy-l'Etoile, Francija) smo precepili na Sabouraudov agar in poskušali identificirati dermatofite.

### 3.5 VPRAŠALNIK

Poleg osnovnega iskanja povzročiteljev onihomikoze smo želeli dobiti še širši in globlji vpogled v pacientove navade in okoliščine okužb. V ta namen smo pripravili kratek anketni list, ki smo ga s preiskovancem izpolnili še pred odvzemom vzorca (Priloga A).

Najprej nas je zanimalo, če je omenjeno lezijo že kdaj zdravil. Če da, potem kdaj in s čim (s predpisanimi zdravili, samozdravljenjem in podobno). Če je v zadnjih treh tednih že uporabljal lokalna antimikotična sredstva ali se v zadnjih šestih mesecih zdravil s sistemskimi antimikotiki – je to pomenilo izločitev iz naše raziskave. V takem primeru so v laboratoriju opravili zgolj standardno mikološko preiskavo. Nadalje nas je zanimal spol, starost in poklic. Povprašali smo jih o trajanju sprememb na nohtih in si ob tem zabeležili število prizadetih nohtov, da bi tako ocenili prag, ko so spremembe postale tako moteče, da so se odločili za pregled.

### 3.6 UPORABLJEN MATERIAL

#### 3.6.1 Material potreben pri mikroskopskem pregledu

Pri odvzemu kužnine smo potrebovali sterilno gazo, alkohol za čiščenje in sterilni skalpel.

Uporabili smo osnovni material za mikroskopiranje:

- objektna stekla,

- 10 % raztopino KOH,
- krovna stekelca,
- plinski gorilnik,
- mikroskop.

Pri mikroskopskem pregledu kolonij iz gojišč (DTA (BioMérieux, Marcy-l'Etoile, Francija), Sabouraudov agar) smo poleg že naštetega materiala potrebovali še fiziološko raztopino.

### 3.6.2 Gojišča za kultivacijo

Glive smo gojili na dveh gojiščih: DTA (BioMérieux, Marcy-l'Etoile, Francija) in Sabouraudovem agarju.

#### Sabouraudov dekstrozni agar

Ta agar v laboratoriju naročajo kot prah in ga v skladu z recepturo pripravljajo sami. Litru čiste vode smo dodali 65g prahu in temeljito premešali. Raztopino smo nato segrevali na kuhalniku in ob tem mešali do vretja, potem smo še približno eno minuto pustili vreti, da se je prah popolnoma raztopil. Sledilo je avtoklaviranje pri 121°C, 15 minut. Po avtoklaviranju smo dodali še cikloheksimid in antibiotik (kloramfenikol). Na koncu smo tekoči agar aseptično razlili v petrijevke, jih pustili, da se ohladijo in jih kasneje shranili v hladilnik za uporabo.

V litru tako pripravljene raztopine so naslednje sestavine:

encimsko razgrajeni kazein	10,0g
dekstroza	40,0g
agar	15,0g
cikloheksimid	0,5g
kloramfenikol	0,5g

pH tega gojišča je 5,6 z odmikom 0,2.

### DTA (BioMérieux, Marcy-l'Etoile, Francija)

Gojišča ni potrebno pripravljati, kuhati ali avtoklavirati, saj je medij že pripravljen za nanos biološkega materiala. Gojišča so pakirana v zavoječih po 20. Medij se nahaja v steklenih epruvetah z zamaškom. Gojišča smo shranjevali v hladilniku pri stalni temperaturi med 2 in 8°C. Pred uporabo smo gojišča ogreli na sobno temperaturo.

Sestavine, ki so dodane litru očiščene vode:

mesni pepton	3g
kazeinski pepton	3g
sojin pepton	3g
ekstrakt kvasovk	2g
malt ekstrakt	1g
dekstroza	19g
kalijev fosfat	0,5g
dikalijev fosfat	0,5g
fenol rdeče (0,5 %)	40ml
agar	13g
cikloheksimid	0,5g
gentamicin	0,1g
klortetraciklin	0,1g

Gojišče ima pH 5,8 (BioMérieux, 2002).

## 4 REZULTATI

### 4.1 ŠTEVILO PREISKOVANCEV

V dobrih petih mesecih smo zbrali 142 vzorcev nohtov nog. 133 vzorcev je bilo odvzetih bolnikom napotnim v Mikološki laboratorij Dermatovenerološke klinike UKC v Ljubljani. Devet vzorcev smo odvzeli preiskovancem izven Mikološkega laboratorija (ambulanta splošne medicine Selnica ob Dravi, krajevna skupnost in drugo). Pri vseh preiskovancih je na osnovi kliničnih sprememb na nohtih nog obstajal sum na onihomikozo. Dodatnih 20 vzorcev smo odvzeli bolnikom s sumom na dermatofitijo.

### 4.2 SPOL IN STAROST PREISKOVANCEV

V preiskavo je bilo vključenih nekoliko več žensk kot moških in so predstavljale skoraj 60 % vseh preiskovancev (preglednica 1).

Preglednica 1 Zastopanost preiskovancev po spolu, katerim smo odvzeli vzorec nohtov nog v Mikološkem laboratoriju Dermatovenerološke klinike in je pri njih obstajal sum na onihomikozo

Spol	Število	Delež
Moški	57	40,1 %
Ženske	85	59,9 %
Skupaj	142	100 %

Izračunali smo povprečno starost žensk, moških in skupno starostno povprečje. V izračun smo zajeli 140 preiskovancev, saj pri dveh nismo dobili podatkov o rojstnem datumu. Povprečna starost moških in žensk je bila zelo podobna, pri ženskah 53,3 let, pri moških 53,4, skupna povprečna starost je znašala 53,3 let (preglednica 2). Zajeti razpon let je bil večji, pri ženskah je segal vse od enega leta pa do 89, pri moških od 12. do 86. leta starosti.



Preglednica 2 Povprečna starost preiskovancev (v letih), pri katerih je obstajal sum na onihomikozo nohtov nog in smo jim odvzeli vzorec nohtnine

	Moški	Ženske	Skupaj
Povprečna starost (leta)	53,4	53,3	53,3

#### 4.3 ŠTEVILO OBOLELIH NOHTOV IN ČAS TRAJANJA SPREMEMB

Število obolelih nohtov je nihalo med 1 in 10, povprečno je bilo spremenjenih 5,2 nohta (preglednica 3). Skoraj vedno je bil prizadet noht na palcu (sam ali poleg ostalih), saj je 98,5 % preiskovancev imelo spremenjen noht na vsaj enem palcu. Med preiskovanci sta bila samo dva, ki nista imela patološko spremenjenega nobenega nohta na palcih, pri njihju so bili oboleli nohti na ostalih prstih nog.

Preglednica 3 Povprečno število obolelih nohtov nog pri posameznikih, pri katerih je obstajal sum na onihomikozo in smo jim odvzeli vzorec nohtnine

Spol	Povprečno število obolelih nohtov
Moški	5,4
Ženske	5,1
Skupaj	5,2

Ženske so se povprečno za mikološki pregled odločile po šestih letih trajanja sprememb, moški leto dni kasneje (preglednica 4). Tudi tukaj je bil časovni razpon zelo širok, ena gospa se je za pregled odločila že po treh tednih po pojavu prvih sprememb, spet druga je čakala skoraj 40 let. Podobno je bilo pri moških, kjer je bil ta čas razpršen od enega meseca pa vse do 62 let. V izračun je bilo vključenih samo 122 preiskovancev, ostali se niso spomnili začetka pojava sprememb na nohtih in niso mogli niti približno časovno opredeliti začetka. Njihov končni odgovor je bil »več let«, kar pa nam za oceno trajanja sprememb ni zadoščalo.

Zavedamo se, da so podatki o trajanju sprememb odsev izključno preiskovančevih subjektivnih opažanj. Kljub primerom popolnoma uničenih nohtov, ko smo lahko upravičeno domnevali, da so posledica večletnih sprememb, smo upoštevali zgolj njihove

časovne navedbe. Ob tem dopuščamo možnost, da navedene vrednosti odstopajo od resničnih.

Preglednica 4 Trajanje sprememb na nohtih nog pri preiskovancih, katerim smo odvzeli vzorec nohtnine (navedbe preiskovancev)

Spol	Povprečen čas trajanja sprememb (v letih)
Moški	7,0
Ženske	6,0
Skupaj	6,4

#### 4.4 CENOVNA PRIMERJAVA DTA IN STANDARDNE MIKOLOŠKE PREISKAVE

Celotna mikološka preiskava v Mikološkem laboratoriju na Dermatovenerološki kliniki UKC v Ljubljani stane 20€. Od tega znesejo stroški odvzema kužnine in nativni pregled 7€, 13€ pa priprava gojišča, kultivacija in identifikacija.

Cena DTA gojišča (BioMérieux, Marcy-l'Etoile, Francija) je 2,4€. K temu je potrebno dodati še stroške odvzema kužnine in čas potreben za odčitavanje.

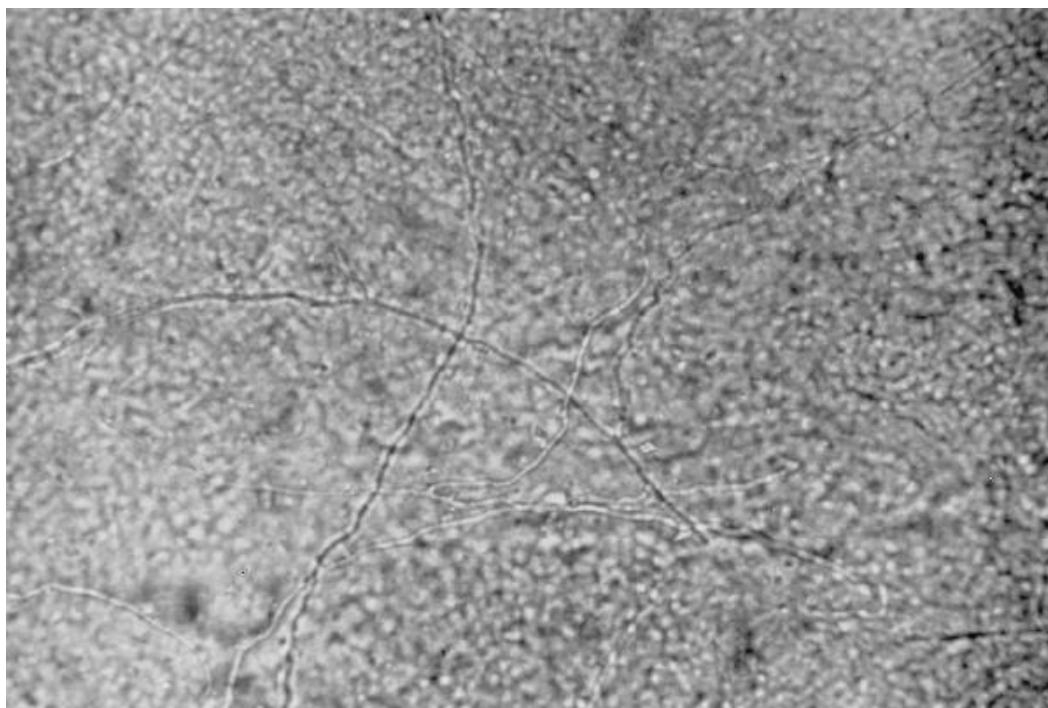
##### 4.4.1 Prihranek pri nepotrebnem zdravljenju

Če vemo, da traja sistemsko zdravljenje izražene onihomikoze na nogah vsaj 3 mesece in se za zdravljenje odločimo s terbinafinom (Atifan 250 mg tbl a 14 tbl = 12,52€, Lamisil 250 mg tbl a 14 tbl = 20,12€) (Seznam..., 2007), potem zdravljenje s preparatom Atifan stane 75,12€, če izberemo preparat Lamisil pa celo 120,72€. Plačnik zdravljenja torej pri samo enem negativnem izvidu, ko ni potrebe po zdravljenju, prihrani do 120€, za kar bi lahko kupili 50 DTA (BioMérieux, Marcy-l'Etoile, Francija).

## 4.5 IZVIDI MIKOLOŠKIH PREISKAV

### 4.5.1 Nativni pregled

Med direktnim pregledom odvzete kužnine smo pri 52 preiskovancih (36,6 %) dobili negativen izvid, saj v teh vzorcih med mikroskopiranjem nismo zaznali glivičnih elementov. Ostalih 90 (63,4 %) vzorcev je bilo pozitivnih. V treh vzorcih smo opazili kvasovke (2,1 %), v osmih spore gliv (5,7 %), najpogosteje, pri 76 vzorcih (53,5 %) smo opazili micelij. Pri pregledu vzorcev treh oseb smo opazili hkrati več različnih elementov gliv, spore in micelij (2,1 %) (preglednica 5).



Slika 1 Prikaz micelija v vzorcu nohtov nog. Preparat pripravljen s KOH (Elewski, 1998: 420)

Preglednica 5 Rezultati nativnih direktnih mikroskopskih pregledov odvzetih vzorcev nohtnin

Preiskovanci	Negativno	Pozitivno				Skupaj
		Spore	Kvasovke	Micelij	Micelij,spore	
Število	52	8	3	76	3	90
Delež	36,6 %	5,7 %	2,1 %	53,5 %	2,1 %	63,4 %

#### 4.5.2 Izvidi kultivacije na Sabouraudovem agarju

Od 142 vzorcev smo na žalost enega založili, tako da je nadaljnja analiza potekala na 141 vzorcih. Z mikološkim pregledom smo v kulturi identificirali glive kot povzročitelje onihomikoze v 48 (34,0 %) vzorcih. Kot pozitivne kulture smo označili tiste, pri katerih smo izolirali dermatofite ali druge plesni, od teh so se v naši raziskavi pojavile samo *S. brevicaulis*, kvasovk nismo identificirali. Pri ostalih 93 preiskovancih (66,0 %) je bil izvid kulture negativen. Od 48 preiskovancev, pri katerih je bila kultura pozitivna, jih je 46 imelo pozitiven tudi nativni izvid, v dveh primerih je bila kultura pozitivna, nativen izvid pa negativen (preglednica 6).

Od vseh nativno pozitivnih vzorcev jih je imelo približno polovico (51,1 %) pozitivno tudi kulturo, med tem ko je bila pri nativno negativnih vzorcih kultura pozitivna le v 3,9 %.

Preglednica 6 Kulture na Sabouraudovem agarju in pripadajoči nativni mikroskopski izvidi, pripravljene iz vzorcev odvzete nohtnine

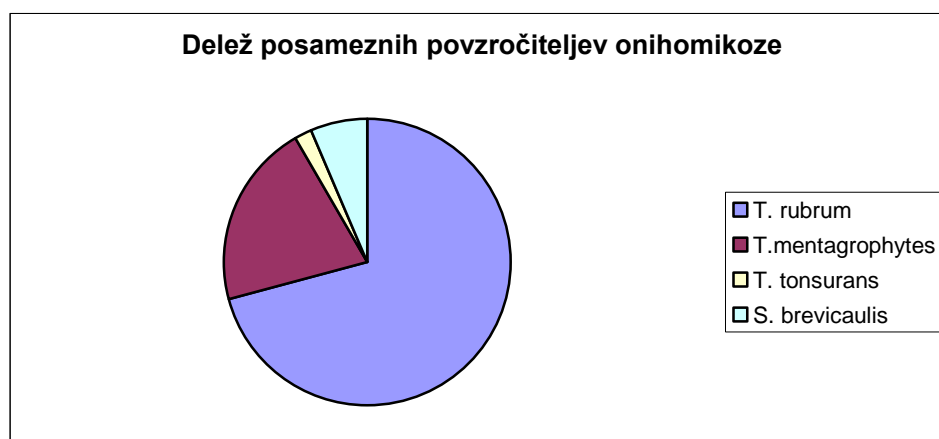
Nativni izvid	Sabouraudov agar		
	Pozitiven	Negativen	Skupaj
Negativen	2	49	51
Pozitiven	46	44	90
Skupaj	48	93	141

Med povzročitelji onihomikoze smo najpogosteje izolirali dermatofite, katerih skupni delež med pozitivnimi kulturami znaša 93,7 %. Od ostalih možnih povzročiteljev smo določili samo *S. brevicaulis* (6,3 %) in nobene druge plesni, prav tako ne kvasovk. Opazili tudi nismo mešanih okužb.

Med dermatofiti smo najpogosteje izolirali *T. rubrum*, ki predstavlja 70,8 % vseh pozitivnih kultur (preglednica 7). Z 20,8 % mu sledi *T. mentagrophytes* (antropofilna podvrsta), *T. tonsurans* smo izolirali samo enkrat, kar predstavlja 2,1 % pozitivnih kultur.

Preglednica 7 Izolirani povzročitelji onihomikoze na Sabouraudovem agarju iz vzorcev nohtov nog

Izolati	Število kultur	Odstotek
<i>T. rubrum</i>	34	70,8 %
<i>T. mentagrophytes</i> -var. <i>interdigitale</i>	10	20,8 %
<i>T. tonsurans</i>	1	2,1 %
<i>S. brevicaulis</i>	3	6,3 %
Ostali izolati	0	0 %
Vsi izolati skupaj	48	100 %
Vsi dermatofiti skupaj	45	93,7 %



Slika 2 Zastopanost izoliranih povzročiteljev onihomikoz nohtov nog, izoliranih na Sabouraudovem agarju

#### 4.6 REZULTATI DTA

DTA (BioMérieux, Marcy-I'Etoile, Francija) je bil pozitiven pri 48 preiskovancih. Od teh jih je imelo 45 pozitivni tudi nativni izvid.

Pri neskladnih rezultatih, ko je bil DTA (BioMérieux, Marcy-I'Etoile, Francija) pozitiven, na referenčnem Sabouraudovem agarju pa dermatofitov nismo izolirali, smo kolonije iz DTA (BioMérieux, Marcy-I'Etoile, Francija) precepili na Sabouraudov agar in poskušali

identificirati dermatofite. Takšnih vzorcev je bilo 11. Osem od teh vzorcev je imelo nativni mikroskopski izvid pozitiven (micelij), ostali trije so imeli negativnega.

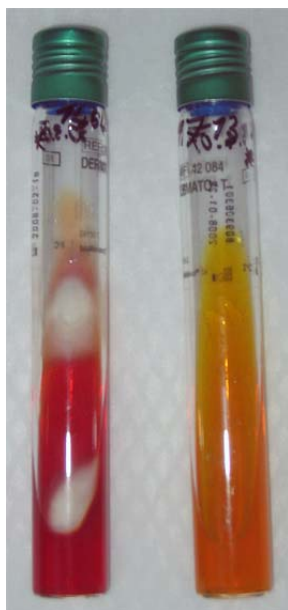
Preglednica 8 Rezultati na Sabouraudovem agarju. Kolonije so bile precepljene iz pozitivnih DTA (BioMérieux, Marcy-l'Etoile, Francija), ki so imeli vzporedno negativni Sabouraudov agar

Sabouraudov agar	Izolirani dermatofiti	Ni dermatofitov	Skupaj
Število vzorcev	2	9	11

Med precepljenimi 11 vzorci smo na Sabouraudovem agarju določili dermatofite samo v dveh vzorcih (preglednica 8). Enkrat smo identificirali *T. rubrum* in enkrat *T. mentagrophytes* (puhasti tip). Na ostalih gojiščih so porasle klinično nepomembne plesni.

Vzorci (9), na katerih po precepljanju nismo uspeli dokazati dermatofitov, smo označili kot lažno pozitivne. Na teh DTA so verjetno porasle druge glive, ki so povzročile obarvanje gojišča.

Z DTA (BioMérieux, Marcy-l'Etoile, Francija) smo določili dermatofite v vzorcih nohtov nog pri 39 preiskovancih, kar predstavlja 27,7 % vseh preiskovancev.



Slika 3 DTA (BioMérieux, Marcy-l'Etoile, Francija); levo gojišče je pozitivno, desno negativno

V prvih 14 dneh inkubacije se je 98 % pozitivnih DTA (BioMérieux, Marcy-l'Etoile, Francija) obarvalo rdeče, le en vzorec se je obarval šele 16. dan, kar predstavlja 2 % vseh pozitivnih vzorcev. V povprečju so se prve kolonije na gojišču pojavile po šestih dneh inkubacije (preglednica 9), prve pozitivne barvne spremembe pa dan za tem. Sprva se je gojišče obarvalo le okoli kolonij in se od tam razširilo na celotno gojišče. Po pojavu prvih barvnih sprememb smo vedno počakali do priporočenega 14. dneva inkubacije. V tem času ni bilo opaziti, da bi se gojišča po prvih pozitivnih znakih razbarvala.

Preglednica 9 Trajanje inkubacije DTA (BioMérieux, Marcy-l'Etoile, Francija) do zaznane prve kolonije in prvih znakov pozitivno obarvanega gojišča

DTA	Pojav kolonij	Sprememba barve
Dnevi	6,3	7,4

#### 4.7 PRIMERJAVA DETEKCIJE DERMATOFITOV MED SABOURAUDOVIM AGARJEM IN DTA

S Sabouraudovim agarjem smo med 141 vzorci izolirali dermatofite v 45 vzorcih oziroma pri 31,9 % preiskovancev. Z DTA (BioMérieux, Marcy-l'Etoile, Francija) smo določili dermatofite v nekoliko nižjem številu, to je v 39 vzorcih ali pri 27,7 % oseb vključenih v raziskavo (preglednica 10).

Preglednica 10 Izolirani dermatofiti na Sabouraudovem agarju in DTA (BioMérieux, Marcy-l'Etoile, Francija) iz vzorcev nohtov nog

Vzorci	Sabouraudov agar	DTA
Število pozitivnih vzorcev	45	39
Delež glede na vse vzorce	31,9 %	27,7 %

Kjer so samo na Sabouraudovem agarju porasli dermatofiti, DTA (BioMérieux, Marcy-l'Etoile, Francija) pa je ostal negativen (8 vzorcev), smo izolirali naslednje dermatofite: v štirih primerih *T. rubrum* in prav tako v štirih primerih *T. mentagrophytes* var. *interdigitale* (antropofilna podvrsta).

Preglednica 11 Kontingenčna tabela parov izvidov iz DTA (BioMérieux, Marcy-l'Etoile, Francija) in Sabouraudovega agarja (dejanski rezultati; lažno pozitivni DTA so v skupini DTA negativnih)

DTA	Sabouraudov agar		
	Poz.	Neg.	Skupaj
Poz.	37	2 (b)	39
Neg.	8 (c)	94	102
Skupaj	45	96	141

V vseh treh primerih, kjer smo na Sabouraudovem gojišču izolirali *S. brevicaulis*, so DTA (BioMérieux, Marcy-l'Etoile, Francija) ostali negativni. Na dveh gojiščih so sicer porasle kolonije, ki pa niso izzvale spremembe barve, gliva torej ni povzročala lažno pozitivnih rezultatov.

Na koncu smo združili rezultate DTA (BioMérieux, Marcy-l'Etoile, Francija) in Sabouraudovega agarja ter izračunali delež dermatofitov med vsemi izoliranimi glivami. Delež potrjenih dermatofitov se je povzpел s 93,7 % na 94,0 %. Preostalih 6 % zavzema *S. brevicaulis*.

Veliko razliko med gojiščema pa smo opazili v času, ki je bil potreben, da smo gojišča lahko odčitali. Pri Sabouraudovem gojišču je bil ta čas v povprečju 37. dan (v razponu od 15. pa celo do 60. dne), pri DTA gojišču (BioMérieux, Marcy-l'Etoile, Francija) smo pozitivne rezultate povprečno zaznali že 7. oz 8. dan (z razponom od 3. do 16. dne). V prvih 14 dneh smo lahko z DTA (BioMérieux, Marcy-l'Etoile, Francija) odčitali 98 % pozitivnih DTA (BioMérieux, Marcy-l'Etoile, Francija).

#### 4.7.2 Občutljivost in specifičnost gojišč

Podatke, pridobljene iz obeh gojišč, smo uporabili pri izračunu občutljivosti in specifičnosti Sabouraudovega agarja in DTA (BioMérieux, Marcy-l'Etoile, Francija). Izračunane vrednosti smo nato primerjali med sabo.



#### 4.7.2.1 Občutljivost

Občutljivost preiskave je verjetnost, da dobimo pozitiven rezultat preiskave, ko je bolezen prisotna, oz. delež bolnikov z boleznijo, pri katerih dobimo pozitiven rezultat preiskave. Občutljivost izračunamo kot količnik pravilno pozitivnih rezultatov (a) in vseh oseb s pravilno pozitivnim rezultatom (a) ter z lažno negativnim rezultatom (c) (Ivetič in Kersnik, 2007).

$$\text{Občutljivost} = a/(a+c) \quad \dots (1)$$

Želeli smo ugotoviti, kolikšen delež vseh izoliranih dermatofitov smo zaznali s posameznim gojiščem, zato smo v imenovalcu upoštevali samo bolnike, pri katerih smo z enim ali drugim gojiščem izolirali dermatofite. Ker iz pozitivnega nativnega izvida ne moremo zanesljivo oceniti, ali ima bolnik okužbo z dermatofitom ali ne, jih v tem izračunu nismo upoštevali.

- Delež izoliranih dermatofitov na Sabouraudovem agarju (glede na vse izolirane dermatofite):

$$= 45/47 = 0,96. \text{ Izraženo v odstotkih: } 96 \%$$

- Delež izoliranih dermatofitov na DTA (BioMérieux, Marcy-l'Etoile, Francija) (glede na vse izolirane dermatofite):

$$= 39/47 = 0,83. \text{ Izraženo v odstotkih: } 83 \%$$

Občutljivost Sabouraudovega agarja za dokazovanje dermatofitov v vzorcih nohtov nog je torej 96 %, občutljivost DTA (BioMérieux, Marcy-l'Etoile, Francija) pa le 83 %.

V naslednjem koraku nas je zanimalo kakšna je občutljivost gojišč pri detekciji vseh povzročiteljev onihomikoz. V imenovalcu smo tokrat upoštevali vse bolnike, pri katerih smo z gojiščema dokazali klinično pomembne glive in tudi tiste, ki so imeli pozitiven samo

nativni izvid. Ko testiramo občutljivost gojišč vključujoč tudi te bolnike, testiramo občutljivost Sabouraudovega agarja za potrditev diagnoze, pri vseh povzročiteljih, ne le dermatofitih.

- Občutljivost Sabouraudovega agarja pri zaznavanju vseh povzročiteljev onihomikoze:

Občutljivost =  $48/92 = 0,52$ . Izražena v odstotkih: 52 %

- Občutljivost DTA (BioMérieux, Marcy-l'Etoile, Francija) pri zaznavanju povzročiteljev onihomikoze:

Občutljivost =  $39/92 = 0,42$ . Izražena v odstotkih: 42 %

S Sabouraudovim agarjem smo v naši raziskavi onihomikozo nohtov nog potrdili pri 52 % bolnikov, z DTA (BioMérieux, Marcy-l'Etoile, Francija) pri 42 %. Razlika je posledica manjšega števila zaznanih dermatofitov z DTA (BioMérieux, Marcy-l'Etoile, Francija), hkrati s Sabouraudovim agarjem prepoznamo tudi druge povzročitelje onihomikoze, česar DTA (BioMérieux, Marcy-l'Etoile, Francija) ne omogoča. Pri naših preiskovancih smo iz treh vzorcev s Sabouraudovim agarjem izolirali *S. brevicaulis*, te glive z DTA (BioMérieux, Marcy-l'Etoile, Francija) ne moremo določiti.

#### 4.7.2.2 Specifičnost

Specifičnost preiskave je verjetnost, da dobimo negativen rezultat preiskave, ko bolezen ni prisotna. Izračunamo jo kot količnik pravilno negativnih rezultatov (d) in vseh zdravih oseb (b+d); d so lažno pozitivni (Ivetić in Kersnik, 2007). V imenovalcu smo upoštevali vse preiskovance, pri katerih nismo izolirali dermatofitov.

$$\text{Specifičnost} = d/(b+d) \qquad \dots(2)$$

- Najprej smo izračunali specifičnost Sabouraudovega agarja:

Specifičnost =  $94/94 = 1,0$ . Izražena v odstotkih: 100 %.

- Nato še specifičnost DTA (BioMérieux, Marcy-l'Etoile, Francija):

Specifičnost =  $85/94 = 0,90$ . Izražena v odstotkih: 90 %.

S Sabouraudovim agarjem bomo vse preiskovance, ki nimajo okužbe z dermatofiti, pravilno določili kot zdrave. Z DTA, po naših izračunih, 10 % oseb, ki nimajo okužbe z dermatofiti, določimo kot okužene z njimi.

#### 4.8 REZULTATI DRUGIH KUŽNIN S SUMOM NA DERMATOFITIJU

Med 20 vzorci, ki smo jih odvzeli bolnikom s sumom na dermatofitijo iz drugih delov telesa, je bilo 15 pozitivnih na obeh gojiščih, trije so bili na obeh agarjih negativni. Rezultati so se razlikovali pri dveh vzorcih, kjer so dermatofiti porasli na Sabouraudovem agarju, na DTA (BioMérieux, Marcy-l'Etoile, Francija) pa ni prišlo do spremembe barve. Med temi vzorci ni bilo nobenega, ki bi bil na DTA (BioMérieux, Marcy-l'Etoile, Francija) pozitiven, a na Sabouraudovem agarju negativen.

Preglednica 12 Detekcija dermatofitov iz drugih kužnin s sumom na dermatofitijo na DTA (BioMérieux, Marcy-l'Etoile, Francija) in Sabouraudovem agarju

DTA	Sabouraudov agar		
	Poz.	Neg.	Skupaj
Poz.	15	0	15
Neg.	2	3	5
Skupaj	17	3	20

Na Sabouraudovem gojišču je bilo skupno 17 pozitivnih vzorcev. Izolirali smo dermatofite, med njimi sta bila dva *T. mentagrophytes* (1 puhasti in 1 zrnati tip), sedemkrat smo izolirali *T. rubrum* in osemkrat *M. canis*. Zaradi premajhnih razlik med gojiščema statistična obdelava z McNemarjevnim testom ni bila mogoča.

## 4.9 STATISTIČNA OBDELAVA

Občutljivost obeh gojišč smo testirali z McNemarjevim testom parov. V ta namen smo si pripravili 2 x 2 kontingenčno tabelo (tabela 11).

1.) Izračun:

$$\chi^2 = (c - b)^2 / (b + c) \quad \dots(3)$$

$$\chi^2 = (8 - 2)^2 / (2 + 8)$$

$$\chi^2 = 36 / 10 = 3,6$$

2.) Stopinje prostosti (SP):

$$SP = (\text{št. vrstic} - 1) \times (\text{št. stolpcev} - 1) \quad \dots(4)$$

$$SP = 1$$

3.) Pripadajoča ničelna porazdelitev:

$$\chi^2_{0,05} (SP=1) = 3,841 \text{ (Košmelj, 2001)}$$

4.) Izračun p-vrednosti. Uporabili smo spletno stran SISA (Simple Interactive Statistical Analysis).  $p = 0,057$

Pri stopnji značilnosti 0,05 smo z McNemarjevim testom dobili mejno vrednost ( $p = 0,057$ ). S težavo trdimo, da med občutljivostjo testov ne obstaja statistično značilna razlika. Rezultat lahko povzamemo na sledeč način: občutljivost DTA (BioMérieux, Marcy-l'Etoile, Francija) pri dokazovanju dermatofitov iz nohtov nog je približno enaka kot občutljivost Sabouraudovega agarja, ali celo slabša. Izračunana vrednost se nanaša samo na Sabouraudov agar; ker standardna mikološka preiskava vključuje tudi mikroskopski pregled, je občutljivost standardne mikološke preiskave za dokazovanje onihomikoze neprimerljivo boljša. Predvsem zaradi nekvalitetno odvzetega vzorca lahko pri nativnem pregledu pričakujemo 5-15 % lažno negativnih rezultatov, ob primernem odvzemu bi se ta delež še znižal (Larone, 1996).

## 5 RAZPRAVA IN SKLEPI

### 5.1 RAZPRAVA

Povzročitelje onihomikoz dokazujemo s standardno mikološko preiskavo, ki jo v Sloveniji opravljajo samo nekateri specializirani laboratoriji. Ker preiskava ni poceni, je zamudna in je za nekatere bolnike zaradi oddaljenosti težje dostopna, se za dokazovanje diagnoze onihomikoze ne uporablja dosledno. S tem povečamo tveganje, da veliko bolnikov prejme antimikotična zdravila tudi pri neglivičnih spremembah na nohtih nog.

Zaradi teh zadržkov smo se odločili preizkusiti DTA (BioMérieux, Marcy-l'Etoile, Francija). S tem testom bi odlično rešili zadrego, saj bi ga ob ugodnih rezultatih lahko priporočili v širšo uporabo. Ob tem bi se zmanjšalo število bolnikov, ki po nepotrebem prejemo antimikotično zdravljenje, hkrati bi se zmanjšala obremenitev mikoloških laboratorijev v Sloveniji, kjer bolniki s sumom na onihomikozo predstavljajo velik delež preiskovancev. Metoda sicer ne omogoča identifikacije dermatofitov, dokaže pa njihovo navzočnost v kužnini, kar zadostuje za potrditev diagnoze in za specifično ter varno zdravljenje. Antimikotična sredstva učinkujejo namreč na vse dermatofite in niso vrstno specifična.

Napravili smo stroškovno primerjavo med DTA (BioMérieux, Marcy-l'Etoile, Francija) in standardno mikološko preiskavo. Cena celotne mikološke preiskave v Mikološkem laboratoriju Dermatovenerološke klinike UKC v Ljubljani zneso 20€. Od tega znaša nativni pregled s stroški odvzema kužnine 7€, 13€ pa priprava gojišča, kultivacija in identifikacija. Eno DTA gojišče (BioMérieux, Marcy-l'Etoile, Francija) stane le 2,4€. Prišteti moramo le še ceno posameznega laboratorija za odvzem kužnine, stroške drobnega materiala in odčitek, kar pa zagotovo ne doseže 20€.

Še večji prihranek časa in sredstev je viden ob predpostavki, da kultivacijo na DTA (BioMérieux, Marcy-l'Etoile, Francija) opravijo neposredno kar v zdravstvenem domu ali v posamezni ambulanti. Preiskavo lahko opravijo s svojim kadrom (medicinska sestra, tehnik) v rednem času. Namesto napotitve pacienta v mikološki laboratorij, kar stane ambulanto 20€, bi jih uporaba DTA (BioMérieux, Marcy-l'Etoile, Francija) stala borih

2,4€ in še nekaj malega za ostali drobni material. Zdravnik bi lahko za strošek enega pacienta dobrim osmim omogočil kultivacijo nohtnine. S tem bi plačniku prihranili ogromna sredstva. Hkrati bi plačnik zdravljenja pri samo enem negativnem izvidu, ko ni potrebe po zdravljenju, prihrani do 120€ (Seznam...,2007), za kar bi lahko kupili 50 DTA (BioMérieux, Marcy-l'Etoile, Francija).

### **5.1.1 Preiskovanci in njihovi podatki**

V dobrih petih mesecih smo skupno zbrali 142 vzorcev nohtov nog. Večino vzorcev smo odvzeli bolnikom, ki so bili napoteni v Mikološki laboratorij na Dermatovenerološko kliniko UKC v Ljubljani. Manjše število (9) je bilo odvzetih na terenu. Pri vseh preiskovancih je obstajal klinični sum na onihomikozo, v raziskavo pa smo izbrali le tiste, ki predhodno še niso bili zdravljeni z antimikotičnimi učinkovinami.

Struktura preiskovancev gre v prid ženskam, bilo jih je približno 60 %. Vendar višji delež žensk v skupini preiskovancev še ne pomeni, da ženske tudi dejansko obolevajo za onihomikozo pogosteje od moških. Predhodno opravljene raziskave nakazujejo celo nasprotno, moški pogosteje obolevajo za glivičnimi boleznimi nohtov nog (Roseeuw, 1999; Perea in sod., 2000). Večje število žensk vključenih v raziskavo, lahko pripišemo njihovem bolj izraženemu estetskemu čutu, zaradi česar se ob spremembah na nohtih prej in pogosteje odločijo za pregled.

Povprečna starost pri kateri so se bolniki odločili za mikološki pregled je bila pri obeh spolih podobna. Pri ženskah je bila 53,3 leta, pri moških pa 53,4, skupna povprečna starost je bila 53,3 leta. Razpon v letih je bil velik, saj je bil naš najmlajši preiskovanec star eno leto, najstarejši pa 89 let. Število obolelih narašča s starostjo (Roseeuw, 1999).

Število obolelih nohtov je nihalo med 1 in 10. Povprečno število obolelih nohtov pri preiskovancih znaša 5,2 nohta, kar je nekoliko več od ostalih izsledkov podobnih raziskav. V poljski raziskavi je bilo povprečno število obolelih nohtov nižje, 4,4 nohta (Szepietowski in sod., 2006). Ženske so se za pregled odločile nekoliko prej, saj je pri njih povprečno število spremenjenih nohtov znašalo 5,1, pri moških je to število bilo 5,4. Zanimivo je, da

je 98,5 % preiskovancev imelo spremenjen noht na vsaj enem palcu noge. Kaže, da so nohti palcev nog dosti bolj dovzetni za razvoj onihomikoze. To lahko razložimo z velikostjo in večjo izpostavljenostjo različnim zunanjim mehanskim dražljajem in majhnim poškodbam, ki predstavljajo ugodno okolje za rast gliv.

Tudi podatki o trajanju sprememb kažejo, da se ženske nekoliko prej odločajo za zdravljenje. Ženske so se za pregled odločile povprečno po 6 letih sprememb na nohtih, moški šele po 7 letih. Vzorec preiskovancev ni popolnoma reprezentativen, saj na kliniko prihajajo težji bolniki in od tod verjetno dolg čas trajanja. Zavedamo se, da so navajanja teh terminov zelo subjektivna, odvisna od pozornosti posameznika. Nekateri posamezniki so navajali nekaj mesecev trajajoče spremembe na nohtih, ki pa so bili vizualno popolnoma deformirani, kar je ponavadi odsev večletne okužbe. Ker ne vemo zagotovo, kaj je res, smo pri oceni trajanja upoštevali navedbe bolnikov. Ob tem dopuščamo možnost, da navedene vrednosti odstopajo od resničnih.

### **5.1.2 Direktni nativni mikroskopski pregled**

Pri direktnem nativnem mikroskopskem pregledu smo 36,6 % vzorcev označili kot negativne, saj pri njih nismo zaznali glivičnih elementov. Preostali vzorci so bili pozitivni. Med glivičnimi elementi se je najpogosteje pojavljal micelij, približno pri polovici vzorcev. Manjši delež zavzemajo vzorci, v katerih se je hkrati pojavilo več elementov (spore in micelij) ali posamezne spore. Kvasovke pri naših vzorcih niso igrale pomembnejše vloge, pri nativnem pregledu so bile najdene le v 2,1 % vseh vzorcev.

Nativni pregled je orientacijska preiskava, ki nam ne poda končnih rezultatov. Lahko ločimo med kvasovkami in micelijem, težave pa se že pojavijo pri razlikovanju med psevdomicelijem in micelijem dermatofitov ter drugih gliv. Na podlagi micelija ne moremo identificirati glive. Potrebno se je tudi zavedati, da so nohti nesterilni in je tako lahko vsak najden glivični element nepatogen kontaminant. Vendar pa pozitiven nativni izvid ob močnem kliničnem sumu na onihomikozo že zadošča za antimikotično zdravljenje.

### 5.1.3 Izvidi kulture na Sabouraudovem agarju

Za končno potrditev diagnoze je potrebno počakati na identifikacijo glive, ki poraste na primernem gojišču. Na Sabouraudovem agarju smo povzročitelje onihomikoze izolirali v 34,0 % vzorcev. Kot pozitivne kulture smo označili vse vzorce, kjer smo izolirali dermatofite ali druge plesni, ki lahko povzročajo okužbo nohtov. Dermatofite smo izolirali pri 31,9 % preiskovancev. Kvasovk nismo izolirali iz nobenega vzorca, torej niso bile med povzročitelji onihomikoze. Med plesnimi se je pojavljala samo ena vrsta, to je *S. brevicaulis*, ki je bila izolirana v 6,3 % pozitivnih kultur. Po pričakovanjih najvišji delež med povzročitelji zavzemajo dermatofiti, katerih delež predstavlja 93,7 % vseh pozitivnih kultur.

Tudi z našo raziskavo smo dokazali, da so dermatofiti prevladujoči povzročitelji onihomikoz nohtov nog. Ta izsledek je zelo pomemben, saj bi bila misel na širšo uporabo DTA (BioMérieux, Marcy-l'Etoile, Francija) ob manjši zastopanosti dermatofitov vprašljiva ali celo brez pomena.

Med dermatofiti smo najpogosteje izolirali *T. rubrum* (70,8 % pozitivnih kultur), kar sovпада z izsledki drugih raziskav (Roseeuw, 1999), z 20,8 % mu je sledil *T. mentagrophytes* (antropofilna podvrsta), *T. tonsurans* smo identificirali v 2,1 % pozitivnih kultur.

Tudi mi smo se soočali z visokim deležem negativnih kultur. Od vseh nativno pozitivnih vzorcev jih je imela približno samo polovica tudi kulturo pozitivno, pri ostalih (48,9 %) nismo uspeli izolirati povzročiteljev. Problem negativnih kultur pri okužbah nohtov nog je poznan in po podatkih iz literature znaša približno 50 % (Elewski, 1996; Daniel in Elewski, 2000). Pri naših preiskovancih je bil povprečen čas trajanja onihomikoze med 6 (ženske) in 7 let (moški). V tem času je okužba napredovala in prizadela večino površine nohta. Da dosežemo vitalne glive, je v takih primerih potrebno odvzeti material čim bolj proksimalno, kar pa nemalokrat predstavlja težavo. Prav neustrezno odvzet material je lahko vzrok negativnih kultur. Na kliniko so napoteni težji bolniki, z napredovalimi okužbami, zato je lahko odstotek uspešnih pozitivnih izvidov nižji. Pri naših kulturah



negativni rezultati ne bi smeli biti posledica predhodne uporabe antimikotičnih sredstev, saj takih preiskovancev nismo vključili v raziskavo.

Po drugi strani je bilo tudi nekaj primerov (3,8 %), ko je bil nativni izvid negativen, kultura po inkubaciji pa pozitivna. To si razlagamo na dva načina. Morda pri mikroskopiranju nismo bili dovolj pazljivi in smo elemente gliv spregledali ali po naključju v tem materialu ni bilo gliv, le-te pa so bile v materialu, ki smo ga nanegli na gojišče.

#### **5.1.4 DTA in primerjava s Sabouraudovim agarjem**

DTA (BioMérieux, Marcy-l'Étoile, Francija) je namenjen detekciji dermatofitov v kužnini in prav ta lastnost je bila predmet naše raziskave. S tem gojiščem smo določili dermatofite v kužnini pri 27,7 % preiskovancev, torej nekoliko manj kot s Sabouraudovim agarjem (31,9 %).

Skupno smo iz 47 vzorcev izolirali dermatofite. S Sabouraudovim agarjem smo zaznali 96 % vseh izoliranih dermatofitov, z DTA (BioMérieux, Marcy-l'Étoile, Francija) le 83 %. Sabouraudov agar je očitno občutljivejša metoda pri dokazovanju dermatofitov v vzorcih nohtov nog. Rezultati naše raziskave se glede detekcije dermatofitov ne ujemajo z doslej objavljenimi rezultati podobnih raziskav v literaturi, pri katerih so ugotovili, da je DTA občutljivejši od Sabouraudovega agarja (Elewski in sod., 2002; Rich in sod., 2003). Pri tem pa je potrebno poudariti, da v teh raziskavah niso upoštevali lažno pozitivnih rezultatov na DTA, saj niso preverili, kaj povzroča pozitivne rezultate na DTA, ko je bil Sabouraudov agar negativen.

Rezultate smo statistično analizirali z McNemarjevim testom parov. Pri stopnji značilnosti 0,05 smo dobili mejno vrednost ( $p = 0,057$ ). Rezultat lahko povzamemo na sledeč način: občutljivost DTA (BioMérieux, Marcy-l'Étoile, Francija) pri dokazovanju dermatofitov iz nohtov nog je približno enaka kot občutljivost Sabouraudovega agarja, ali celo slabša. Izračunana vrednost se nanaša samo na Sabouraudov agar; ker standardna mikološka preiskava vključuje tudi mikroskopski pregled, je občutljivost celotne metode za dokaz onihomikoze neprimerljivo boljša. Predvsem zaradi nekvalitetno odvzetega vzorca lahko

pri nativnem pregledu pričakujemo 5-15 % lažno negativnih rezultatov, ob primernem odvzemu bi se ta delež še znižal (Larone, 1996).

S Sabouraudovim agarjem smo onihomikozo nohtov nog v naši raziskavi dokazali pri 52 % bolnikov, z DTA (BioMérieux, Marcy-l'Etoile, Francija) pri 42 % (vključeni so vsi izolirani povzročitelji). Iz tega lahko sklepamo, da pri bolnikih z napredovalo onihomikozo nohtov nog s Sabouraudovim agarjem diagnozo potrdimo v 10 % pogosteje kot z DTA (BioMérieux, Marcy-l'Etoile, Francija). Razlika je posledica manjšega deleža zaznanih dermatofitov z DTA (BioMérieux, Marcy-l'Etoile, Francija), hkrati s Sabouraudovim agarjem prepoznamo tudi druge povzročitelje onihomikoze, ne samo dermatofite, kot pri DTA (BioMérieux, Marcy-l'Etoile, Francija). Pri naših preiskovancih smo iz treh vzorcev s Sabouraudovim agarjem izolirali *S. brevicaulis*, te glive smo z DTA (BioMérieux, Marcy-l'Etoile, Francija) zgrešili, kot bi tudi vse ostale nedermatofitne plesni in morebitne kvasovke.

V raziskavi smo se soočali z lažno pozitivnimi rezultati na DTA gojišču (BioMérieux, Marcy-l'Etoile, Francija), takšnih vzorcev je bilo 9. DTA gojišča (BioMérieux, Marcy-l'Etoile, Francija) so se obarvala rdeče, ko pa smo kolonije iz teh gojišč precepili na Sabouraudov agar, dermatofitov nismo izolirali, porasle so le plesni. Nobene od njih na osnovi makroskopskih značilnosti nismo opredelili za klinično pomembno. Obstaja možnost, da je prišlo do kontaminacije s klinično nepomembnimi plesnimi pri odvzemu kužnine, saj postopek ni steril, ali morda pri precepljanju. Na DTA (BioMérieux, Marcy-l'Etoile, Francija) so tako porasli dermatofiti, ki so obarvali gojišče in še najmanj ena plesen, ki ni povzročala barvnih sprememb. Ko smo te kolonije precepili na Sabouraudov agar, so morda plesni prerasle dermatofite in jih nismo uspeli izolirati. V tem primeru rezultat na DTA (BioMérieux, Marcy-l'Etoile, Francija) ni lažno pozitiven, vendar pa tega v naši raziskavi nismo mogli natančneje opredeliti. Enak rezultat bi lahko dobili tudi v primeru, da bi bolniki boleli za mešano okužbo. Kulture dermatofitov na DTA agarju (BioMérieux, Marcy-l'Etoile, Francija) so tudi lahko slabše uspevale in niso bile reprezentativne za naknadno identifikacijo.

Posledica lažno pozitivnih rezultatov DTA (BioMérieux, Marcy-l'Etoile, Francija) je bila nižja specifičnost gojišča, ki je znašala 90 %. Pri Sabouraudovem agarju smo izračunali, da specifičnost znaša 100 %. Po naših rezultatih obstaja tveganje, da bomo z DTA (BioMérieux, Marcy-l'Etoile, Francija) gojiščem približno 10 % oseb, ki nimajo okužbe z dermatofiti, določili kot da jo imajo.

Kolonije porasle na DTA (BioMérieux, Marcy-l'Etoile, Francija) smo želeli še dodatno pregledati in potrditi dermatofite z mikroskopiranjem, vendar smo pri tem naleteli na težavo. Nativni preparati, pripravljene iz teh kolonij, so bili neuporabni, saj so bili glivični elementi neprepoznavni. Makrokonidiji, s katerimi si pomagamo pri identifikaciji dermatofitov, so bili deformirani in v celoti spremenjeni, tako da nam niso bili v pomoč pri določitvi vrste. Podobne ugotovitve smo zasledili tudi v objavljeni literaturi (Larone, 1996). Težave smo imeli že pri postrganju kolonij iz gojišče, saj so bile le-te nanj zelo prirasle in je bilo težko dobiti primerni material. Zato se nam je pogosto zgodilo, da smo z ezo poleg kolonij zajeli tudi delce gojišča, ki so kasneje zelo motili mikroskopiranje.

Ugotovili smo, da mikroskopiranje kolonij iz DTA (BioMérieux, Marcy-l'Etoile, Francija) ni primerna metoda za identifikacijo dermatofitov. Kvalitetne preparate, s pomočjo katerih pa lahko identificiramo dermatofite, lahko pripravimo iz kolonij, ki so porasle na Sabouraudovem agarju. V primeru, da želimo določiti vrsto dermatofita, lahko glive iz DTA (BioMérieux, Marcy-l'Etoile, Francija) precepimo na Sabouraudov agar in nato kolonije, ki porastejo na tem gojišču, mikroskopiramo. Rast dermatofitov na DTA (BioMérieux, Marcy-l'Etoile, Francija) ni bila vedno bujna, včasih so porasle le drobne kolonije, katerih rast se je kmalu ustavila, zato precepljanje morda ni vedno uspešno. Za ugotavljanje vrste dermatofita lahko uporabimo tudi vse ostale teste, ki se v praksi uporabljajo za identifikacijo. Vendar pa pri dermatofitih izoliranih iz nohtov nog, ni potrebno določati vrste, saj antimikotiki niso vrstno specifični in učinkujejo proti vsem dermatofitom. Kot indikacija za antimikotično zdravljenje zadostuje že sama detekcija dermatofita v kužnini.

Čas kultivacije je krajši pri DTA (BioMérieux, Marcy-l'Etoile, Francija). Rezultate na tem gojišču smo odčitali v prvih 14 dneh. Pri DTA gojiščih (BioMérieux, Marcy-l'Etoile,

Francija) je bila intenzivnost rdeče barve različna, razlogov za to ne poznamo. Inkubacijski čas pri Sabouraudovem agarju je dosti daljši, na nekatere rezultate smo morali čakati tudi do 60 dni, prve smo dobili po 15 dneh, povprečno smo dobili rezultat 37. dan inkubacije. Močno skrajšan čas pri DTA (BioMérieux, Marcy-l'Etoile, Francija) izhaja iz dejstva, da se gojišče obarva že pri nizki koncentraciji alkalnih produktov, torej že na samem začetku rasti kolonij. Na Sabouraudovem gojišču pa morajo kolonije porasti do večjih razsežnosti, da jih lahko identificiramo na podlagi makroskopskih značilnosti.

Z raziskavo smo dokazali, da je DTA (BioMérieux, Marcy-l'Etoile, Francija) sicer res enostavnejša, hitrejša in cenejša metoda pri dokazovanju dermatofitov iz vzorcev nohtov nog, vendar pa te lastnosti izgubijo pomen ob slabši občutljivosti in specifičnosti v primerjavi s Sabouraudovim agarjem.

Na podlagi izsledkov raziskave DTA (BioMérieux, Marcy-l'Etoile, Francija) kot samostojne metode ne moremo priporočiti v širšo uporabo. Predlagamo, da se potrditev onihomikoze nohtov nog opravlja po ustaljenih poteh, torej v mikoloških laboratorijih s standardno mikološko preiskavo, ki vključuje nativni mikroskopski pregled in kultivacijo na Sabouraudovem agarju. Nepotrebno rabo antimikotikov pa še vedno lahko znižamo z doslednejšim pošiljanjem bolnikov s sumom na onihomikozo v mikološke laboratorije in s predpisovanjem le-teh samo bolnikom s potrjeno onihomikozo.

Edina možna uporaba DTA (BioMérieux, Marcy-l'Etoile, Francija) bi bila ob hkratni preiskavi z nativnim mikroskopskim pregledom in predpostavki, da bi kužnino odvzemali izurjeni laboratorijski tehniki in da bi izvide DTA (BioMérieux, Marcy-l'Etoile, Francija) odčitavalo ustrezno izobraženo in izkušeno osebje-v nejasnih primerih bi bili potrebni posveti z mikološkim laboratorijem.

Diagnoza onihomikoze temelji na dobri korelaciji med bolnikovo anamnezo, klinično sliko in izvidom mikološke preiskave. Zavedati se moramo, da negativen izvid ne izključuje možnosti glivične okužbe. Ob utemeljenem sumu in negativnem mikološkem izvidu je potrebno ponoviti mikološki pregled ali poseči po dodatnih diagnostičnih metodah (histologija nohtov). Taki bolniki potrebujejo specialistično obravnavo

## 5.2 SKLEPI

- DTA (BioMérieux, Marcy-l'Etoile, Francija) je enostavnejša metoda, gojišče je že pripravljeno za uporabo. Preprosto je tudi odčitavanje, opazujemo le spremembo barve gojišča.
- Časovni interval potreben za odčitanje rezultata in cena posamezne preiskave, v primerjavi s standardno mikološko preiskavo, sta močno v prid DTA (BioMérieux, Marcy-l'Etoile, Francija).
- Pri direktnem nativnem pregledu je prevladujoči najdeni glivični element micelij. S to metodo ni mogoče identificirati povzročitelja.
- Najvišji delež med izoliranimi povzročitelji zavzemajo dermatofiti in predstavljajo 93,7 % vseh pozitivnih kultur. Kvasovk kot povzročiteljev onihomikoze nismo izolirali, od ostalih patogenih gliv smo izolirali samo *S. brevicaulis* (v 6,3 %).
- DTA (BioMérieux, Marcy-l'Etoile, Francija) je slabša metoda pri dokazovanju dermatofitov iz vzorcev nohtov nog. Gojišče je manj občutljivo in specifično kot Sabouraudov agar.
- Nativni preparati, pripravljene iz kolonij na DTA (BioMérieux, Marcy-l'Etoile, Francija) so neuporabni, saj so glivični elementi neprepoznavni. Za določitev vrste je potrebno uporabiti standardne metode, ki se tudi sicer uporabljajo za identifikacijo.
- Na podlagi rezultatov raziskave, DTA (BioMérieux, Marcy-l'Etoile, Francija) ne moremo priporočiti v širšo uporabo. Predlagamo, da se potrditev diagnoze opravlja po ustaljeni poti, v mikoloških laboratorijih s standardno mikološko preiskavo.

## 6 POVZETEK

Onihomikoza je glivična okužba nohtov, ki jo povzročajo dermatofiti, kvasovke in nekatere plesni. Več kot 90 % onihomikoz nohtov nog povzročajo dermatofiti (Elewski in sod., 2002). Glivična okužba nohtov nog je v splošni populaciji zelo razširjena, po epidemioloških podatkih dosega obolevnost pri odraslih ljudeh približno 8 %. Vendar pa ocena prevalence variira od študije do študije in jo ponekod ocenjujejo tudi do 23 % (Roseeuw, 1999).

Povzročitelje onihomikoz dokazujemo s standardno mikološko preiskavo, ki vključuje nativni mikroskopski pregled in kultivacijo na Sabouraudovem agarju, ki še vedno velja za zlati standard v diagnostiki onihomikoz. Mikološko preiskavo opravljajo le nekateri specializirani laboratoriji v Sloveniji. Ker preiskava ni poceni, je časovno zamudna in je za nekatere bolnike zaradi oddaljenosti težje dostopna, se za potrditev diagnoze onihomikoze ne uporablja dosledno. S tem tvegamo, da bolniki uživajo sistemska antimikotična sredstva po nepotrebnem, tudi pri neglivičnih boleznih nohtov. Zaradi teh pomanjkljivosti smo se odločili preizkusiti DTA (BioMérieux, Marcy-l'Etoile, Francija). S tem gojiščem ne moremo identificirati dermatofita (rodu ali vrste), lahko pa ga na podlagi barvne spremembe gojišča zaznamo v kužnini. To pa zadostuje za potrditev diagnoze in pričetek zdravljenja. Ob ugodnih rezultatih bi test lahko priporočili v širšo uporabo in s tem zmanjšali število bolnikov, ki uživajo sistemske antimikotike tudi ob neglivičnih obolenjih nohtov nog, plačniku zdravljenja pa prihranili znatna sredstva.

V raziskavo smo vključili 142 preiskovancev, večina teh je bila napotena v Mikološki laboratorij Dermatovenerološke klinike UKC v Ljubljani, nekaj (9 vzorcev) smo zbrali na terenu. Pri vseh je na podlagi kliničnih znakov obstajal sum na onihomikozo, pacienti pa predhodno niso smeli biti zdravljeni z antimikotičnimi zdravili. Ugotovili smo, da se za preiskavo v večjem številu odločajo ženske, prav tako se te za zdravljenje odločajo v povprečju leto prej kot moški in imajo ob pregledu manjše število obolelih nohtov nog.

Vsak vzorec odvzete kužnine smo razdelili na tri dele. Del smo uporabili za mikroskopiranje s KOH, preostanek materiala smo nacepili na Sabouraudov agar in DTA

(BioMérieux, Marcy-I'Etoile, Francija). Pri direktnem nativnem pregledu smo kot najpogostejši glivični element opazili micelij, spore ali kvasovke smo videli samo v nekaj primerih. S Sabouraudovim agarjem smo identificirali glive kot povzročitelje onihomikoze pri 34,0 % preiskovancev. Po pričakovanjih najvišji delež zavzemajo dermatofiti in sicer predstavljajo 93,7 % vseh pozitivnih kultur. Kvasovk nismo izolirali, med plesnimi se je pojavila samo ena vrsta, to je *S. brevicaulis*, ki je bila izolirana v 6,3 % pozitivnih kultur. Med dermatofiti smo najpogosteje izolirali *T. rubrum* (70,8 % pozitivnih kultur), sledil mu je *T. mentagrophytes* (antropofilna podvrsta), *T. tonsurans* smo identificirali samo v enem primeru.

V 47 vzorcih smo določili dermatofite, od teh smo jih s Sabouraudovim agarjem izolirali 96 %, z DTA (BioMérieux, Marcy-I'Etoile, Francija) le 83 %. Vključujoč tudi bolnike z nativno pozitivnim izvidom, smo z DTA (BioMérieux, Marcy-I'Etoile, Francija) potrdili onihomikozo v 42 %, s Sabouraudovim agarjem v 52 %. Do razlike prihaja, ker smo s Sabouraudovim agarjem zaznali več dermatofitov, hkrati smo s tem gojiščem izolirali tudi ostale povzročitelje onihomikoze. Specifičnost DTA (BioMérieux, Marcy-I'Etoile, Francija) je bila 90 %, za 10 % nižja od Sabouraudovega agarja. V raziskavi smo se soočali z lažno pozitivnimi rezultati DTA (BioMérieux, Marcy-I'Etoile, Francija). Možna je kontaminacija ali mešana okužba, ko na DTA (BioMérieux, Marcy-I'Etoile, Francija) poraste dermatofit, ki obarva gojišče ter druga plesen, ki ne povzroča barvne spremembe. Po precepljanju je lahko plesen prerasla dermatofita, ki ga posledično nismo mogli opaziti. V tem primeru to niso lažno pozitivni rezultati, vendar pa tega nismo uspeli dokazati. Za ugotovitev lažno pozitivnih rezultatov bi bilo potrebno uporabiti bolj občutljivo metodo (PCR).

Ugotovili smo, da je DTA (BioMérieux, Marcy-I'Etoile, Francija) resnično cenejša, enostavnejša in hitrejša metoda pri dokazovanju dermatofitov, vendar pa pomen teh lastnosti zbledi ob slabši občutljivosti in specifičnosti v primerjavi s Sabouraudovim agarjem. Na podlagi izsledkov raziskave, DTA (BioMérieux, Marcy-I'Etoile, Francija) ne moremo priporočiti v širšo uporabo. Predlagamo, da se potrditev onihomikoze nohtov nog opravlja po ustaljeni poti, torej v mikoloških laboratorijih s standardno mikološko preiskavo.

## 7 VIRI

- BioMérieux. 2002. Dermatophyte agar, selective culture of dermatophytes-instruction. Marcy-l'Etoile, BioMérieux: 1-2
- Black J.G. 2005. Microbiology: principles and explorations. 6<sup>th</sup> ed. Arlington, John Wiley & Sons, Inc.: 308-308, 313-313
- Chen C., Hiruma M., Shiraki Y., Ogawa H. 2004. Combination therapy of once-weekly fluconazole (100, 150 or 300mg) with topical application of ketoconazole cream in the treatment of onychomycosis. Japanese Journal of Infectious Diseases, 57: 260-263
- Daniel C.R., Elewski B.E. 2000. Diagnosis of nail fungus infection revisited. Archives of Dermatology, 136: 1162-1164
- Dolenc-Voljč M. 2001. Odnos med povzročitelji in nekaterimi epidemiološkimi dejavniki pri bolnikih z onihomikozo. Magistrsko delo. Ljubljana, Medicinska fakulteta: 63 str.
- Dolenc-Voljč M. 2005. Dermatophyte infection in the Ljubljana region, Slovenia, 1995-2002. Mycoses, 48: 181-186
- Drake L.A., Scher R.K., Smith E.B., Faich G.A., Smith S.L., Hong J.J. Stiller M.J. 1998. Effect of onychomycosis on quality of life. Journal of the American Academy of Dermatology, 38, 5, Part 1: 702-704
- Elewski B.E. 1996. Diagnostic techniques for confirming onychomycosis. Journal of the American Academy of Dermatology, 35, 3, Part. 2: 6-9
- Elewski B.E. 1998. Onychomycosis: pathogenesis, diagnosis and management. Clinical Microbiology Reviews, 11, 3: 415-429



Elewski B.E., Leyden J., Rinaldi M.G., Atillasoy E. 2002. Office practice- based confirmation of onychomycosis. *Archives of Internal Medicine*, 162: 2133-2138

Escobar M.L., Carmona-Fonseca J. 2003. Onychomycosis by common non-dermatophyte moulds. *Revista Iberoamericana de Micologia*, 20, 1: 6-10

Evans E.G.V., Sigurgeirsson B. 1999. Double blind, randomised study of continuous terbinafine compared with intermittent itraconazole in treatment of toenail onychomycosis. *British Medical Journal*, 318: 1031-1035

Favre B., Ryder N.S. 1996. Characterization of squalen epoxidase activity from the dermatophyte *Trichophyton rubrum* and its inhibition by terbinafine and other antimycotic agents. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 40, 2: 443-447

Gawkrodger D. J. 2002. *Dermatology*. 3<sup>rd</sup> ed. Sheffield, Churchill Livingstone: 54-54

Gupta A.K., Cooper E.A., MacDonald P., Summerbell R.C. 2001. Utility of inoculum counting (Walshe and English criteria) in clinical diagnosis of onychomycosis caused by nondermatophytic filamentous fungi. *Journal of Clinical Microbiology*, 39, 6: 2115-2121

Gupta A.K., Jain H.C., Lynde C.W., Macdonald P., Cooper E.A., Summerbell R.C. 2000. Prevalence and epidemiology of onychomycosis in patients visiting physicians offices: a multicenter Canadian survey of 15,000 patients. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 43: 244-248

Gupta A.K., Jain H.C., Lynde C.W., Wateel G.N., Summerbell R.C. 1997. Prevalence and epidemiology of unsuspected onychomycosis in patients visiting dermatologists offices in Ontario, Canada - a multicentre survey of 2001 patient. *International Journal of Dermatology*, 26: 783-787

Gupta A.K., Shear N.H. 1999. The new oral antifungal agents for onychomycosis of the toenails. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 13: 1-13

- Hainer B. L. 2003. Dermatophyte infections. *American Family Physician*, 67, 1: 101-108
- Haneke E. 1991. Fungal infections of the nail. *Seminars in Dermatology*, 10, 1:41-53
- Ivetić V., Kersnik J. 2007. Diagnostične preiskave za vsakdanjo uporabo. Ljubljana, Zdrženje zdravnikov družinske medicine: 15-16
- Jaffe. R. 1998. Onychomycosis. *Archives of Family Medicine*, 7: 587-592
- Joish V.N., Armstrong E.P. 2002. Newer drugs and overall costs of treating onychomycosis. *Revista Iberoamericana de Micologia*, 19: 130-132
- Katz H. I. 1998. How should managed care treat onychomycosis? *American Journal of Managed Care*, 4, 10: 1471-1479
- Košmelj K. 2001. Uporabna statistika. Ljubljana, Biotehniška fakulteta Univerze v Ljubljani: 200 str.
- Larone D.H. 1996. Culture and identification of dermatophytes. *Clinical Microbiology Newsletter*, 18, 5: 33-38
- Midgley G., Moore M.K., Cook J.C., Phan Q.G. 1994. Mycology of nail disorders. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 31: 68-74
- Monod M., Lechenne B., Jousson O., Grand D., Zaugg C., Stocklin R. Grouzmann E. 2005. Aminopeptidases and dipeptidyl-peptidases secreted by the dermatophyte *Tychothyton rubrum*. *Microbiology*, 151: 145-155
- Osborne C.S., Hofbauer B., Favre B., Ryder N.S. 2003. In vitro analysis of the ability of *Trichophyton rubrum* to become resistant to terbinafine. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47, 11: 3634-3636

- Osborne C.S., Leitner I., Hofbauer B., Fielding C.A., Favre B., Ryder N.S. 2006. Biological, biochemical, and molecular characterization of a new clinical *Trichophyton rubrum* isolate resistant to terbinafine. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50, 6: 2234-2236
- Perea S., Ramos M.J., Garau M., Gonzalez A., Noriega A.R., Palacio A. 2000. Prevalence and risk factors of tinea unguium and tinea pedis in the general population in Spain. *Journal of Clinical Microbiology*, 38, 9: 3226-3230
- Piraccini B.M., Tosti A. 2004. White superficial onychomycosis: epidemiological, clinical, and pathological study of 79 patients. *Archives of Dermatology*, 140: 696-701
- Rich P., Harkless L.B., Atillasoy E.S. 2003. Dermatophyte test medium culture for evaluating toenail infections in patients with diabetes. *Diabetes Care*, 26, 5: 1480-1484
- Roberts D.T., Taylor W.D., Boyle J. 2003. Guidelines for treatment of onychomycosis. *British Journal of Dermatology*, 148: 402-410
- Romano C., Gianni C., Difonzo E.M. 2005. Retrospective study of onychomycosis in Italy: 1985-2000. *Mycoses*, 48: 42-44
- Roseeuw D. 1999. Achilles foot screening project: preliminary results of patients screened by dermatologists. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 12, Suppl. 1: 6-9
- Salkin I.F. 1973. Dermatophyte test medium: evaluation with nondermatophytic pathogens. *Applied Microbiology*, 26, 2: 134-137
- Salkin I.F., Hollick G.E., Hurd N.J., Kemna M.E. 1985. Evaluation of human hair sources for the in vitro hair perforation test. *Journal of Clinical Microbiology*, 22, 6: 1048-1049
- Salkin I.F., Padhye A.A., Kemna M.E. 1997. A new medium for the presumptive identification of dermatophytes. *Journal of Clinical Microbiology*, 35, 10: 2660-2662

Scher R.K. 1998. Evaluation and treatment of onychomycosis. *Western Journal of Medicine*, 169, 4: 224-225

Seznam medsebojno zamenljivih zdravil z najvišjo priznano vrednostjo. 2007. Recept: bilten o zdravilih iz obveznega zdravstvenega zavarovanja: bilten Zavoda za zdravstveno zavarovanje Slovenije o zdravilih iz obveznega zdravstvenega zavarovanja, 5, 2: 2-18

Sigurgeirsson B, Olafsson J.H., Steinsson J.P., Paul C., Billstein S., Evans E.G.V. 2002. Long-term effectiveness of treatment with terbinafine vs itraconazole in onychomycosis. *Archives of Dermatology*, 138: 353-357

Sinski J.T., Swanson J.R., Kelley L.M. 1972. Dermatophyte test medium: clinical and quantitative appraisal. *Journal of Investigative Dermatology*, 58, 6: 405-411

Sterry W., Paus R., Burgdorf W. 2006. *Dermatology*. 6<sup>th</sup> ed. Stuttgart, Georg Thieme Verlag KG: 106-107

Szepietowski J.C., Reich A., Garlowska E., Kulig M., Baran E. 2006. Factors influencing coexistence of toenail onychomycosis with tinea pedis and other dermatomycoses. *Archives of Dermatology*, 142: 1279-1284

Szepietowski J.C., Reich P., Garlowska E., Baran E. 2007. Evaluation of quality of life in patients with toenail onychomycosis-specific questionnaire. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 21, 4: 491-496

Thomas B. 2003. Clear choices in managing epidermal tinea infection. *Journal of Family Practice*, 52, 11: 850-862

Tosti A., Baran R., Piraccini B.M., Fanti P.A. 1999. »Endonyx« onychomycosis: a new modality of nail invasion by dermatophytes. *Acta Dermato-Venereologica*, 79: 52-53

Tosti A., Hay R., Arenas-Guzmán R. 2005. Patients at risk of onychomycosis-risk factor identification and active prevention. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 19,1: 13-16

Treating nail fungus: take the right steps. 2004. *Diabetes Educator*, 30, 3: 389-391

Tsuboi R., Ko I., Takamori K., Ogawa H. 1989. Isolation of a keratinolytic proteinase from *Trichophyton mentagrophytes* with enzymatic activity at acidic pH. *Infection and Immunity*, 57, 11: 3479-3483

Uitenbroek D.G. 1997. Binomial-SISA. Hilversum, Consultancy for Research and Statistics.  
<http://www.quantitativeskills.com/>(20.12.2007): software

Wang L., Ma L., Leng W., Liu T., Yu L., Yang J., Yang L., Zhang W., Zhang Q., Dong J., Xue Y., Zhu Y., Xu X., Wan Z., Ding G., Yu F., Tu K., Li Y., Li R., Shen Y., Jin Q. 2006. Analysis of the dermatophyte *Trichophyton rubrum* expressed sequence tags. *BioMed Central Genomics*, 7: 1-13  
<http://www.biomedcentral.com> (14.7.2007): 13 str.

Weitzman I., Summerbell R. 1995. The dermatophytes. *Clinical Microbiology Reviews*, 8, 2: 240-259

Williams H. 2003. Evidence-based dermatology. London, British Medical Journal Publishing Group  
<http://www.blackwellpublishing.com> (4.11.2007): 441 str.

Yang J., Chen L., Wang L., Zhang W., Liu T., Jin Q. 2007. TrED: the *Trichophyton rubrum* Expression Database. *BioMed Central Genomics*, 8: 1-6  
<http://www.biomedcentral.com> (23.6.2007): 6 str.

Yazdanparast S.A., Barton R.C. 2006. Arthroconidia production in *Trichophyton rubrum* and a new ex vivo model of onychomycosis. *Journal of Medical Microbiology*, 55: 1577-1581

## ZAHVALA

Zahvaljujem se prof. dr. Alojzu Ihanu za sprejetje mentorstva, saj mi je s tem omogočil izvedbo zelo prijetne diplomske naloge.

Pri nastajanju diplomskega dela se iskreno zahvaljujem delovni mentorici asist. dr. Mateji Dolenc-Voljč, ki me je sprejela v svoj laboratorij, me vodila pri raziskovalnem delu in me potrpežljivo usmerjala pri nastajanju pisne oblike.

Za korekten pregled diplomskega dela se zahvaljujem tudi recenzentki prof. dr. Katji Seme.

Dragi moji študijski prijatelji, zaradi vas je študij mikrobiologije bogatejši! Hvala za vsak polepšan dan!

Za vse spodbudne besede in pozitivno usmerjene misli se zahvaljujem svojim dolgoletnim prijateljem. Zaradi vas je vse lažje in lepše!

Nenazadnje se zahvaljujem svoji družini, ki me je podpirala in spodbujala, ne samo pri nastajanju končnega izdelka, ampak tekom celotne šolske in študijske poti. Hvala, da ste verjeli vame!

## **PRILOGA**

Priloga A: Anketni list



Klinični center Ljubljana  
Dermatovenerološka klinika  
Zaloška cesta 2, Ljubljana  
Mikološki laboratorij

---

---

Datum: \_\_\_\_\_

Ime in priimek:

\_\_\_\_\_

Naslov:

\_\_\_\_\_

Datum rojstva: \_\_\_\_\_

Spol:

<input type="checkbox"/> Ž	<input type="checkbox"/> M
----------------------------	----------------------------

Poklic:

\_\_\_\_\_

Prizadeti nohti:

Desna noga	Leva noga

Spremembe:

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Skica:



Mesto odvzema kužnine: \_\_\_\_\_

Čas trajanja sprememb: \_\_\_\_\_

Predhodno zdravljenje:

\_\_\_\_\_

Pridružene bolezni:

\_\_\_\_\_

Športne dejavnosti: \_\_\_\_\_

Klinični center Ljubljana  
Dermatovenerološka klinika  
Zaloška cesta 2, Ljubljana  
Mikološki laboratorij

---

---

## IZVID MIKOLOŠKE PREISKAVE

### 1. Nativni izvid

---

---

---

### 2. Kultura

Datum odčitavanja: \_\_\_\_\_

---

---

---

### 3. Dermatofitni testni agar (DTA)

Dan inkubacije	Sprememba barve	Rast kolonij

Opombe:

---

---

---

---

---