

PUBLIKACJE METODYCZNE I STANDARDY

ADVANCEMENTS OF MICROBIOLOGY – POSTĘPY MIKROBIOLOGII
2019, 58, 4, 483–494
DOI: 10.21307/PM-2019.58.4.483



MOLEKULARNE METODY DIAGNOSTYKI DERMATOMYKOZ – PRZEGLĄD DOSTĘPNYCH TECHNIK ORAZ OCENA ICH ZALET I WAD W IMPLEMENTACJI DO RUTYNOWEGO STOSOWANIA

Sebastian Gnat^{1,*}, Dominik Łagowski¹, Aneta Nowakiewicz¹, Mariusz Dyląg²

¹ Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Instytut Biologicznych Podstaw Chorób Zwierząt, Zakład Mikrobiologii Weterynaryjnej

² Uniwersytet Wrocławski, Wydział Nauk Biologicznych, Instytut Genetyki i Mikrobiologii, Zakład Mykologii i Genetyki

Wpłynęło w kwietniu, zaakceptowano w sierpniu 2019 r.

Streszczenie: Infekcje grzybicze skóry, włosów i paznokci stanowią najliczniejszą i najbardziej rozpowszechnioną grupę wszystkich grzybic. Czynniki etiologicznymi większości grzybiczych infekcji powierzchniowych są dermatofity, które, pomimo że są najstarszymi mikroorganizmami uznanymi za czynniki chorobotwórcze, długo nie doczekały się stabilnego systemu taksonomicznego. Z diagnostycznego punktu widzenia, identyfikacja gatunkowa dermatofitów wciąż stanowi poważny problem w postępowaniu identyfikacyjnym, z czego wynikają częste błędy terapeutyczne. Wzrastająca liczba zakażeń, w tym również odzwierzęcych, brak stabilności taksonomicznej i niejednoznaczny obraz kliniczny wszystkich przypadków dermatomykoz powodują konieczność poszukiwania nowych metod szybkiej, taniej i powtarzalnej identyfikacji gatunkowej tych grzybów. Ostatnia dekada stanowi rewolucyjny czas opracowywania molekularnych metod diagnostyki i identyfikacji gatunkowej czynników etiologicznych powodujących te dermatomykozy. Wyniki wielu badań wskazują, że bezpośrednia identyfikacja grzybów z próbek dermatologicznych w oparciu o metody molekularne jest o wiele bardziej wiarygodna i znacznie szybsza w porównaniu z prowadzoną metodami konwencjonalnymi. Niejednokrotnie, identyfikowano też czynnik etiologiczny obserwowanych zmian, podczas gdy wynik hodowli był negatywny. Poszczególne metody molekularne stosowane w identyfikacji gatunkowej grzybów bezpośrednio z materiału klinicznego różnią się sposobami ekstrakcji DNA genomowego, zastosowanymi technikami PCR, wykorzystywanym markerem molekularnym oraz systemem interpretacji wyników. W niniejszej pracy dokonano przeglądu literatury traktującej o różnych metodach diagnozowania grzybic powierzchniowych opartych o techniki biologii molekularnej, o ich zaletach i ograniczeniach, a także o czynnikach krytycznych dla ich implementacji do rutynowego stosowania. Stanowisko mikrobiologów wydaje się być jednoznaczne, czas, kiedy diagnostyka molekularna zastąpi konwencjonalne techniki oparte na hodowli dermatofitów i ocenie ich morfologii, nieubłaganie nadchodzi. Molekularne metody identyfikacji czynników etiologicznych dermatomykoz bezpośrednio z próbek dermatologicznych są zdecydowanie bardziej atrakcyjne i mają wiele zalet.

1. Wprowadzenie. 2. Znaczenie identyfikacji gatunkowej dermatofitów w próbkach dermatologicznych. 3. Molekularna identyfikacja gatunkowa czystych kultur dermatofitów. 4. Metody bezpośredniej identyfikacji grzybów z prób klinicznych. 4.1. Izolacja DNA. 4.2. Techniki bezpośredniej identyfikacji oparte na klasycznym PCR. 4.3. Techniki bezpośredniej identyfikacji oparte na PCR w czasie rzeczywistym. 5. Wybór optymalnej metody do stosowania rutynowego. 6. Zalety i wady molekularnych metod identyfikacyjnych stosowanych w mykologii. 7. Podsumowanie

MOLECULAR METHODS FOR DIAGNOSTICS OF DERMATOMYCOSSES – REVIEW OF AVAILABLE TECHNIQUES AND EVALUATION OF THEIR ADVANTAGES AND DISADVANTAGES IN IMPLEMENTATION FOR IN ROUTINE USE

Abstract: Fungal infections of the skin, hairs, and nails undeniably dominate among all types of fungal infections. The etiological factors of the majority of superficial fungal infections are dermatophytes which, although they are the oldest microorganisms considered as pathogens, have long been unstable in the taxonomic position. From a diagnostic point of view, the species identification of dermatophytes is still a serious problem, often generating therapeutic errors. An increasing number of infections, including zoonoses, lack of taxonomic stability and ambiguous clinical picture of all cases of dermatomycosis induce to search for new, fast, repeatable and at the same time cheap methods of species identification of these fungi. In the last decade, revolutionary progress has been observed in the development of molecular methods for the diagnosis of fungal infections and the reliable identification of species of etiological factors that cause these dermatomycoses. The results of many studies indicate that the direct identification of fungi from dermatological samples based on molecular methods is much more reliable and much faster compared to that carried out by conventional methods. Often, the etiological factor of the observed changes was also identified, while the result of cultivation was negative. Particular molecular methods used in the species identification of fungi directly from the clinical material differ in the procedures of genomic DNA extraction, PCR techniques used, the

* Autor korespondencyjny: dr hab. Sebastian Gnat, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Instytut Biologicznych Podstaw Chorób Zwierząt, Zakład Mikrobiologii Weterynaryjnej, ul. Akademicka 12, 20-033 Lublin; tel. 81 445 60 93; e-mail: sebastian.gnat@up.lublin.pl

molecular marker used and the results interpretation system. This paper reviews literature regarding different methods of diagnosing of superficial fungal infections based on molecular biology techniques, their advantages and limitations, as well as critical factors for their implementation for routine use. The position of microbiologists in this matter seems to be a foregone conclusion, the time when molecular diagnostics will replace the conventional techniques, based on the cultivation of dermatophytes and assessing their morphology, inexorably coming. Molecular methods of identifying aetiological factors of dermatomycoses directly from dermatological samples are much more attractive and have many advantages.

1. Introduction. 2. Importance of identification of dermatophyte species in dermatological samples. 3. Molecular species identification in pure dermatophyte cultures. 4. Methods for direct identification of fungi from clinical samples. 4.1. DNA isolation. 4.2. Classical PCR-based techniques of direct identification. 4.3. Real-time PCR-based techniques of direct identification. 5. Choice of an optimal method for routine use. 6. Advantages and drawbacks of molecular identification methods applied in mycology. 7. Summary

Słowa kluczowe: dermatofity, grzybnice powierzchniowe, identyfikacja, metody molekularne

Key words: dermatophytes, superficial mycoses, species identification, molecular methods

1. Wprowadzenie

Podstawę diagnostyki mykologicznej powierzchniowych infekcji grzybiczych stanowi niezmiennie od lat bezpośrednie badanie mikroskopowe próbek skóry, włosów i paznokci przeprowadzane w 10% KOH z DMSO i/lub w roztworze kalkofluoru białego (1 g/L, calcofluor white) [20–22]. Badanie to pozwala potwierdzić dermatomykozę zdiagnozowaną w oparciu o obraz kliniczny zmian, nie daje jednak możliwości identyfikacji gatunku czynnika etiologicznego grzybicy [22]. Klasyczna diagnostyka mykologiczna uzupełniana jest testami hodowlanymi, w których identyfikacja gatunkowa oparta jest o analizę mikro- i makro-morfologiczną uzyskanych kultur grzybów [23]. Izolacja czystej kultury dermatofitu jest w większości przypadków przeprowadzana równoległe z wykonywaniem preparatu bezpośredniego ze zmian skórnych [21, 22, 28]. Niemniej jednak badanie hodowlane nie jest „złotym środkiem” do szybkiej i wiarygodnej identyfikacji dermatofitów i związane są z nim trzy powtarzające się problemy. Jedną z zasadniczych kwestii utrudniających identyfikację gatunkową na podstawie morfologii jest subiektywizm oceny struktury makro- i mikroskopowej kultury i konieczność dużego doświadczenia personelu laboratoryjnego, a także zmienność cech morfologicznych w czasie [24, 28]. Drugim z problemów identyfikacyjnych jest możliwość uzyskania negatywnego wyniku hodowli, pomimo uwidocznienia artrospor w preparacie bezpośrednim. Ostatnią z najczęściej wymienianych wad diagnostyki klasycznej opartej na hodowli jest możliwość izolacji kultur grzybów strzępkowych nie będących dermatofitami (NDF, Non-Dermatophyte Fungi) a w szczególności keratynofilnych grzybów pleśniowych, jak chociażby z rodzaju *Chrysosporium*, które na podłożu DTM (Dermatophyte Test Medium) dają dokładnie ten sam efekt jak dermatofity.

Wymienione problemy hodowli dermatofitów, a szczególnie długi czas niezbędny do uzyskania kultur, związany z powolnym wzrostem grzybów tej grupy, skutkują wprowadzaniem nowego trendu diagno-

stycznego w mykologii. W ostatniej dekadzie obserwuje się wręcz rewolucyjny postęp w opracowywaniu molekularnych metod diagnostyki grzybic i wiarygodnej identyfikacji gatunkowej czynników etiologicznych powodujących te dermatomykozy [23]. Celem niniejszej pracy jest dokonanie przeglądu literatury traktującej o różnych metodach diagnozowania grzybic powierzchniowych opartych na technikach biologii molekularnej, o ich zaletach i ograniczeniach, a także o czynnikach warunkujących ich implementację do rutynowego stosowania.

2. Znaczenie identyfikacji gatunkowej dermatofitów w próbkach dermatologicznych

Znaczenie poprawnej identyfikacji gatunkowej czynnika etiologicznego dermatomykozy dostrzegane jest szczególnie wtedy, kiedy leczenie nie przynosi rezultatów. Błędy terapeutyczne skłaniają klinicystów do zlecenia lub ponawiania diagnostyki mykologicznej, która w przypadku pobierania materiału dermatologicznego z miejsc poddanych już działaniu miejscowych środków przeciwgrzybiczych niejednokrotnie jest niemożliwa lub obciążona błędem. Baudraz-Rosselet i wsp. [3] opisują przypadek wielokrotnego leczenia ogólnoustrojowego onychomykozy (*tinea unguinum*), zdiagnozowanej na podstawie objawów klinicznych, terbinafiną i itrakonazolem. Brak skuteczności stosowanych antymykotyków początkowo został przypisany występowaniu opornych na te leki szczepów i *Trichophyton interdigitale*. Dopiero po przeprowadzeniu diagnostyki laboratoryjnej okazało się, że onychomykoza nie ma etiologii dermatofitowej, a za jej występowanie odpowiedzialne są grzyby z rodzaju *Fusarium*, *Acremonium* i *Aspergillus*. Powszechnie wiadomo, że doustna terapia terbinafiną i/lub azolami najczęściej jest skuteczna w leczeniu onychomykozy dermatofitowej, ale terapia ta jest bezużyteczna, gdy czynnikiem etiologicznym jest NDF. Wówczas stosuje się najczęściej alternatywną terapię, tj. miejscowe kremy lub żele przeciwgrzybicze,

w tym z amfoterycyną B lub terapię fotodynamiczną. Poprawna identyfikacja gatunkowa dermatofitów jest także nieodzowna w grzybicach skóry owłosionej głowy (*tinea capitis*) [20]. Istotnym problemem epidemiologicznym w tym przypadku jest właściwa identyfikacja gatunków dermatofitów zoofilnych od ludzi. Dermatofity zoofilne diagnozowane u zwierząt, tj. *Trichophyton mentagrophytes*, *T. verrucosum*, *T. benhamiae*, *Microsporum canis*, *Lophophyton gallinae*, *Nannizzia nana*, odpowiedzialne są za infekcje objawowe, ale niejednokrotnie bytują również bezobjawowo, czyniąc zwierzę nosicielem i w tym przypadku mogą stać się źródłem epidemii [20, 23]. Dodatkowo, gdy dochodzi do transmisji na człowieka, gatunki zoofilne wywołują grzybice o ostrym przebiegu z silnie wyrażonymi objawami reakcji zapalnej i niejednokrotnie z wyraźnie zaznaczonym pierścieniem na obwodzie zmiany [20, 21]. Dowody naukowe podkreślają zjawisko wysokiej zaraźliwości dermatofitów zoofilnych pomiędzy ludźmi, niejednokrotnie prowadzące do powstawania ostrych ognisk infekcji. Zatem, w infekcjach na tle dermatofitów zoofilnych u ludzi zasadnym jest wskazanie możliwego źródła infekcji, którym często jest zwierzę domowe. Odpowiednie leczenie pacjenta i zwierzęcia, a także dezynfekcja środowiska jego przebywania może pomóc w zapobieganiu nawrotom lub nowym infekcjom, zwłaszcza u dzieci. Przeciwnie, identyfikacja gatunkowa dermatofitów nie ma zasadniczego znaczenia w większości przypadków infekcji skórnych (*tinea corporis*) o etiologii antropofilnej, ponieważ te dermatomykozy dobrze reagują na standardowe terapie miejscowe, niezależnie od gatunku [23].

3. Molekularna identyfikacja gatunkowa czystych kultur dermatofitów

Identyfikacja gatunkowa dermatofitów oparta o makromorfologię hodowli i mikromorfologię struktur grzybni jest trudna lub mało wiarygodna z uwagi na znaczne różnice na poziomie makro- i mikroskopowym między poszczególnymi izolatami z tego samego gatunku. Z drugiej strony, podobne morfologicznie szczepy mogą w rzeczywistości przynależać do zupełnie odrębnych gatunków [23]. W związku z tym, znacznie bardziej wiarygodnym kryterium diagnostycznym w mykologii są sekwencje DNA. Jednymi z najlepiej przebadanych fragmentów genomu dermatofitów są regiony międzygenowe rybosomalnego DNA określane jako ITS rDNA (Internal Transcribed Spacer ribosomal DNA) [20, 21, 24, 25, 28]. Gräser oraz de Hoog i wsp. [28], autorzy będący wysoce cenionymi specjalistami z dziedziny mykologii, na podstawie sekwencji ITS rDNA klasyfikują znaczną liczbę gatunków. W badaniach naukowych sekwencja ITS jest często wykorzysty-

wana w identyfikacji dermatofitów [20–22, 54], także w połączeniu z innymi markerami molekularnymi, takimi jak gen beta-tubuliny czy gen czynnika translacyjnego 1 [23, 28]. Sekwencje ITS cechuje na tyle wysoka specyficzność, aby można było przeprowadzić identyfikację na poziomie gatunku i wyższym [22, 28]. Sekwencje 28S rDNA są również użyteczne w identyfikacji gatunków dermatofitów, ale ich siła dyskryminacyjna jest znacznie niższa niż regionu ITS. De Hoog i wsp. [28] zaproponowali w 2016 roku podczas warsztatów zorganizowanych przez CBS KNAW Fungal Biodiversity Centre (The Centraalbureau voor Schimmelcultures Fungal Biodiversity Centre, Institute of the Royal Netherlands Academy of Arts and Sciences) w Utrechcie w Holandii system taksonomii dermatofitów oparty na sekwencjach czterech regionów genomu: fragmentu ITS, rybosomalnego 60S, genu dużej podjednostki rybosomu (LSU) i genu beta-tubuliny (TUB). Każdy z nich prezentuje inną rozdzielczość, umożliwiając wyodrębnienie różnej liczby taksonów zgodnie z zależnością ITS > TUB > 60S > LSU [28]. Wyniki tych badań wskazują, że cząsteczka ITS rDNA jest wystarczająco informatywna w kontekście analiz genomów dermatofitów. Z tego też względu stanowi optymalny marker w rutynowej diagnostyce, chociaż dla odróżnienia poszczególnych członków niektórych „kompleksów gatunkowych” konieczne jest włączenie do badań molekularnych dodatkowych genów (markerów), jak również testów opartych o cechy fenotypowe. Spośród innych sekwencji używanych w identyfikacji grzybów na poziomie gatunku można wymienić geny kodujące topoizomerazę II i syntazę chityny 1 [27, 29–31].

Identyfikacja gatunku dermatofitu w oparciu o sekwencje nukleotydowe zdeponowane w publicznie dostępnej bazie danych GenBank prowadzonej przez NCBI (National Center of Biotechnology Information) jest często problematyczna. W bazie tej znajdują się liczne błędy, które polegają na zapisie identycznych sekwencji nukleotydowych pod różnymi nazwami gatunkowymi (w szczególności dotyczy to sekwencji ITS i 28S). Powodem takiego stanu są wielokrotne zmiany nomenklatury dermatofitów, przede wszystkim w obrębie kompleksów *T. mentagrophytes* i *T. benhamiae*, będących przedmiotem badań w licznych ośrodkach naukowych [4, 13]. Wiele gatunków, pochodzących z izolatów klinicznych, wchodzących w skład wymienionych kompleksów jest błędnie zidentyfikowanych przez deponentów sekwencji. Problem ten można częściowo rozwiązać wykorzystując bazę danych dedykowaną wyłącznie sekwencjom nukleotydowym ITS, która jest nieustannie aktualizowana przez jeden z bardziej znanych na świecie ośrodków zajmujących się tematyką dermatofitów, tj. CBS KNAW Fungal Biodiversity Centre. Obecnie w środowisku mikrobiologów trwa dyskusja nad rozpoczęciem prac nad przygotowaniem, dedykowanej

specjalnie dla laboratoriów diagnostyki mykologicznej, bazy danych sekwencji nukleotydowych oraz opisów morfologicznych gatunków sklasyfikowanych według nowych zasad taksonomicznych [23, 28].

4. Metody bezpośredniej identyfikacji grzybów z próbek klinicznych

Metody PCR do bezpośredniej identyfikacji grzybów w próbkach dermatologicznych oparte są na trzech głównych filarach: wysokowydajnej ekstrakcji DNA, specyficznych starterach i wiarygodnym sposobie analizy produktów [12, 31]. Zróżnicowana siła dyskryminacyjna wykorzystywanych markerów molekularnych pozwala wyodrębnić dwie grupy metod: służące do identyfikacji określonego gatunku dermatofitu oraz stosowane do określenia przynależności do grupy dermatofitów lub szerzej, do grzybów chorobotwórczych. Na szczególną uwagę zasługuje ta druga grupa metod, dla których opracowane zostały dedykowane startery określane jako tzw. „pan-dermatofitowe” i „pan-grzybowe” [11, 12]. Pospolicie wykorzystywanymi markerami diagnostycznymi w metodach wykorzystywanych do identyfikacji gatunkowej są sekwencje ITS i 28S rDNA oraz geny kodujące topoisomerazę II i syntazę chityny 1 [27, 29, 31] (Tabela I). W dotychczas opisanych metodach stosuje się zarówno konwencjonalny PCR [5, 8, 9, 12, 40], jak również techniki PCR w czasie rzeczywistym [7, 16, 39, 41]. Większość tych technik została opracowana do identyfikacji dermatofitów, a zaledwie nieliczne umożliwiają diagnostykę drożdży

i NDF jako możliwych czynników zakaźnych [8, 16]. Poniżej przedstawiono krótką charakterystykę najbardziej popularnych technik molekularnej identyfikacji dermatofitów w materiale klinicznym, zaczynając od najtrudniejszego etapu wszystkich analiz DNA w diagnostyce mykologicznej, jakim jest izolacja DNA.

4.1. Izolacja DNA

Ekstrakcja grzybowego DNA z materiału klinicznego jest trudna ze względu na wysoką zawartość keratyny w skórze, włosach i paznokciach, a także unikalną, słabo poddającą się działaniu enzymatycznemu, budowę ściany komórkowej grzybów. W wielu opisanych protokołach izolacji DNA grzybowego, łuski skóry, włosy i paznokcie poddawane są fragmentacji wstępnej za pomocą sterylnych narzędzi chirurgicznych [7, 15, 26, 32, 47, 52, 54]. Alternatywnym sposobem nieenzymatycznego rozwarstwienia próbek skóry, włosów i paznokci jest inkubacja w roztworze Na_2S w temperaturze pokojowej, najczęściej przez okres 1 godziny lub przez całą noc [8, 40, 49]. W tym przypadku możliwe jest pominięcie wstępnego mechanicznego rozdrobnienia materiału. Niemal w każdym opisywanym protokole ekstrakcji DNA z prób mykologicznych zasadniczy etap trawienia materiału wykonywany jest jednak enzymatycznie przy zastosowaniu proteinazy K, z dodatkiem lub bez ditiotreitolu (DTT) jako środka redukującego [1, 5, 6, 17, 32, 38, 41, 42, 53, 54]. Ten właściwy etap trawienia materiału klinicznego przeprowadzany jest w 55°C w czasie od 1 godziny aż po całą noc. W oryginalnych pracach badawczych dotyczących diagnostyki dermatolo-

Tabela I
Porównanie metod molekularnych opracowanych do bezpośredniej identyfikacji dermatofitów z próbek dermatologicznych

Metody	Liczba przebadanych próbek	Odsetek identyfikacji [%]		Różnica pomiędzy badaniem molekularnym a hodowlanym [%]	Referencja
		w badaniu molekularnym	w badaniu hodowlanym		
Oparte na konwencjonalnym PCR	204	79,9	59,8	20,1	[5]
	230	72	56	16	[9]
	25	100	100	0	[11]
	201	97	81,1	15,9	[15]
	253	50,2	34,4	15,8	[38]
	140	87,3	86,7	0,6	[44]
	219	74	26	48	[45]
Oparte na PCR w czasie rzeczywistym	862	61,0	54,5	6,5	[1]
	92	51,1	33,1	18,0	[2]
	120	61,7	47,5	14,2	[7]
	202	51	39	12	[6]
	311	64,6	43,4	21,2	[41]
	1437	48,5	26,9	18,7	[52]

mykoz, DNA najczęściej ekstrahowany jest z przygotowanych próbek dermatologicznych za pomocą różnych skomercjalizowanych zestawów, ręcznie lub za pomocą robota [6, 43, 54]. Właściwa homogenizacja i trawienie łusek skóry, włosów czy paznokci jest etapem istotnie wpływającym na powodzenie i wydajność całej procedury izolacji DNA grzybowego.

Właściwy etap izolacji DNA polega na jego wytrąceniu z mieszaniny związków uzyskanych z trawienia materiału klinicznego i następnie oczyszczeniu. Dość często, jako najbardziej użyteczna i wydajna metoda ekstrakcji DNA dermatofitów, wymieniana jest metoda z użyciem mieszaniny fenolu, chloroformu i alkoholu izoamylogowego w proporcji 25:24:1 [2, 16, 18, 20–22, 26, 47]. Na podstawie badań własnych [18], autorzy uważają, że metoda ta powinna być stosowana z wyboru do izolacji DNA z czystych kultur dermatofitów. Wydajność techniki nazwanej przez autorów „fenol-chloroform” jest około 39% wyższa niż techniki ekstrakcji DNA z wykorzystaniem CTAB (cetyltrimethylammonium bromide) i aż 68–85% wyższa niż komercyjnych zestawów oferowanych przez różnych producentów. Zasadniczym minusem, który dyskwalifikuje ją do zastosowania w połączeniu z metodami tzw. szybkiej identyfikacji, jest czas wykonania, który może rozciągnąć się nawet do dwóch dni. Ten czynnik ograniczający wykorzystanie metody „fenol-chloroform” w ekstrakcji DNA z prób dermatologicznych należy wziąć pod uwagę przy rozważaniu rutynowego stosowania w laboratoriach mykologicznych. Alternatywna, bardzo szybka metoda izolacji DNA z materiału klinicznego została opisana przez Brillowską-Dąbrowską i wsp. [10, 11]. Ta zaledwie dwuetapowa i trwająca około 15 minut metoda izolacji grzybowego DNA została opatentowana przez zespół naukowców, a obecnie jest dostępna komercyjnie w zestawie Dermatophyte PCR Kit oferowanym przez SSI Diagnostica (Hillerød, Dania). W skrócie, protokół tej techniki przedstawia się następująco: DNA jest ekstrahowany podczas 10-minutowej inkubacji w 95°C w buforze wykonanym z 60 mM wodorowęglanu sodu (NaHCO₃), 250 mM chlorku potasu (KCl) i 50 mM Tris (pH 9,5), a następnie, za pomocą intensywnego wortekowania z buforem zawierającym 2% albuminy surowicy bydłowej, neutralizowane są wszelkie inhibitory białkowe. Uzyskany w ten sposób supernatant zawierający DNA dermatofitu nie jest oczyszczany, służy natomiast do bezpośredniego zastosowania jako matryca PCR. Niestety, w literaturze naukowej brak jest porównania wydajności tej metody z innymi komercyjnymi zestawami stosowanymi do ekstrakcji DNA z próbek dermatologicznych. Odnosząc się jednak do badań przeprowadzonych przez Gnat i wsp. [18], którzy porównywali wydajność izolacji i czystość preparatów DNA z różnych gatunków dermatofitów po wykonaniu ekstrakcji za pomocą metody „fenol-chloroform”, CTAB i pięciu

zestawów dostępnych komercyjnie, należy przypuszczać, że wydajność tej metody również nie dorówna metodom konwencjonalnym. Ostatecznie, decyzja o wyborze techniki ekstrakcji DNA pozostaje zawsze w gestii diagnosty, który musi odpowiedzieć na pytanie, co jest istotniejsze – czas czy wydajność procedury.

4.2. Techniki bezpośredniej identyfikacji oparte na klasycznym PCR

Z punktu widzenia diagnosty laboratoryjnego, technika identyfikacyjna powinna być przede wszystkim prosta do wykonania i interpretacji. Uważa się, że w dzisiejszych czasach określenie masy molekularnej amplikonu w żelu agarozowym spełnia oba wymienione warunki. Jedną z pierwszych takich metod, opisywana w literaturze, może być wykorzystywana wyłącznie do identyfikacji grupowo-specyficznego czynnika etiologicznego grzybicy [12]. Stosowanie starterów „pan-dermatofitowych” umożliwia uzyskanie produktu PCR o masie 366 bp, który jest uniwersalny dla wszystkich gatunków dermatofitów i pozwala w 100% wykazać w materiale diagnostycznym charakterystyczne dla tej grupy patogenów sekwencje nukleotydowe [12]. Charakterystyczna masa molekularna specyficznych gatunkowo amplikonów ITS jest podstawą identyfikacji *Trichophyton* spp. (302 bp), *M. canis* i *M. audouinii* (279 bp) w metodzie zaproponowanej przez Brillowską-Dąbrowską i wsp. [11]. Prawdopodobnie stosunkowo niska rozdzielczość metody i niewielka, licząca 25 pacjentów, grupa badana jest w tym przypadku powodem 100% korelacji wyników uzyskanych metodami molekularnymi i tradycyjnymi (hodowlanymi). Wysoko oceniana jest także możliwość identyfikacji za pomocą tej metody *M. canis* z sierści zwierząt, zwłaszcza kotów. Powszechnie wiadomo, że zwierzęta te są częstymi nosicielami dermatofitów i stanowią istotne zagrożenie epidemiologiczne dermatomykozami zoolicznymi [21]. Zdecydowanie bardziej specyficzna jest metoda skonstruowana przez Brasch i wsp. [9], która została zaprojektowana do identyfikacji *Trichophyton rubrum* w materiale bezpośrednim. W opisywanym badaniu zostało przebadanych 230 próbek dermatologicznych z paznokci, z których identyfikacja *T. rubrum* zarówno w metodzie PCR jak i hodowli została wykazana w 72% przypadków. Wynik pozytywny testu molekularnego, pomimo braku wzrostu dermatofitów w hodowli, został stwierdzony w 16% próbkach paznokci, podczas gdy dodatnia hodowla, ale ujemny PCR, odnotowano w 9% próbkach. Niestety, w całej publikacji autorzy posługują się jedynie określeniem specyficzne startery (w oryginale „specific primers”), bez podania informacji o właściwym markerze molekularnym, dla którego wspomniane sekwencje starterowe zostały zaprojektowane.

Innymi stosowanymi odmianami technik diagnostycznych, w których identyfikacja grzyba jest możliwa na podstawie określenia masy molekularnej amplikonu, są reakcje „multipleksowe” ze specyficznymi gatunkowo parami starterów w jednej mieszaninie PCR [12, 15, 38]. Dhib i wsp. [15] opisują metodę, w której podstawą identyfikacji *T. rubrum* i *T. interdigitale* są sekwencje ITS i genu syntazy chityny 1. Wykazano, że czułość tej techniki jest wyższa w porównaniu z tradycyjnym badaniem mykologicznym (97% vs. 81,1%), ale w przypadku diagnostyki przeprowadzanej bezpośrednio z materiału klinicznego zasadniczym problemem okazała się, występująca aż w 32,8% próbek, flora mieszana. Metoda zaproponowana przez Mehlig i wsp. [38], przetestowana na 253 próbkach pobranych od ludzi i zwierząt, okazała się przydatna w identyfikacji dermatofitów, *Scopulariopsis brevicaulis* i grzybów drożdżopodobnych z rodzaju *Candida*. Uzyskane przez autorów wyniki nie różnią się jednak wyraźnie od innych uzyskanych w podobnych badaniach. Mianowicie, w 34,4% próbek wyniki PCR i hodowli określono jako dodatnie, a w 50,2% uzyskano wynik dodatni wyłącznie w oparciu o techniki molekularne. Na uwagę zasługuje fakt wykonania badań z próbek klinicznych pobranych z różnych jednostek chorobowych, takich jak onychomykoza czy też infekcje powierzchniowe błon śluzowych i skóry o innej niż dermatofitowa etiologii. Zastosowanie trzech cykli PCR i trzech specyficznych wobec ITS1, 18S rRNA i 28S rRNA starterów znacznie zwiększa rozdzielczość metody, co zostało opisane w publikacji Kim i wsp. [33]. Multiplex PCR autorzy ci zastosowali do identyfikacji 11 gatunków szczepów referencyjnych dermatofitów, tj. *Epidermophyton floccosum* CBS 358.93, *Microsporium gypseum* IFM 5292, *M. canis* IFM 45829, *M. audouinii* IFM 5294, *M. fulvum* IFM 5318, *Trichophyton violaceum* CBS 319.31, *T. rubrum* KCTC 6375, *T. mentagrophytes* var. *mentagrophytes* CBS 126.34, *T. tonsurans* CBS 483.76, *T. mentagrophytes* var. *interdigitale* IFM 53931 i *T. verrucosum* CBS 134.66. Jednakże, bezpośrednia identyfikacja gatunkowa w 73 próbkach klinicznych przeprowadzona została jedynie w oparciu o narzędzia biologii molekularnej. Wykryte gatunki: *T. rubrum*, *T. mentagrophytes*, *T. tonsurans* i *M. gypseum* nie zostały potwierdzone jednocześnie metodami hodowlanymi i/lub mikroskopowymi. Wyników podobnych badań w literaturze jest więcej; większość z nich metodą PCR typu duplex identyfikuje *T. rubrum* i wykazuje korelację z wynikami badania hodowlanego, mikroskopowego lub obu jednocześnie [12, 43].

Zwiększanie zdolności rozdzielczej molekularnych metod identyfikacji dermatofitów możliwe jest poprzez zastosowanie zagnieżdżonego („nested”) lub pół-zagnieżdżonego („semi-nested”) PCR [26, 49]. Piri i wsp. [44] opisują metodę nested-PCR z wykorzysta-

niem nowo opracowanej pary starterów ukierunkowanej na sekwencje czynnika elongacji translacji 1- α (Tef-1 α). Technika ta cechuje się wyjątkowo wysoką rozdzielczością i umożliwia identyfikację większości dermatofitów o znaczeniu klinicznym (*Trichophyton simii*, *T. mentagrophytes*, *T. verrucosum*, *T. benhamiae*, *T. equinum*, *M. canis*, *Nannizzia gypsea*, *N. nana*, *N. persicolor*, *N. fulva*, *Arthroderma uncinatum* i *Paraphyton cookei*) bezpośrednio z materiału diagnostycznego. Badania 140 próbek dermatologicznych pobranych od zwierząt wykazały o 11,1% wyższy odsetek dodatnich wyników metodą nested-PCR w porównaniu z hodowlą i bezpośrednim badaniem mikroskopowym oraz wysoką (94,4%) zgodność wyników badania molekularnego i badania mikroskopowego. Autorzy podkreślają również wysoki stopień wiarygodności identyfikacji tą metodą, korelujący w 100% z wynikami sekwencjonowania ITS i ITS-RFLP. W innym badaniu przeprowadzonym przez Wisselink i wsp. [52], z zastosowaniem starterów „pan-dermatofitowych” oraz metody nested-PCR, pozytywnie zidentyfikowano 48,5% próbek, natomiast w oparciu o hodowle prowadzone na odpowiednich pożywkach zaledwie 26,9%. Należy podkreślić, że metoda nested-PCR ze starterami „pan-dermatofitowymi” umożliwiającą identyfikację 12 gatunków dermatofitów, jest również znacznie czulsza niż porównywalne techniki z wykorzystaniem konwencjonalnego PCR. Pomimo pewnych ograniczeń związanych ze zwiększeniem liczby manipulacji koniecznych do wykonania, ryzykiem zanieczyszczenia produktów PCR i wydłużonym czasem diagnostyki, metody nested-PCR są metodami o wysokiej zdolności rozdzielczej w identyfikacji dermatofitów i mogą być stosowane w diagnostyce bezpośredniej.

W ciągu ostatnich kilkudziesięciu lat do coraz powszechniejszego wykorzystania w diagnostyce grzybic bezpośrednio z próbek klinicznych, szczególnie paznokci, weszła metoda polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych (RFLP, restriction fragment length polymorphism). Technika ta została wykorzystana do identyfikacji *Trichophyton* spp., *Fusarium* spp. i *Aspergillus* spp. w onychomykozach [8, 40]. Identyfikacja gatunków w materiale bezpośrednim z infekcji powierzchniowych jest możliwa dzięki porównywaniu profili elektroforetycznych żeli agarozowych izolatów klinicznych i gatunków referencyjnych dermatofitów, jak również szczepów grzybów należących do grupy NDF. Technika PCR-RFLP zapewnia znaczącą poprawę wiarygodności identyfikacji w porównaniu z wynikami uzyskanymi w oparciu o tradycyjne metody hodowlane [8]. Po pierwsze, uzyskane za pomocą tej techniki wyniki umożliwiają identyfikację i różnicowanie dermatofitów od NDF, a także od szczepów pochodzących z kontaminacji. Fakt ten jest szczególnie istotny, ponieważ pleśnie powodujące grzybicę paznokci nie

reagują na niektóre leki przeciwgrzybicze stosowane rutynowo u pacjentów z dermatomykozami [8]. Po drugie, możliwe stało się identyfikowanie czynnika zakaźnego w sytuacji, gdy bezpośrednio badanie mykologiczne próbek pobranych ze zmienionych chorobowo paznokci uwidacznia elementy grzybowe, ale wyniki badania hodowlanego są negatywne [40]. Alternatywnie do analizy zróżnicowania profili elektroforetycznych RFLP w identyfikacji grzybów powodujących onychomykozy wskazywane jest sekwencjonowanie amplikonu wybranego genu markerowego charakterystycznego dla dermatofitów i NDF [40, 49]. Niestety, podobnie jak metoda RFLP, także sekwencjonowanie amplikonów jest nieużyteczne w infekcjach mieszanych, o niejednoznacznej etiologii [51]. Ograniczenie to odnosi się nie tylko do onychomykoz, ale również do innych typów dermatomykoz, w przypadku których z jednego ogniska chorobowego można izolować więcej niż jeden gatunek [21]. Pomimo przebadania wielu genów markerowych grzybów, uzyskanie specyficznego gatunkowo amplikonu i jego sekwencjonowanie okazało się również niewystarczające do bezpośredniej identyfikacji dermatofitów z próbek klinicznych *tinea capitis* i *tinea corporis* u ludzi i zwierząt [20, 21, 48].

Verrier i wsp. [51] proponują zastosowanie techniki polimorfizmu długości terminalnych fragmentów restrykcyjnych (TRFLP, terminal restriction length polymorphism) znakowanego 5'-końca sekwencji 28S rDNA. Technika ta jest szczególnie przydatna w identyfikacji dermatofitów z rodzaju *Trichophyton* (szczególnie *T. rubrum* i *T. interdigitale*) oraz 12 gatunków z grupy NDF (*Fusarium oxysporum*, *F. solani*, *Aspergillus versicolor*, *A. flavus*, *Alternaria* spp., *Acremonium alternatum*, *A. strictum*, *Candida parapsilosis*, *C. albicans*, *Penicillium citrinum* i *Scopulariopsis brevicaulis*), które często są izolowane z mieszanych infekcji powierzchniowych. Technika ta stała się wyjątkowo użyteczna w identyfikacji grzybów w zakażeniach mieszanych, które stanowią nawet do 10% wszystkich infekcji grzybiczych [51]. Co więcej, wyniki przeprowadzonych badań wskazują, że za pomocą TRFLP można wiarygodnie zidentyfikować grzyby w 74% (162/219) przypadków dermatomykoz, w których wyniki hodowli są ujemne [48]. TRFLP to technika „odcisków palców DNA” pierwotnie wykorzystywana do określania zróżnicowania mikrobiologicznego w różnych niszach ekologicznych, takich jak gleba i woda [14, 35, 52]. W medycynie technika znalazła zastosowanie do charakterystyki mikrobioty jamy ustnej w ślinie u osób zdrowych i pacjentów z zapaleniem przyzębia [52]. Niewątpliwą zaletą techniki TRFLP stanowi zautomatyzowany system interpretacji wyników, co przekonuje diagnostów, aby posługiwać się tą metodą z wyboru w przypadku dużej liczby próbek klinicznych wymagających opracowania.

Metodą służącą do bezpośredniej identyfikacji czynników etiologicznych infekcji dermatofitowych w próbkach skóry i paznokci, odznaczającą się znacznie wyższą czułością jest technika PCR-ELISA (PCR-enzyme-linked immunosorbent assay) [5]. Metoda PCR-ELISA z sondami znakowanymi biotyną pozwala na czułą i swoistą identyfikację pięciu najczęściej izolowanych gatunków dermatofitów – *Trichophyton rubrum*, *T. interdigitale*, *T. violaceum*, *Microsporum canis* i *Epidermophyton floccosum*. Markerem identyfikacyjnym w tej metodzie jest gen topoizomerazy II, amplifikowany przy użyciu starterów znakowanych digoksygeniną, a następnie hybrydowany z 5'-biotynylowanymi sondami oligonukleotydowymi specyficznymi dla gatunku. Detekcja gatunkowo-specyficznych hybryd odbywa się w mikrostudzienkach powleczonych streptawidyną, z zastosowaniem przeciwciał przeciw peroksydazie chranowej i substratu peroksydazy. Beifus i wsp. [5] korzystając z metody PCR-ELISA dokonali identyfikacji jednego z pięciu wymienionych gatunków dermatofitów w 163 z 204 (79,9%) próbkach klinicznych od ludzi, które zostały uznane za dodatnie w mikroskopowym badaniu bezpośrednim. W tym samym czasie wzrost dermatofitów w hodowli został wykazany w 59,8% przypadków. Ci sami autorzy stwierdzają ponadto, że czułość techniki PCR-ELISA jest 10-krotnie wyższa niż innych bezpośrednich metod identyfikacji grzybów opartych na PCR, a dodatkową zaletą tej metody jest uzyskanie wyniku w przeciągu 24 godzin. Przez pewien czas na rynku dostępny był komercyjny zestaw PCR-ELISA (Onychodiag, BioAdvance, Francja), ale został wycofany ze względu na niewielkie zainteresowanie [3, 50]. Prawdopodobnej przyczyny upatruje się w zbyt wielu manipulacjach koniecznych przy obróbce materiału w porównaniu z innymi metodami PCR wykorzystywanymi do bezpośredniej identyfikacji grzybów, które spowodowały, że technika ta nie stała się przedmiotem rzeczywistego zainteresowania i rutynowego stosowania.

4.3. Techniki bezpośredniej identyfikacji oparte na PCR w czasie rzeczywistym

Zaletą technik diagnostycznych opartych na PCR w czasie rzeczywistym (real time PCR) jest automatyzacja interpretacji uzyskiwanych wyników, która znacząco zmniejsza ryzyko zanieczyszczenia prób w trakcie analiz wykonywanych po klasycznym PCR. Wykorzystanie do identyfikacji gatunkowej grzybów testów PCR w czasie rzeczywistym ze starterami ukierunkowanymi na sekwencję ITS2 rDNA po raz pierwszy opisuje Alexander i wsp. [1]. Wysoka czułość i swoistość opracowanej metody została wykazana w badaniu klinicznym, w którym analizie poddano 862 próbki zeszkobin paznokci z dermatomykozą o etiologii mieszanej. W badaniu opartym o tradycyjne hodowle uzyskano obfity wzrost

grzybów z grupy NDF, które to grzyby uniemożliwiają izolację i identyfikację dermatofitów w większości przypadków klinicznych. Podkreśla to przydatność tej techniki w diagnostyce różnicującej *T. rubrum* od innych grzybów potencjalnie zanieczyszczających materiał biologiczny, które mogą bytować jako komensale lub oportuniści w płytkach paznokci zainfekowanych przez dermatofity. Inną metodę przeznaczoną do gatunkowej identyfikacji *T. rubrum*, *T. mentagrophytes* i innych grzybów, także NDF, opartą o PCR w czasie rzeczywistym proponują Miyajma i wsp. [39]. W swoich badaniach wykazują przydatność dwóch zestawów starterów, bazujących na sekwencji ITS1 rDNA i trzech sond fluorescencyjnych, które różnią się miejscami wiązania do sekwencji ITS1. Jedna z nich pozwala diagnozować obecność w materiale dermatologicznym grzybów patogennych, a dwie pozostałe wiążą specyficzne gatunkowo miejsca sekwencji ITS, umożliwiając identyfikację *T. rubrum* i *T. mentagrophytes*. Uzyskane wyniki są wysoce powtarzalne, a ich zgodność z dodatnią hodowlą kształtuje się na poziomie 45,2%. Całkowity czas wymagany do identyfikacji grzybów z próbki klinicznej w tej metodzie badacze określają na około 3 godziny, po jednej godzinie na przygotowanie DNA z próbek klinicznych, nastawienie PCR i czas trwania cyklu reakcji.

Identyfikację aż 11 gatunków dermatofitów (*M. canis* complex, *M. audouinii*, *T. rubrum*, *T. violaceum*, *T. verrucosum*, *T. erinacei*, *T. concentricum*, *T. mentagrophytes* complex, *T. tonsurans* i *E. floccosum*) umożliwia jedno-probówkowa metoda analizy krzywej topnienia PCR w czasie rzeczywistym oparta o sekwencje ITS1 rDNA i 5.8S rRNA skonstruowana przez Bergmansa i wsp. [7]. W oparciu o tą technikę uzyskano znacznie więcej dodatnich wyników identyfikacji dermatofitów niż w metodach konwencjonalnych (61,7% vs. 47,5%). Identyfikacja na poziomie gatunku za pomocą tej metody okazała się możliwa we wszystkich próbkach dermatologicznych określonych jako pozytywne, podczas gdy tylko w 45 z nich udało się uzyskać dodatni wynik hodowli. Autorzy podają, że czas uzyskania wyniku identyfikacji wynosi 4 godziny; należy jednak doliczyć konieczność wstępnej całkowitej lizy materiału przeznaczonego do diagnostyki. Tak wysokiej zdolności rozdzielczej metod molekularnych opartych o PCR w czasie rzeczywistym nie potwierdzają wyniki badania klinicznego przeprowadzonego przez zespół A. Bergmana w 2013 roku [6]. Łącznie 202 próbki kliniczne pochodzące od ludzi poddawano analizom zarówno technikami konwencjonalnymi jak i technikę PCR opartą o zautomatyzowaną ekstrakcję DNA i sekwencję genu syntazy chitynowej 1. W 103 (51%) próbkach zidentyfikowano materiał genetyczny dermatofitów, natomiast dodatnie hodowle wykazało 79 (39%). Spośród 103 pozytywnych próbek, w 94 (91%) został zidentyfikowany *T. rubrum*, a w 8 (8%) – *T. inter-*

digitale. Opisana metoda w porównaniu z konwencjonalnymi metodami hodowlanymi okazała się niewiele czulsza (51% vs. 39%), a jej zdolność dyskryminacyjna jest wystarczająca do identyfikacji tylko dwóch gatunków – *T. rubrum* i *T. interdigitale* [6]. Przyczyny takiego stanu można upatrywać w zbyt niskiej rozdzielczości zastosowanego markera molekularnego. Niewątpliwą zaletą przedstawionej metody jest jednak jej automatyzacja i ograniczenie do minimum manualnego przygotowywania materiału diagnostycznego.

Wnioski z tych badań wskazują, że lepszym celem identyfikacyjnym w bezpośredniej identyfikacji dermatofitów z zastosowaniem PCR w czasie rzeczywistym są sekwencje ITS1 rDNA i 5.8S rRNA niż gen syntazy chitynowej 1. Ohst i wsp. [41] bazując na dwóch pierwszych wymienionych markerach molekularnych proponują metodę, której zdolność dyskryminacyjna umożliwia identyfikację pięciu gatunków dermatofitów (*T. interdigitale*, *T. violaceum*, *T. verrucosum*, *E. floccosum* oraz *T. rubrum*) i czterech kompleksów gatunków (*M. canis* complex, obejmujący *M. canis*, *M. ferrugineum* oraz *M. audouinii*; *T. tonsurans* complex, obejmujący *T. tonsurans* oraz *T. equinum*; *A. benhamiae* complex, obejmujący *A. benhamiae*, *T. erinacei* oraz *T. concentricum*; *T. schöenleinii* complex, obejmujący *T. schöenleinii*, *A. simii* oraz *T. mentagrophytes*) dermatofitów. Wysoki odsetek uzyskanych przez autorów wyników pozytywnych w opisywanej metodzie (64,6%) w porównaniu z innymi publikacjami jest najprawdopodobniej spowodowany wstępnym wyborem prób do badań, pochodzących w 30% z przypadków określonych jako pozytywne w badaniu mikroskopowym. Stąd zapewne wynika zalecenie wstępne podane przez autorów, które wskazuje wykonanie konwencjonalnego PCR ze starterami „pan-dermatofitowymi” w celu identyfikacji materiału genetycznego dermatofita w materiale diagnostycznym i ograniczenie dalszej diagnostyki wyłącznie do prób pozytywnych w tym teście. Spośród innych metod PCR w czasie rzeczywistym warto wymienić metodę opracowaną przez Wisselinka i wsp. [52], która umożliwia identyfikację sześciu gatunków dermatofitów w dwóch reakcjach multipleksowych. Istotne wskazywane wady tej metody to brak możliwości identyfikacji antropofilnego, często izolowanego dermatofita *E. floccosum* i zoofilnego – *T. verrucosum*, a także gatunków wchodzących w skład kompleksu *A. benhamiae*.

5. Wybór optymalnej metody do stosowania rutynowego

Wybór optymalnej metody molekularnej do analizy próbek dermatologicznych uzależniony jest od wielu czynników, przede wszystkim od zakładanego czasu niezbędnego do uzyskania wyników, w tym ważną rolę

odgrywa czas spędzony praktycznie w laboratorium podczas przygotowywania prób i wykonywania analiz, kosztów odczynników i dostępnej aparatury badawczej, jak również znaczenia identyfikacji NDF w materiale. Ostatni z wymienionych argumentów odnosi się szczególnie do przypadków diagnostyki onychomykoz. Spośród wielu opisanych molekularnych metod identyfikacji dermatofitów i NDF, niewiele zostało przetestowanych na większej liczbie ($N > 100$) prób klinicznych (Tabela I). Zasadniczo, nie wiadomo, które techniki są stosowane rutynowo, a które z nich pozostały jedynie na etapie badań wstępnych lub były stosowane tylko w konkretnym badaniu klinicznym. Ponadto, jak dotąd nie ma również logicznego wyjaśnienia faktu tak dużej liczby fałszywych wyników dodatnich uzyskiwanych w metodach molekularnych w porównaniu z badaniem hodowlanym [50]. Być może wyjaśnieniem jest niska wrażliwość metod hodowlanych, niemniej jednak brakuje wiarygodnych dowodów empirycznych na potwierdzenie tych sugestii.

Implementacja do laboratoriów mykologicznych technik molekularnych wydaje się kusząca z uwagi na łatwość wykonywania analiz i szybkość otrzymywania wyników, ale w praktyce nadal pozostaje nieosiągalna ze względu na niejednorodność próbek dermatologicznych. Skłania to do refleksji, czy techniki molekularne mogą całkowicie zastąpić konwencjonalną diagnostykę mykologiczną. Na obecnym etapie rozwoju metod PCR opracowanych do identyfikacji dermatofitów, zasadnym wydaje się przeprowadzanie standardowego badania mikroskopowego i hodowli na odpowiednich pożywkach, których wyniki dodatkowo są weryfikowane metodami molekularnymi. Z drugiej strony, szybkie i metodycznie proste techniki PCR pozwalają na przeprowadzanie wstępnej diagnostyki już przez lekarzy dermatologów, zanim materiał dotrze do laboratorium w celu wykonania pełnej procedury diagnostycznej. Rozstrzygnięcie tych dylematów pozostaje istotnym tematem do dyskusji w środowisku mikrobiologów. Niewątpliwie, w tym aspekcie dalszych prac wymaga optymalizacja warunków analiz i interpretacji wyników. Ważne zadanie zajmuje również edukacja klinicystów dotycząca prawidłowego pobierania i transportu próbek do laboratorium, ponieważ już na tym pierwszym etapie dochodzi do wielu błędów, skutkujących całkowitym brakiem wyniku identyfikacyjnego lub jego niską wiarygodnością.

6. Zalety i wady molekularnych metod identyfikacyjnych stosowanych w mykologii

Odnoszenie się z uprzedzeniem i punktowanie wyłącznie ograniczeń metod molekularnych stosowanych w identyfikacji dermatofitów jest z pewnością

nieobiektywne. Pomimo pewnych wątpliwości dotyczących wiarygodności wyników diagnostycznych uzyskanych tymi metodami, które pochodzą z danych statystycznych badań klinicznych, wielu autorów, jako główną zaletę wskazuje ich wysoką czułość [39, 50, 53]. Identyfikacja czynnika zakaźnego z wykorzystaniem PCR jest możliwa w większości przypadków, w których uzyskano negatywne wyniki hodowli grzybów, ale bezpośrednie badanie mykologiczne wskazuje na obecność artrospor. Z drugiej strony, niemal wszystkie zidentyfikowane morfologicznie grzyby zostały również rozpoznane molekularnie, szczególnie dotyczy to *T. rubrum* i *T. interdigitale* [39, 48, 50]. Na uwagę zasługuje fakt, że po raz pierwszy potwierdzono metodami molekularnymi, że czynnikiem etiologicznym onychomykozy mogą być grzyby pleśniowe, takie jak *Fusarium* spp., *Acremonium* spp., *Aspergillus* spp. i *Scopulariopsis* spp., które dotychczas nie były dostrzegane i uważane za kontaminację próbek dermatologicznych przesyłanych do laboratorium [37, 46, 50].

Wszystkie metody molekularne łączy jeszcze jedna zaleta, jaką jest czas niezbędny do uzyskania wyniku identyfikacji czynnika etiologicznego dermatomykozy [50]. Wynik ten można uzyskać w dniu, w którym próbka dociera do laboratorium lub następnego dnia, podczas gdy hodowla grzybów może trwać nawet 1–3 tygodni [11, 18]. Najkrótszy czas wynoszący 3 godziny od dostarczenia materiału do uzyskania wyniku podawany jest przez Miyajma i wsp. [39]. Warto więc rozważyć także praktyczną użyteczność tej cechy analiz molekularnych. Dermatomykozy nie są jednostkami chorobowymi wymagającymi natychmiastowego rozpoczęcia leczenia celowanego, a miejscowe środki przeciwgrzybicze mogą być zalecane na podstawie wyników bezpośredniego badania mykologicznego, które trwa do 20 minut. Niemniej jednak, czas uzyskania wyniku diagnostycznego jest ważny, a zwolennicy nowoczesnych sposobów kontaktu z pacjentem mogą podać argument, że zarówno wynik identyfikacji jak i receptę można wystawić elektronicznie, bez ponownej wizyty pacjenta w szpitalu bądź gabinecie lekarskim. Pozostaje do rozważenia jedynie kwestia ekonomii analiz molekularnych pojedynczych próbek dermatologicznych. Zwykle przypadki dermatomykoz nie są na tyle częste, aby w ciągu jednego dnia do laboratorium dostarczano materiał od kilku pacjentów. Pewien kompromis między czasem a kosztami wykonywania identyfikacji można uzyskać poprzez wprowadzenie systemu grupowania prób, które mogą być poddawane analizie co kilka dni.

Najpoważniejszym ograniczeniem rutynowego stosowania metod molekularnych w identyfikacji dermatofitów jest rodzaj i ilość materiału dermatologicznego. Chociaż pospolicie uważa się, że czułość technik opartych o PCR jest bardzo wysoka i nawet niewielkie ilości DNA wystarczają do ich przeprowadzenia,

w diagnostyce dermatomykoz ta zasada nie sprawdza się. Nawet stosunkowo duża próbka łusek skóry, fragmentów włosów lub zeszkrobin paznokci może nie odzwierciedlać faktycznej zawartości elementów grzybni w poddanym badaniu materiale biologicznym. Wielu autorów zauważa, że sukces w identyfikacji dermatofitu z zastosowaniem technik PCR jest wprost proporcjonalny do liczby elementów grzybni widocznych w preparacie bezpośrednim z materiału klinicznego [48, 50]. Uwagę należy zwrócić również na wysoki stopień zróżnicowania mikrobiologicznego materiału. Szczególnie dotyczy to zeszkrobin paznokci, co wręcz wyklucza możliwość stosowania technik jednoetapowych z automatyczną detekcją wyników [47, 48, 50]. Dodatkowo, oczekiwane wyniki identyfikacji grzybów w dermatomykozach skóry i włosów różnią się od uzyskiwanych w onychomykozach [7]. W pierwszym przypadku czynnikiem etiologicznym jest jeden gatunek dermatofitu spośród kilkunastu-kilkudziesięciu, w drugim jest to najczęściej *T. rubrum* i *T. interdigitale* lub w rzadkich przypadkach inne gatunki antropofilne, takie jak *T. soudanense*, jak również czynnikiem etiologicznym może być grzyb z grupy NDF [3]. Trzeba też zdawać sobie sprawę z istnienia bezobjawowych nosicieli grzybów, co dotyczy nawet *T. rubrum* [36]. Istotne w diagnostyce są również objawy kliniczne i stopień ich nasilenia, a znajomość historii choroby i otoczenia pacjenta, przede wszystkim czy jest on właścicielem zwierząt lub czy zawodowo związany jest z ich hodowlą, mogą ukierunkować dalszą identyfikację. Z tego powodu diagnostyka dermatomykoz powinna być wielokierunkowa, oparta na obserwacji objawów klinicznych i wynikach bezpośredniego badania mykologicznego, hodowli oraz technik molekularnych.

Osobną kwestią wpływającą na wiarygodność wyników identyfikacji dermatofitów technikami molekularnymi jest ryzyko kontaminacji próbek dermatologicznych. Każdy diagnosta zdaje sobie sprawę z możliwego ryzyka zanieczyszczenia w laboratorium, skutkującego fałszywie dodatnimi wynikami. W tym aspekcie istotne jest też właściwe przygotowanie i dezynfekcja miejsca pobierania próbek przed i po każdym pacjencie. Szczególne środki ostrożności są stosowane, gdy metody identyfikacji obejmują dodatkowe manipulacje z produktami PCR, zwłaszcza, gdy amplikon jest ponownie powielany w „nested” lub „semi-nested” PCR [45, 49, 53]. Rygorystyczne przestrzeganie zasad obowiązujących w laboratorium biologii molekularnej zobowiązuje do tego, aby wszelkie manipulacje z produktami PCR przeprowadzać w oddzielnym pomieszczeniu niż to, w którym wykonuje się wstępne etapy, takie jak pobieranie materiału diagnostycznego [50]. Ryzyko kontaminacji jest ograniczone przy identyfikacji za pomocą metod PCR w czasie rzeczywistym i automatycznych systemach interpretacji wyników [7, 39].

7. Podsumowanie

Metody molekularne identyfikacji czynników etiologicznych dermatomykoz w próbkach dermatologicznych są zdecydowanie atrakcyjne i mają wiele zalet. Obecnie, niewiele jest laboratoriów mykologicznych wykorzystujących te techniki w rutynowej diagnostyce, a te z nich, które posługują się nimi, są pionierami. Stanowisko mikrobiologów jest jasne, czas, kiedy diagnostyka molekularna zastąpi konwencjonalne techniki oparte na hodowli dermatofitów i ocenie ich morfologii nieubłagane nadchodzi. W chwili obecnej ważne jest, aby doświadczenie zdobyte w laboratoriach pionierskich stało się szeroko udostępniane, a zdolność rozdzielać nowo opracowywanych, wiarygodnych, szybkich i tanich metod molekularnych nie ograniczała się do identyfikacji kilku gatunków.

Piśmiennictwo

- Alexander C.L., Shankland G.S., Carman W., Williams C.: Introduction of a dermatophyte polymerase chain reaction assay to the diagnostic mycology service in Scotland. *Br. J. Dermatol.* **164**, 966–972 (2011)
- Arabatzis M., Bruijnesteijn van Coppenraet L.E.S., Kuijper E.J., de Hoog G.S., Lavrijsen A.P.M., Templeton K., van der Raaij-Helmer E.M.H., Velegaki A., Graser Y., Summerbell R.C.: Diagnosis of common dermatophyte infections by a novel multiplex real-time polymerase chain reaction detection/identification scheme. *Br. J. Dermatol.* **157**, 681–689 (2007)
- Baudraz-Rosselet F., Ruffieux C., Lurati M., Bontems O., Monod M.: Onychomycosis insensitive to systemic terbinafine and azole treatments reveals non-dermatophyte moulds as infectious agents. *Dermatology*, **220**, 164–168 (2010)
- Beguín H., Pyck N., Hendrickx M., Planard C., Stubbe D., Detandt M.: The taxonomic status of *Trichophyton quinckeanum* and *T. interdigitale* revisited: a multigene phylogenetic approach. *Med. Mycol.* **50**, 871–882 (2012)
- Beifuss B., Bezold G., Gottlober P., Borelli C., Wagener J., Schaller M., Kortling H.C.: Direct detection of five common dermatophyte species in clinical samples using a rapid and sensitive 24-h PCR-ELISA technique open to protocol transfer. *Mycoses*, **54**, 137–145 (2011)
- Bergman A., Heimer D., Kondori N., Enroth H.: Fast and specific dermatophyte detection by automated DNA extraction and real-time PCR. *Clin. Microbiol. Infect.* **19**, E205–11 (2013)
- Bergmans A.M.C., van der Ent M., Klaassen A., Bohm N., Andriess G.I., Wintermans R.G.F.: Evaluation of a single-tube real-time PCR for detection and identification of 11 dermatophyte species in clinical material. *Clin. Microbiol. Infect.* **16**, 704–710 (2010)
- Bontems O., Hauser P.M., Monod M.: Evaluation of a polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism assay for dermatophyte and nondermatophyte identification in onychomycosis. *Br. J. Dermatol.* **161**, 791–796 (2009)
- Brasch J., Beck-Jendroschek V., Glaser R.: Fast and sensitive detection of *Trichophyton rubrum* in superficial tinea and onychomycosis by use of a direct polymerase chain reaction assay. *Mycoses*, **54**, e313–7 (2011)

10. Brillowska-Dabrowska A., Michalek E., Saunte D.M.L., Nielsen S.S., Arendrup M.C.: PCR test for *Microsporium canis* identification. *Med. Mycol.* **51**, 576–579 (2013)
11. Brillowska-Dabrowska A., Nielsen S.S., Nielsen H.V., Arendrup M.C.: Diagnostic PCR tests for *Microsporium audouinii*, *M. canis* and *Trichophyton infections*. *Med. Mycol.* **48**, 486–490 (2010)
12. Brillowska-Dabrowska A., Saunte D.M., Arendrup M.C.: Five-hour diagnosis of dermatophyte nail infections with specific detection of *Trichophyton rubrum*. *J. Clin. Microbiol.* **45**, 1200–1204 (2007)
13. Chollet A., Cattin V., Fratti M., Mignon B., Monod M.: Which Fungus Originally was *Trichophyton mentagrophytes*? Historical Review and Illustration by a Clinical Case. *Mycopathologia*, **180**, 1–5 (2015)
14. Derakshani M., Lukow T., Liesack W.: Novel bacterial lineages at the (sub)division level as detected by signature nucleotide-targeted recovery of 16S rRNA genes from bulk soil and rice roots of flooded rice microcosms. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 623–631 (2001)
15. Dhib I., Fathallah A., Yaacoub A., Hadj Slama F., Said M.B., Zemni R.: Multiplex PCR assay for the detection of common dermatophyte nail infections. *Mycoses*, **57**, 19–26 (2014)
16. Ebihara M., Makimura K., Sato K., Abe S., Tsuboi R.: Molecular detection of dermatophytes and nondermatophytes in onychomycosis by nested polymerase chain reaction based on 28S ribosomal RNA gene sequences. *Br. J. Dermatol.* **161**, 1038–1044 (2009)
17. Elavarashi E., Kindo A.J., Kalyani J.: Optimization of PCR-RFLP Directly from the Skin and Nails in Cases of Dermatophytosis, Targeting the ITS and the 18S Ribosomal DNA Regions. *J. Clin. Diagn. Res.* **7**, 646–651 (2013)
18. Gnat S., Nowakiewicz A., Ziółkowska G., Trościańczyk A., Majer-Dziedzic B., Zięba P.: Evaluation of growth conditions and DNA extraction techniques used in the molecular analysis of dermatophytes. *J. Appl. Microbiol.* **122**, 1368–1379 (2017)
19. Gnat S., Łagowski D., Nowakiewicz A., Zięba P.: Phenotypic characterization of enzymatic activity of clinical dermatophyte isolates from animals with and without skin lesions and humans. *J. Appl. Microbiol.* **125**, 700–709 (2018)
20. Gnat S., Łagowski D., Nowakiewicz A., Trościańczyk A., Zięba P.: Infection of *Trichophyton verrucosum* in cattle breeders, Poland: A 40-year retrospective study on the genomic variability of strains. *Mycoses*, **61**, 681–690 (2018)
21. Gnat S., Łagowski D., Nowakiewicz A., Zięba P.: *Tinea corporis* by *Microsporium canis* in mycological laboratory staff: Unexpected results of epidemiological investigation. *Mycoses*, **61**, 945–953 (2018)
22. Gnat S., Nowakiewicz A., Łagowski D., Trościańczyk A., Zięba P.: Multiple-strain *Trichophyton mentagrophytes* infection in a silver fox (*Vulpes vulpes*) from a breeding farm. *Med. Mycol.* **57**, 171–180 (2019)
23. Gnat S., Nowakiewicz A., Zięba P.: Taksonomia dermatofitów – systemy klasyfikacyjne się zmieniają, problemy identyfikacyjne pozostają te same. *Post. Mikrobiol.* **58**, 49–58 (2019)
24. Graser Y., El Fari M., Vilgalys R., Kuijpers A.F., De Hoog G.S., Presber W., Tietz H.: Phylogeny and taxonomy of the family *Arthrodermataceae* (dermatophytes) using sequence analysis of the ribosomal ITS region. *Med. Mycol.* **37**, 105–114 (1999)
25. Graser Y., Kuijpers A.F., Presber W., De Hoog G.S.: Molecular taxonomy of *Trichophyton mentagrophytes* and *T. tonsurans*. *Med. Mycol.* **37**, 315–330 (1999)
26. Gupta M., Sharma N.L., Kanga A.K., Mahajan V.K., Tegta G.R.: Onychomycosis: Clinico-mycologic study of 130 patients from Himachal Pradesh, India. *Indian J. Dermatol. Venereol. Leprol.* **73**, 389–392 (2007)
27. Hirai A., Kano R., Nakamura Y., Watanabe S., Hasegawa A.: Molecular taxonomy of dermatophytes and related fungi by chitin synthase I (CHS1) gene sequences. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **83**, 11–20 (2003)
28. de Hoog G.S., Dukik K., Monod M., Packeu A., Stubbe D., Hendrickx M., Kupsch C., Stielow J.B., Freeke J., Goker M., Rezaei-Matehkolaei A., Mirhendi H., Graser Y.: Toward a novel multilocus phylogenetic taxonomy for the dermatophytes. *Mycopathologia*, **182**, 5–31 (2017)
29. Kanbe T., Suzuki Y., Kamiya A., Mochizuki T., Fujihira M., Kikuchi A.: PCR-based identification of common dermatophyte species using primer sets specific for the DNA topoisomerase II genes. *J. Dermatol. Sci.* **32**, 151–161 (2003)
30. Kanbe T., Suzuki Y., Kamiya A., Mochizuki T., Kawasaki M., Fujihira M., Kikuchi A.: Species-identification of dermatophytes *Trichophyton*, *Microsporium* and *Epidermophyton* by PCR and PCR-RFLP targeting of the DNA topoisomerase II genes. *J. Dermatol. Sci.* **33**, 41–54 (2003)
31. Kano R., Hirai A., Muramatsu M., Watari T., Hasegawa A.: Direct detection of dermatophytes in skin samples based on sequences of the chitin synthase I (CHS1) gene. *J. Vet. Med. Sci.* **65**, 267–270 (2003)
32. Kardjeva V., Summerbell R., Kantardjiev T., Devliotou-Panagiotidou D., Sotiriou E., Graser Y.: Forty-eight-hour diagnosis of onychomycosis with subtyping of *Trichophyton rubrum* strains. *J. Clin. Microbiol.* **44**, 1419–1427 (2006)
33. Kim J.Y., Choe Y.B., Ahn K.J., Lee Y.W.: Identification of dermatophytes using multiplex polymerase chain reaction. *Ann. Dermatol.* **23**, 304–312 (2011)
34. Kondori N., Abrahamsson A.L., Ataollahy N., Wenneras C.: Comparison of a new commercial test, Dermatophyte-PCR kit, with conventional methods for rapid detection and identification of *Trichophyton rubrum* in nail specimens. *Med. Mycol.* **48**, 1005–1008 (2010)
35. Lee H.K., Kim H.R., Mengoni A., Lee D.H.: Modified T-RFLP methods for taxonomic interpretation of T-RF. *J. Microbiol. Biotechnol.* **18**, 624–630 (2008)
36. Łagowski D., Gnat S., Nowakiewicz A., Osińska M., Zięba P.: Prewalencja symptomatycznych dermatofitów u psów i kotów oraz mechanizm infekcji dermatofitowych. *Post. Mikrobiol.* **58**, 165–176 (2019)
37. Macura B., Skóra M.: 21-year retrospective study of the prevalence of *Scopulariopsis brevicaulis* in patients suspected of superficial mycoses. *Post. Dermatol. Alergol.* **32**, 189–194 (2015)
38. Mehlig L., Garve C., Ritschel A., Zeiler A., Brabetz W., Weber C., Bauer A.: Clinical evaluation of a novel commercial multiplex-based PCR diagnostic test for differential diagnosis of dermatomycoses. *Mycoses*, **57**, 27–34 (2014)
39. Miyajima Y., Satoh K., Uchida T., Yamada T., Abe M., Watanabe S. ichi, Makimura M., Makimura K.: Rapid real-time diagnostic PCR for *Trichophyton rubrum* and *Trichophyton mentagrophytes* in patients with tinea unguium and tinea pedis using specific fluorescent probes. *J. Dermatol. Sci.* **69**, 229–235 (2013)
40. Monod M., Bontems O., Zaugg C., Lechenne B., Fratti M., Panizzon R.: Fast and reliable PCR/sequencing/RFLP assay for identification of fungi in onychomycoses. *J. Med. Microbiol.* **55**, 1211–1216 (2006)
41. Ohst T., Kupsch C., Graser Y.: Detection of common dermatophytes in clinical specimens using a simple quantitative real-time TaqMan polymerase chain reaction assay. *Br. J. Dermatol.* **174**, 602–609 (2016)
42. Pankewitz F., Nenoff P., Uhrlass S., Bezold G., Winter I., Graser Y.: Development of a novel polymerase chain reaction-

- enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of *Trichophyton rubrum* onychomycosis. *Br. J. Dermatol.* **168**, 1236–1242 (2013)
43. Paugam A., Lollivier C., Viguie C., Anaya L., Mary C., de Ponthilly G., Ranque S.: Comparison of real-time PCR with conventional methods to detect dermatophytes in samples from patients with suspected dermatophytosis. *J. Microbiol. Methods*, **95**, 218–222 (2013)
44. Piri F., Zarei Mahmoudabadi A., Ronagh A., Ahmadi B., Makimura K., Rezaei-Matehkolaei A.: Assessment of a pan-dermatophyte nested-PCR compared with conventional methods for direct detection and identification of dermatophytosis agents in animals. *Mycoses*, **61**, 837–844 (2018)
45. Sakamoto M., Takeuchi Y., Umeda M., Ishikawa I., Benno Y.: Application of terminal RFLP analysis to characterize oral bacterial flora in saliva of healthy subjects and patients with periodontitis. *J. Med. Microbiol.* **52**, 79–89 (2003)
46. Skora M., Bielecki J., Bulanda M., Macura A., Jagielski T.: Grzyby z rodzaju *Scopulariopsis* – mało znane patogeny człowieka. *Post. Mikrobiol.* **54**, 44–52 (2015)
47. Uchida T., Makimura K., Ishihara K., Goto H., Tajiri Y., Okuma M., Fujisaki R., Uchida K., Abe S., Iijima M.: Comparative study of direct polymerase chain reaction, microscopic examination and culture-based morphological methods for detection and identification of dermatophytes in nail and skin samples. *J. Dermatol.* **36**, 202–208 (2009)
48. Verrier J., Krahenbuhl L., Bontems O., Fratti M., Salamin K., Monod M.: Dermatophyte identification in skin and hair samples using a simple and reliable nested polymerase chain reaction assay. *Br. J. Dermatol.* **168**, 295–301 (2013)
49. Verrier J., Monod M.: Diagnosis of dermatophytosis using molecular biology. *Mycopathologia*, **182**, 193–202 (2017)
50. Verrier J., Pronina M., Peter C., Bontems O., Fratti M., Salamin K., Schurch S., Gindro K., Wolfender J.L., Harshman K., Monod M.: Identification of infectious agents in onychomycoses by PCR-terminal restriction fragment length polymorphism. *J. Clin. Microbiol.* **50**, 553–561 (2012)
51. Vinten A.J.A., Artz R.R.E., Thomas N., Potts J.M., Avery L., Langan S.J., Watson H., Cook Y., Taylor C., Abel C., Reid E., Singh B.K.: Comparison of microbial community assays for the assessment of stream biofilm ecology. *J. Microbiol. Methods*, **85**, 190–198 (2011)
52. Wisselink G.J., van Zanten E., Kooistra-Smid A.M.D.: Trapped in keratin; a comparison of dermatophyte detection in nail, skin and hair samples directly from clinical samples using culture and real-time PCR. *J. Microbiol. Methods*, **85**, 62–66 (2011)
53. Yang G., Zhang M., Li W., An L.: Direct Species Identification of Common Pathogenic Dermatophyte Fungi in Clinical Specimens by Semi-nested PCR and Restriction Fragment Length Polymorphism. *Mycopathologia*, **166**, 203–208 (2008)
54. Ziółkowska G., Nowakiewicz A., Gnat S., Trościańczyk A., Zieba P., Majer Dziedzic B.: Molecular identification and classification of *Trichophyton mentagrophytes* complex strains isolated from humans and selected animal species. *Mycoses*, **58**, 119–126 (2015)