

# ПРИМЕНЕНИЕ ПЦР ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ДНК ГРИБОВ В ОБРАЗЦАХ НОГТЕЙ У БОЛЬНЫХ ОНИХОМИКОЗОМ

Я.Ф. Кутасевич, А.П. Белозоров, А.С. Чеховская,  
И.А. Олейник, Т.В. Частий

ГУ «Институт дерматологии и венерологии НАМН Украины»

**Резюме.** В работе приводятся результаты применения полимеразной цепной реакции для диагностики онихомикозов. Показано, что этот метод обладает большей чувствительностью по сравнению с микроскопическим или культуральным исследованием и дает возможность идентифицировать видовую принадлежность возбудителей. Полученные результаты указывают на необходимость внедрения разработанного метода диагностики в клиническую практику.

**Ключевые слова:** ПЦР, молекулярно-генетические методы, культуральное исследование, онихомикоз, дерматофитии, амплификация, олигонуклеотидные праймеры.

## ВСТУПЛЕНИЕ

Диагностика онихомикоза в настоящее время основывается, преимущественно, на микроскопических и культуральных методах исследования. В работе А.А. Кубанова и Н.В. Фриго (n=330) дерматофиты от больных из разных регионов России были выделены в 91,1 % случаев, *Candida spp.* - 15,4 %, а плесневые грибы - в 13,5%, при этом отмечалось значительное число смешанных инфекций/посевов. Доля *T. rubrum* в структуре дерматофитии ногтей составляла 70,5 %, *T. mentagrophytes var. interdigitale* - 15,25 % [2]. В работе польских исследователей частота выделения *T. rubrum* при онихомикозе составила 46 % [10]. В Турции для обследования 1146 больных онихомикозом использовали повторное культивирование с целью уточнения этиологии. Дерматофиты были выделены в 48 % случаев, *Candida spp.* - в 41 %, плесневые грибы в 9 % [12]. Культуральное исследование, произведенное нами на базе ГУ «Институт дерматологии и венерологии

НАМН Украины», среди 350 больных с клиническим диагнозом онихомикоза дало рост культур дерматофитов в 68,1 % случаев, при этом доля *T. rubrum* составляла 84,3 %, а *T. mentagrophytes* – 15,7 %. *Candida spp.* составила- 21,3 %, плесневые грибы в 10,6 %.

Необходимо отметить, что в значительной части случаев поражений ногтевых пластинок, сходных по клиническим проявлениям с онихомикозом, при использовании традиционных методов выявить грибы не удастся. Это свидетельствует о важности поиска новых, более эффективных и, вместе с тем, пригодных для повседневного использования методов лабораторного подтверждения диагноза, наряду с установлением этиологии инфекции, в качестве которых могут быть методы молекулярной диагностики, основанные на полимеразной цепной реакции. Это подтверждается опытом использования генодиагностики в венерологии и диагностикой ряда контагиозных инфекций человека, вызванных облигатно-патогенными возбудителями [5,9]. Вместе

с тем, в клинической микологии использование молекулярных методов диагностики все еще находится в фазе становления и развития. Имеются лишь отдельные данные литературы по этому вопросу [11,13]. Все это свидетельствует о необходимости изучения возможности применения современных молекулярных методов диагностики, для этиологической диагностики поражений ногтевых пластинок.

**Целью данного исследования** является изучение эффективности применения молекулярных методов диагностики, основанных на ПЦР, для подтверждения диагноза онихомикоза и идентификация наиболее часто встречающихся возбудителей, поражающих ногтевые пластинки.

## **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

Всего в исследовании приняли участие 196 пациента в возрасте от 23 до 79 лет. Из них 166 пациентов, которые обращались по поводу поражения ногтевых пластин пальцев кистей и стоп и 30 пациентов, у которых ногтевые пластины без клинических изменений и с негативным результатом микроскопии, культурального исследования. Всем было выполнено микроскопическое и культуральное исследование ногтей. Микологическое исследование ногтевых пластин у пациентов проводили методом микроскопии неокрашенных препаратов с предшествующей обработкой (просветлением) исследуемого материала [1]. Молекулярно-генетическое исследование проводилось в лаборатории иммунологии, патоморфологии и молекулярной генетики ГУ «Институт дерматологии и венерологии НАМН Украины». Праймеры были синтезированы в НПФ «ЛИТЕХ» (Россия), использована смесь для ПЦР и Taq- полимеразы производства фирмы «Сибэнзим» (РФ).

С целью качественного выделения культуры и исключения ложноотрицательных результатов из образцов ногтей от больных онихомикозом, необходимо придерживаться общего принципа забора материала - брать

материал из тех частей ногтя, где наиболее вероятно существование активной (жизнеспособной и дающей рост в культуре) колонии грибов. Используя при этом наиболее доступный набор оборудования (скальпель, ножницы - кусачки, кюретка, лезвие). Методика сбора материала для ПЦР и регламентированных методов была стандартной. Конкретный участок ногтя, из которого брали материал, определялся типом поражения и клинической формой онихомикоза. Перед взятием материала удалялось загрязнение с поверхности ногтя путем распаривания в мыльно-содовой ванночке и обработкой ногтя тампоном, смоченным 70 % раствором медицинского спирта. Материал забирали скальпелем, или лезвием бритвы. Фрагменты ногтя (срезы) удаляли маникюрными ножницами или кусачками. При поверхностной форме онихомикоза скальпелем или лезвием бритвы выполняли соскобы с поверхности ногтевой пластинки в пораженной области. Соскабливали до появления слоев, не пораженных грибом. При дистально-латеральной подногтевой форме онихомикоза брали фрагменты ногтевой пластинки, а при наличии гиперкератоза роговые массы собирали путем соскоба острым концом скальпеля из-под ногтевой пластины, при этом первые порции соскоба также не употребляли для анализа, поскольку они в наибольшей степени подвержены бактериальной, грибковой и прочей контаминации. При проксимальной подногтевой форме материал собирали при удалении всей ногтевой пластинки, или ее проксимальной части с помощью скальпеля [4].

Выделение ДНК проводили из фрагментов ногтевых пластин фенольным методом [3].

Исследование проводили с пангрибковыми праймерами и праймерами, специфичными для *T. rubrum*. После отрицательного результата микроскопического исследования больным с клиническими проявлениями онихомикоза проводили пангрибковую ПЦР в качестве скринингового метода с целью обнаружения ампликонов патологического грибка. Если же пангрибковая полимеразная

реакция и микроскопическое исследование у больных оказывались положительными, нами проводилась полимеразная цепная реакция специфичная для *T. rubrum* с целью выявления наиболее часто встречающегося возбудителя онихомикозов из дерматофитов - *T. rubrum*.

В качестве пангрибковых праймеров использовали ITS4 5'-TCCTCCGCTTATGATATGC и ITS5 5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3' [8]. Для выявления ДНК *T. rubrum* использовали праймеры Uni, 5'-TCTTTGAACGCACATTGCGCC-3' и Trubrum-rev, 5'CGGTCCTGAGGGCGCTGAA3' [8]. Амплификацию проводили в объеме 25 мкл смеси с добавлением 4 мкл ДНК в термоциклере (Терцик), она включала один начальный цикл денатурации в течение 5 мин при температуре 94°C и 45 циклов со следующим режимом: 30 секунд при температуре 94°C, 30 секунд при температуре 60°C и 30 с расширения при темпера-

туре 72 °С (режим для проведения реакции специфичной для *T. rubrum*). [6].

Амплификацию с пангрибковыми праймерами проводили в объеме 25 мкл смеси с добавлением 4 мкл ДНК в термоциклере (Терцик), она включала один начальный цикл денатурации в течение 5 мин при температуре 94 °С и 25 – 30 циклов со следующим режимом: 15 секунд при температуре 95 °С, 50 °С - 10 секунд, 60 °С - 4 мин [7,8].

Продукты амплификации разделяли электрофорезом в 1,5 % геле агарозы с 0,5 мМ этидиум бромид в течение 15 минут, после чего анализировали на трансиллюминаторе при длине волны возбуждающего света 310 нм. В качестве стандарта маркера молекулярной массы использовали маркер молекулярной массы SM 1191 "Fermentas" Литва. Ампликоны, полученные при использовании пангрибковых праймеров имели длину от 600 до 700 п.н., для *T. rubrum* размер ампликона составлял 366 п. н.. Результаты проведенного исследования представлены на рис. 1, рис. 2.

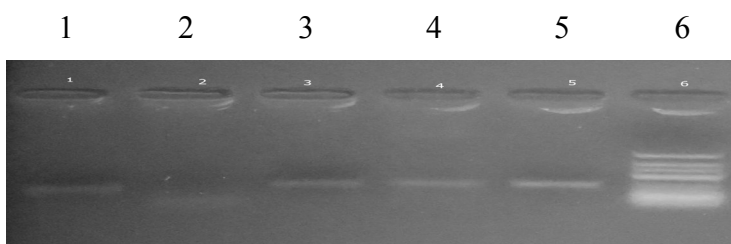


Рисунок 1. Пример проведения анализа ампликонов ПЦР, специфичной для *T. rubrum*

Примечания.

1-5 - клинические образцы, из них 1, 3, 4, 5 положительные,

2 - отрицательный

6 - маркер молекулярной массы – 700, 500, 400, 300, 200, 150, 100 п.н. (сверху вниз).

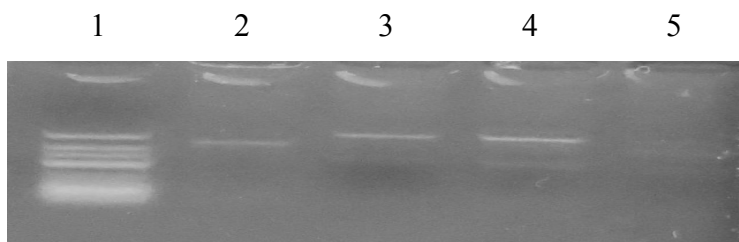


Рисунок 2. Пример проведения анализа ампликонов ПЦР, с панфунгальными праймерами

Примечания.

1 - маркер молекулярной массы – 700, 500, 400, 300, 200, 150, 100 п.н. (сверху вниз)

2 - 5 - клинические образцы, из них 2, 3, 4 положительные результаты,

5 - отрицательный результат.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Из 166 образцов от больных с клинической картиной онихомикоза методом ПЦР -81 показали положительный результат, 85 - отрицательный результат. При микроскопии-этих же образцов обнаружен патологический мицелий был только в 59 образцах, а 107 показали отрицательный результат. Культурально было высеяно патологического мицелия в 51 образцах из 115.

При исследовании 30 образцов ногтевых пластин здоровых лиц стандартными методами исследования - все показали отрицательные результаты, а методом ПЦР - 29 образцов данной группы были отрицательными и один образец № 7 показал положительный результат на наличие ампликонов *T. rubrum*. Результаты ПЦР, микроскопии и культивирования распределены по соответствующим таблицам. Результаты проведения ПЦР-анализа представлены в таблице 1.

Таблица 1

Результаты ПЦР у пациентов с патологией ногтей

Результат ПЦР	Пациенты			
	Количество пациентов с клиническими признаками патологии ногтей (n=166)		Количество пациентов без клинических признаков патологии ногтей (n=30)	
	Абс.	%	Абс.	%
Положительный	81	48,8%	1	3,3%
Отрицательный	85	51,2%	29	96,7%
Всего	166	100%	30	100,0%

Представляет интерес анализ возможных причин одного положительного результата исследования на *T. rubrum* в группе контроля, к ним можно отнести:

1) Это ложноположительный результат, связанный с контаминацией ампликонами. Для исключения этого необходимо проведение повторного исследования с включением серии контролей, позволяющих исключить контаминацию.

2) Положительный результат мог быть следствием случайного попадания возбудителя в исследуемый материал (ноготь) вне лаборатории. Данное предположение достаточно вероятно в связи тем, что близким родственником исследуемой является больной онихомикозом. Совпадают ли вид возбудителя в этих двух случаях? Промывался ли ноготь перед взятием материала? Необходимо было бы повторно взять материал у этой больной с нескольких ногтей.

3) Возможно, полученный положительный результат отражает начальную стадию инфекции, кода возбудитель уже внедрился в ткань, но изменение структуры его еще трудно обнаружить. Необходимо повторное наблюдение за клиникой.

Для уточнения диагноза были проведены повторная микроскопия, ПЦР специфичная для *T. rubrum* и проведено дерматоскопическое исследование (как дополнение к визуальной оценке). Микроскопия ногтевых пластин повторно оказалась отрицательной, а ПЦР снова положительной. При дерматоскопическом исследовании были выявлены первые признаки начинающегося онихомикоза: онихолизис ногтевой пластины от свободного края, желто-серая окраска в дистальном отделе, помутнение пластинки, расслоение свободного края. На основании проведенных обследований пациентке был поставлен диагноз: онихомикоз и назначена

соответствующая терапия. Таким образом, использование ПЦР-диагностики позволило выявить онихомикоз на ранней стадии заболевания и вовремя предупредить дальнейшее распространение инфекции. После проведенного лечения образцы, полученные у больной, давали стабильно отрицательные результаты.

Из 81 положительных образцов, полученных методом полимеразной цепной реакции - положительная микроскопия оказалась только у 59 пациентов,

что составляет 72,8%, культурально диагноз онихомикоза был подтвержден только у 51 больных - 62,7%. Из проведенных исследований видно, что большой процент пациентов с подозрением на онихомикоз при микроскопии (27,2%) и еще больший (37,3%) при культуральном посеве остаются недиагностированными, и представляют собой длительный источник распространения микотической инфекции с большой вероятностью хронизации процесса и развитием осложнений (табл. 2).

Таблица 2

**Сравнительные результаты диагностических методов у пациентов с патологией ногтей**

Методы диагностики	Количество пациентов с положительными результатами (n=81)	
	Абс.	%
ПЦР	81	48,8%
Микроскопия	59	35,5%
Культуральное исследование	51	30,7%

Информативность полимеразной цепной реакции в диагностике онихомикозов превышает стандартные методы исследования: микроскопию на 13,3% и культуральное исследование на 18,1%. До сих пор возникают вопросы и сомнения по поводу объективности ПЦР, наличием ложноположительных результатов. В связи с этим хотелось бы остановиться на тех пациентах, которым диагноз онихомикоза был подтвержден только

методом полимеразной цепной реакции. Им также как и другим пациентам, нами соответственно клинической форме и объему поражения было проведено противогрибковое лечение. Отрастание здоровых ногтей пластин, положительная клиническая динамика свидетельствовали о правильности поставленного диагноза. Среди 81 положительных результатов ПЦР была проведена идентификация патогенных грибов (таб. 3):

Таблица 3

**Результаты идентификации патогенных грибов у пациентов с патологией ногтей**

Виды	Количество пациентов (n=81)	
	Абс.	%
Trichophytonrubrum	61	75,3%
Pan-Fungalis(положительный при отрицательном результате T.rubrum)	20	24,7%

Сравнивая полученные результаты можно отметить, что лидирующее место среди дерматофитов, как возбудителей онихомикоза занимает *Trichophyton rubrum* – выделен у 61 (75,3%) пациента. Обнаружение у 20 больных нескольких видов патогенных грибов *Pan-Fungalis* в 24,7% случаев, позволяет расценивать их заболевание как микст-инфекцию и предопределяет особенности назначения этиотропной терапии. Появление эффективного метода генодиагностики онихомикозов ногтей открывает перед клиницистами новые перспективы: прежде всего, высокочувствительной экспресс - диагностики онихомикозов с видовым определением возбудителя. Использование же пангрибковых праймеров позволяет однозначно установить присутствие грибов в исследуемом материале, однако установление видовой характеристики возбудителя требует дополнительного исследования с использованием специфических праймеров.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Аравийский Р. А. Практикум по медицинской микологии / Р. А. Аравийский, Г. И. Горшкова. – СПб.: Изд-во СПбМАПО, 1995. – 40с.
2. Кубанов А.А. Результаты многоцентрового скринингового исследования этиологической структуры возбудителя онихомикоза в Российской Федерации/ А.А. Кубанов, Н.В. Фриго // Вестник дерматологии и венерологии. – 2007. – № 4. – С. 6-11.
3. Северин С.Е. Практикум по биохимии / С.Е. Северин, Г.А. Соловьева. – М.: Изд. МГУ, 1989. – 509.
4. Сергеев А. Ю. Руководство по лабораторной диагностике онихомикозов / А. Ю. Сергеев – М.: Гэотар медицина, 2000. – 154 с.
5. Сергеев В.Ю. Молекулярная диагностика онихомикозов: опыт внедрения

## ВЫВОДЫ

Проведенное исследование подтвердило высокую чувствительность нового метода, позволяющего всего за сутки подтверждать диагноз онихомикоза (с определением вида патогенного гриба) и позволило выявить большее количество пациентов с онихомикозом. Анализ результатов молекулярно-генетических исследований указывает на необходимость пересмотра существующих подходов к диагностике и оценке этиологии онихомикоза. Внедрение ПЦР-системы позволит сформировать новые алгоритмы лабораторной диагностики онихомикоза, повысить общую эффективность и существенно сократить сроки ее проведения.

Таким образом, применение метода ПЦР для ранней диагностики онихомикозов позволит усовершенствовать процесс выявления возбудителя у пациентов с предыдущими негативными стандартными микологическими результатами исследования и своевременно назначить адекватную терапию, снизить вероятность развития осложнений и ускорить процесс выздоровления.

## REFERENCES

1. Arabian R.A., Gorshkova G.I. Workshop on Medical Mycology – St. Petersburg. Univ MAPS, 1995. – 40 p.
2. Kubanov A.A. Frigo N.V. Results of a multicenter screening study of etiological structure of the pathogen of onychomycosis in the Russian Federation // Journal of Dermatology and Venereology. – 2007. – № 4. – P. 6-11.
3. Severin S.E., Solovyova G.A. Practical work on biochemistry. – M.: Publ. of MSU, 1989. – 509 p..
4. Sergeev Y.U. Manual for the laboratory diagnosis of onychomycosis. – M. GEOTAR Medicine, 2000. – 154 p.
5. Sergeev V.Y. Molecular diagnosis of onychomycosis: implementation of national PCR detection of pathogens tinea nail /

отечественной ПЦР-системы обнаружения возбудителей дерматофитии ногтей / В.Ю. Сергеев // Иммунопатология, аллергология, инфектология. –2007. – № 3. – С. 17-24.

6. Brillowska-Dabrowska A. Five-Hour Diagnosis of Dermatophyte Nail Infections with Specific Detection of *Trichophyton rubrum* / A. Brillowska-Dabrowska, D. M.Saunte, M.C. Arendrup // *Journal of Clinical Microbiology*. – 2007. –Vol. 45. – N 4. – P. 1200-1204.

7. Cost-effectiveness of diagnostic tests for toenail onychomycosis: a repeated-measure, single-blinded, cross-sectional evaluation of 7 diagnostic tests / K.K. Lilly, R.L. Koshnick, J.P. Grill // *J. Am. Acad. Dermatol.* – 2006. –Vol. 55. – N 4. – P. 620 -626.

8. Identification and typing of *Malassezia* species by amplified fragment length polymorphism and sequence analyses of the internal transcribed spacer and large-subunit regions of ribosomal DNA / A.K. Gupta, T. Boekhout, B. Theelen // *Journal of Clinical Microbiology*. – 2004. –Vol. 42. – N 9. – P. 4253 -4260.

9. Feuilhade de Chauvin M. New diagnostic techniques/ M. Feuilhade de Chauvin // *J. Eur. Acad. Dermatol. Venerol.* – 2005. – Vol. 19. – Suppl 1. – P. 20-24.

10. Maleszka R. The importance of mycological investigations in diagnostics of nail changes / R.Maleszka, V. Ratajczak-Stefanska, D. Mikulska // *Rocz. Akad. Med. Bialymst.* – 2005. – Vol.50. – Suppl. 1. – P. 36-38.

11. Mennink-Kersten M.A. Non-culture-based diagnostics for opportunistic fungi/ Mennink-Kersten, Verweij P.E.// *Infect. Dis. Clin. North. Am.* – 2006. – Vol. 20. – N 3. – P. 711 – 727.

12. Non-dermatophytic molds as agents of onychomycosis in Izmir, Turkey - a prospective study/ M.A. Hilmioglu-Polat S., D.Y. Metin, R. Inci, et al. // *Mycopathologia*. – 2005. – Vol. 160. – N 2. – P. 125 - 128.

13. Non-culture based diagnostic tests for mycotic infections/ E. Reiss, T. Obayashi, K. Orle et al. // *Med. Mycol.* – 2000. – Vol. 38. – Suppl 1. – P. 147-159.

*Immunopathology, Allergology, infektologiya.* –2007. – № 3. – P. 17-24.

6. Brillowska-Dabrowska A., Saunte D. M., Arendrup M.C. Five-Hour Diagnosis of Dermatophyte Nail Infections with Specific Detection of *Trichophyton rubrum* // *Journal of Clinical Microbiology*. – 2007. –Vol. 45, N 4. – P. 1200–1204.

7. Lilly K.K., Koshnick R.L., Grill J.P. Cost-effectiveness of diagnostic tests for toenail onychomycosis: a repeated-measure, single-blinded, cross-sectional evaluation of 7 diagnostic tests // *J. Am. Acad. Dermatol.* – 2006. –Vol. 55, N 4. – P. 620 -626.

8. Gupta A.K., Boekhout T., Theelen B. Identification and typing of *Malassezia* species by amplified fragment length polymorphism and sequence analyses of the internal transcribed spacer and large-subunit regions of ribosomal DNA // *Journal of Clinical Microbiology*. – 2004. –Vol. 42, N 9. – P. 4253 –4260.

9. Feuilhade de Chauvin M. New diagnostic techniques // *J. Eur. Acad. Dermatol. Venerol.* – 2005. – Vol. 19. – Suppl 1. – P. 20-24.

10. Maleszka R., Ratajczak-Stefanska V., Mikulska D. The importance of mycological investigations in diagnostics of nail changes // *Rocz. Akad. Med. Bialymst.* – 2005. – Vol.50. – Suppl. 1. – P. 36-38.

11. Mennink-Kersten M.A., Verweij P.E. Non-culture-based diagnostics for opportunistic fungi // *Infect. Dis. Clin. North. Am.* – 2006. – Vol. 20, N 3. – P. 711 - 727.

12. Hilmioglu-Polat S., Metin D.Y., Inci R., et al. Non-dermatophytic molds as agents of onychomycosis in Izmir, Turkey - a prospective study// *Mycopathologia*. – 2005. – Vol. 160, N 2. – P. 125 - 128.

13. Reiss E., Obayashi T., Orle K. et al. Non-culture based diagnostic tests for mycotic infections // *Med. Mycol.* – 2000. – Vol. 38. – Suppl 1. – P. 147-159.

**ЗАСТОСУВАННЯ ПЛР ДЛЯ  
ВИЯВЛЕННЯ ДНК ГРИБІВ  
У ЗРАЗКАХ НІГТІВ ХВОРИХ  
НА ОНІХОМІКОЗ**

**Кутасевич Я.Ф.,  
Белозоров О.П.,  
Чеховська Г.С.,  
Олійник І.О.,  
Частій Т.В.**

*ДУ «Інститут дерматології  
та венерології НАМН України»*

**Резюме:** В роботі наводяться результати застосування полімеразної ланцюгової реакції для діагностики оніхомікозів. Показано, що цей метод має більшу чутливість в порівнянні з мікроскопічним або культуральним дослідженням і дає можливість ідентифікувати видovu приналежність збудників. Отримані результати вказують на необхідність впровадження розробленого методу діагностики в клінічну практику.

**Ключові слова:** полімеразна ланцюгова реакція, ПЛР, молекулярно-генетичні методи, культуральне дослідження, оніхомікоз, дерматофітії, ампліфікація, олігонуклеотидні праймери.

**Об авторах:**

Кутасевич Янина Францевна – доктор мед. наук, профессор, директор ГУ «Інститут дерматологии и венерологии НАМН Украины»;

Белозоров Алексей Павлович – доктор мед. наук, зав. лаборатории иммунологии, патоморфологии и молекулярной генетики ГУ «Інститут дерматологии и венерологии НАМН Украины»;

Чеховская Анна Сергеевна – врач-дерматовенеролог высшей категории, КУОЗ «Харьковская городская поликлиника № 22», диспансерное кожно-венерологическое отделение; e-mail: [anya.likar@gmail.com](mailto:anya.likar@gmail.com)

Олейник Ирина Александровна – доктор мед. наук, главный научный сотрудник отдела дерматологии, инфекционных и паразитарных заболеваний кожи ГУ «Інститут дерматологии и венерологии НАМН Украины»;

Частий Татьяна Владимировна – младший научный сотрудник лаборатории иммунологии, патоморфологии и молекулярной генетики ГУ «Інститут дерматологии и венерологии НАМН Украины».

**APPLICATION OF PCR TO  
DETECT FUNGAL DNA IN  
SAMPLES FROM PATIENTS  
WITH ONYCHOMYCOSIS NAIL**

**Kutasevych Y.F.,  
Oleinik I.A.,  
Belozorov A.P.,  
Chehovskaya A.S.,  
Chastiy T.V.**

*SE "Institute of Dermatology and  
Venereology of the NAMS of Ukraine"*

**Abstract.** The paper presents results of the polymerase chain reaction for the diagnosis of onychomycosis. It is shown that this method is more sensitive compared with microscopic or culture and gives you the opportunity to identify the species of pathogens. The results indicate the need for implementation of this method of diagnosis in clinical practice.

**Keywords:** polymerase chain reaction, PCR, molecular genetic techniques, cultural studies, onychomycosis, tinea, amplification, oligonucleotide primers.