

UNIVERZITET U BEOGRADU

MEDICINSKI FAKULTET

Eleonora S. Dubljanin

**VALIDNOST RAZLIČITIH
LABORATORIJSKIH METODA ZA
DIJAGNOZU ONIHOMIKOZA I
IDENTIFIKACIJA FAKTORA RIZIKA**

Doktorska disertacija

Beograd, 2016

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF MEDICINE

Eleonora S. Dubljanin

**VALIDITY OF DIFFERENT LABORATORY
METHODS IN DIAGNOSIS OF
ONYCHOMYCOSIS AND IDENTIFICATION
OF RISK FACTORS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2016

mentor: doc. dr Ivana Čolović Čalovski

Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

komentor: prof. dr Sandra Šipetić-Grujičić

Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

Članovi komisije za odbranu doktorske disertacije:

1. prof. dr Aleksandar Džamić, predsednik komisije

Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

2. doc. dr Snežana Minić

Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

3. doc. dr Nataša Maksimović

Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

4. prof. dr Zorana Gledović, profesor u penziji

Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

5. prof. dr Nataša Miladinović-Tasić

Medicinski fakultet Univerziteta u Nišu

Datum odbrane:

Sažetak

Uvod: Onihomikoza predstavlja gljivičnu infekciju jednog ili više noktiju koja je izazvana bilo kojom vrstom gljiva: dermatofitima, kvasnicama ili nedermatofitnim plesnima. Oboljenje može da zahvati bilo koji deo nokta, uključujući matriks, nokatno ležište i/ili nokatnu ploču. Procene su da oko 5% svetske populacije ima neki oblik onihomikoze i zbog toga ova bolest predstavlja značajan zdravstveni problem. Novije studije ukazuju da je u zemljama zapadne i centralne Evrope prevalencija onihomikoza 3 – 22%. Kada je u pitanju Srbija, ne postoje podaci o učestalosti onihomikoza niti o najčešćim uzročnicima ovog oboljenja kod naših pacijenata.

Ciljevi: Određivanje učestalosti javljanja onihomikoza, kao i najčešćih uzročnika onihomikoza kod pacijenata sa kliničkom sumnjom na onihomikozu, analiziranje validnosti različitih laboratorijskih metoda za dijagnozu onihomikoza, ispitivanje uticaja primene tripsina na bolju identifikaciju uzročnika onihomikoza, identifikovanje faktora koji doprinose nastajanju onihomikoza.

Materijal i metode: Studija slučajeva obuhvatila je 374 pacijenata sa kliničkom sumnjom na onihomikozu iz šest ustanova: Institut za Mikrobiologiju i imunologiju, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu; Zavod za javno zdravlje, Pančevo; Opšta bolnica „Dr Đorđe Joanović“, Zrenjanin; Opšta bolnica, Užice; Zavod za javno zdravlje „Timok“, Zaječar; Zavod za javno zdravlje, Kraljevo. Podaci od pacijenata su prikupljeni odgovarajućim anketnim upitnikom. Od svakog pacijenta uzet je uzorak nokta u zavisnosti od kliničkog tipa onihomikoze i poslat u Institut za mikrobiologiju i imunologiju, Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu gde je vršena dalja obrada materijala. U cilju identifikovanja uzročnog faktora onihomikoze za svaki uzorak nokta urađeni su sledeći laboratorijski testovi, sa i bez prethodnog tretiranja tripsinom: direktan mikroskopski preparat sa KOH, direktan mikroskopski preparat sa *Blankophor*-om, kultivisanje na neselektivnim mikološkim podlogama SDA i RSDA, kao i selektivnoj podlozi za dermatofite DTM. Svaki uzorak nokta je testiran i pomoću Dermatophyte PCR kita kojim je moguće identifikovati dermatofite uopšteno (panderm marker), kao i specifično *Trichophyton rubrum*. Kriterijum za postavljanje dijagnoze onihomikoze podrazumevao je postojanje jasne kliničke sumnje na onihomikozu uz pozitivnost bilo kog laboratorijskog testa. Na osnovu laboratorijske

dijagnoze ispitanici su podeljeni u dve grupe: osobe sa laboratorijski potvrđenom dijagnozom onihomikoze i pacijenti bez ovog oboljenja, u cilju identifikacije faktora rizika za nastajanje onihomikoze. Kod svakog pacijenta određivan je klinički SCIO indeks. U statističkoj obradi podataka primenjene su univarijantna i multivarijantna logistička regresiona analiza. Statistička analiza značajnosti uočenih razlika vršena je primenom χ^2 testa. Za svaki ispitivani test, odnosno njihove kombinacije, određivana je osetljivost, specifičnost, pozitivna i negativna prediktivna vrednost, pozitivni i negativni faktori verovatnoće kao i dijagnostički unakrsni odnos. Odnos između osetljivosti i specifičnosti ispitivanih metoda predstavljena je pomoću ROC krive.

Rezultati: Najčešći klinički tip onihomikoze je bio distalna i lateralna subungvalna onihomikoza (92,51%). Na osnovu vrednosti SCIO indeksa 178 (47,59%) pacijenata je bilo indikovano za sistemsku antimikotičnu terapiju. Od ukupno 374 pacijenata sa sumnjom na onihomikozu, oboljenje je potvrđeno laboratorijskim testovima kod 190 (50,8%), dok je kod čak 20% pozitivnih pacijenata bio pozitivan samo PCR. Najčešći izazivači onihomikoze su bili dermatofiti (88,95%), od kojih su najčešći bili *Trichophyton rubrum* (89,35%) i *Trichophyton interdigitale* (8,28%). U manjem procentu identifikovane su i kvasnice (6,84%), kao i nedermatofitne plesni (4,21%). Onihomikoza je bila 6 puta češće lokalizovana na noktima na nogama u odnosu na nokte na rukama (163:27). Izazivači onihomikoze na noktima na nogama su bili dermatofiti kod 95,1% pacijenata, od kojih je najzastupljeniji bio *Trichophyton rubrum* (86,6%). Na noktima na rukama najčešći izazivači onihomikoze su bili dermatofiti (52%) i kvasnice (44%). Najveći stepen pozitivnosti na noktima na nogama (48,29%) detektovan je pomoću PCR metode koja je i uzeta za zlatni standard za određivanje validnosti ispitivanih laboratorijskih testova. Kod onihomikoze lokalizovane na noktima na rukama, najviše pozitivnih pacijenata je detektovano *Blankophor*-om u kombinaciji sa RSDA (43,40%) koja je i uzeta za zlatni standard za određivanje validnosti primenjenih laboratorijskih metoda. Tripsinizacijom metodom po Xess-u značajno je povećan stepen pozitivnosti kako direktnog mikroskopskog preparata ($p < 0,001$), tako i kultivisanja na svim ispitivanim mikološkim podlogama (SDA, RSDA, DTM) ($p < 0,001$).

U konačni model multivarijantne logističke regresione analize bilo je uključeno šesnaest varijabli: uzrast, zanimanje, kompromitovana periferna cirkulacija, ranije prisustvo onihomikoze, pozitivna porodična anamneza za onihomikozu, putovanje u poslednjih godinu dana, bavljenje sportom, kontakt sa zemljom, pojačano znojenje nogu, stepen zahvaćenosti nokta, stepen zadebljanja nokta, broj zahvaćenih noktiju, lokalizacija onihomikoze, SCIO

indeks, paronihija i deformacija nokta. Na osnovu rezultata multivarijantne logističke regresione analize nezavisni faktori rizika, koji su bili značajno povezani sa nastankom onihomikoze su: stariji uzrast (UO=2,33; $p<0,001$), pozitivna porodična anamneza za onihomikozu (UO=2,71; $p=0,001$), pojačano znojenje nogu (UO=2,28; $p=0,001$) i veći stepen zadebljanja nokta (UO=2,04; $p<0,001$).

Zaključci: Identifikacijom najčešćih uzročnih faktora onihomikoze primećena je predominacija dermatofita što je u skladu sa rezultatima drugih studija i može biti od koristi u cilju sagledavanja epidemiološke situacije i planiranja strategija za prevenciju onihomikoza u Srbiji. Značajan doprinos predstavlja i uvid o značaju primene pojedinih konvencionalnih, kao i metoda molekularne biologije u dijagnozi onihomikoza s obzirom da je u ovoj studiji po prvi put u Srbiji korišćena molekularna metodologija u cilju laboratorijske potvrde dijagnoze onihomikoza. Rezultati ove doktorske disertacije bi mogli da pomognu u određivanju najpovoljnijeg laboratorijskog protokola za pouzdanu identifikaciju uzročnika onihomikoza prilagođenog našoj lokalnoj epidemiološkoj situaciji kao i ekonomskim prilikama.

KLJUČNE REČI: onihomikoza, epidemiologija, etiologija, dermatofiti, SCIO indeks, laboratorijska dijagnoza, PCR, validnost, faktori rizika

naučna oblast: medicina

uža naučna oblast: epidemiologija, mikrobiologija

Abstract

Background: Onychomycosis represents fungal infection of one or more nails caused by any type of fungi: dermatophytes, yeasts or nondermatophyte molds. The disease can affect any part of the nail, including matrix, nail bed and/or nail plate. It is estimated that about 5% of the world's population has some form of onychomycosis which makes it a significant health problem. Recent studies indicate that in the countries of Western and Central Europe, the prevalence of onychomycosis is 3-22%. Regarding Serbia, there are no data on frequency of onychomycosis nor about the most common causes of this disease in our patients.

Aims: Determination of frequency of onychomycosis, as well as the most common causes of onychomycosis in patients with clinical suspicion of onychomycosis, analyzing the validity of the different laboratory methods in the diagnosis of onychomycosis, investigation of the impact of application of trypsin in better identification of causative agents of onychomycosis, identification of risk factors associated with onychomycosis.

Material and methods: The case study included 374 patients with clinical suspicion of onychomycosis from six institutions: Institute of Microbiology and Immunology, Faculty of Medicine, University of Belgrade; Department of Public Health, Pančevo; General Hospital "Dr Đorđe Joanović", Zrenjanin; General Hospital Užice; Public Health Institute "Timok", Zaječar; Department of Public Health, Kraljevo. Data from patients was collected by appropriate questionnaire. From each patient a nail sample was taken according to clinical type of onychomycosis and was sent to the Institute of Microbiology and Immunology, Faculty of Medicine, University of Belgrade, where further processing of the material was done. In order to identify the causative agent of onychomycosis each nail sample underwent the following laboratory tests, with and without previous treatment with trypsin: direct microscopic examination with KOH, direct microscopic examination with Blankophor, culturing on non-selective mycologic media SDA and RSDA, and on selective medium for dermatophytes DTM. Each nail sample was also tested by Dermatophyte PCR Kit which can identify dermatophytes in general (panderm marker), as well as the specific identification of *Trichophyton rubrum*. The criteria for the diagnosis of onychomycosis implied the existence of clear clinical suspicion of onychomycosis with positivity of any laboratory test. Based on laboratory diagnosis, subjects were divided into two groups: patients with a laboratory confirmed diagnosis of onychomycosis and subjects without the disease, in order to identify risk factors for onychomycosis. Clinical SCIO index was calculated for each patient. In

statistical analysis were used univariate and multivariate logistic regression analyses. Statistical analysis of the significance of the observed difference was performed by using chi-square test. For each test as well as any combination thereof, the sensitivity and specificity, positive and negative predictive value, positive and negative likelihood ratio and diagnostic odds ratio were calculated. The relationship between sensitivity and specificity of laboratory test methods was presented by ROC curve.

Results: The most common clinical type of onychomycosis was distal and lateral subungual onychomycosis (92.51%). Based on the SCIO index value 178 (47.59%) patients were indicated for systemic antimycotic therapy. From 374 patients with suspected onychomycosis, the disease is confirmed by laboratory tests in 190 (50.8%), while up to 20% of positive patients tested positive only by PCR. The most frequent causative agent of onychomycosis were dermatophytes (88.95%), of which the most common were *Trichophyton rubrum* (89.35%) and *Trichophyton interdigitale* (8.28%). In lower percentage were identified yeasts (6.84%), and nondermatophyte molds (4.21%). Onychomycosis was 6 times more often localized on toenails compared to fingernails (163:27). Aetiologic agents of onychomycosis in toenails were dermatophytes detected in 95.1% patients, of which the most common was *Trichophyton rubrum* (86.6%). On fingernails the most common causes of onychomycosis were dermatophytes (52%) and yeasts (44%). The highest degree of positivity on toenails (48.29%) was detected by PCR method which is chosen as gold standard for determination of validity of applied tests. In fingernails, the most positive patients were detected by Blankophor in combination with RSDA (43.40%), which is taken as gold standard for determination of validity of applied test methods. Significant increase in positivity level of direct microscopic preparation ($p < 0.001$), as well as cultivation on all tested mycological media (SDA, RSDA, DTM) ($p < 0.001$) was observed using trypsinization method by Xess.

In the final model of multivariate logistic regression analysis were included sixteen variables: age, occupation, compromised peripheral circulation, a positive personal history for onychomycosis, a positive family history for onychomycosis, travel in past year, sports, contact with the soil, excessive feet sweating, degree of nail involvement, degree of nail thickening, the number of affected nails, localization of onychomycosis, SCIO index, paronychia and nail deformity. Based on the results of multivariate logistic regression analysis, independent risk factors that were significantly associated with the occurrence of onychomycosis are: older age (OR=2.33; $p < 0.001$), a positive family history for

onychomycosis (OR=2.71; p =0.001), excessive feet sweating (OR=2.28; p=0.001) and a higher degree of nail thickening (OR=2.04; p<0.001).

Conclusions: Identification of the most common causative agents of onychomycosis revealed the predominance of dermatophytes which is consistent with other studies and may be useful in discerning the epidemiological situation and planning strategies in prevention of onychomycosis in Serbia. A significant contribution is insight in the importance of certain conventional and methods of molecular biology in the diagnosis of onychomycosis since that in this study for the first time in Serbia molecular methodology was used in laboratory confirmation of the diagnosis of onychomycosis. The results of this doctoral thesis could help in determining the optimal laboratory protocols for reliably identification of causative agents of onychomycosis suitable to our local epidemiology and the economic situation.

KEY WORDS: onychomycosis, epidemiology, aetiology, dermatophytes, SCIO index, laboratory diagnosis, PCR, validity, risk factors

scientific area: medicine

narrow area of expertise: epidemiology, microbiology

Sadržaj

1. Uvod	2
1.1. Definicija i terminologija onihomikoza.....	2
1.2. Epidemiologija onihomikoza.....	3
1.3. Etiologija onihomikoza	3
1.3.1. Dermatofiti	4
1.3.1.1. Taksonomija dermatofita.....	5
1.3.1.1.1. <i>Trichophyton rubrum</i> kompleks.....	10
1.3.1.1.2. <i>Trichophyton mentagrophytes</i> kompleks	11
1.3.2. Kvasnice	11
1.3.3. Nedermatofitne plesni	12
1.4. Podela onihomikoza	12
1.5. Način prenosa infekcije.....	13
1.6. Patogeneza	14
1.6.1. Adherencija i adhezini	15
1.6.2. Rast na keratinskim strukturama i razgradnja proteina.....	15
1.6.2.1. Redukcija cistinskih disulfidnih mostova	17
1.6.2.2. Sekretorne proteaze dermatofita	17
1.6.2.2.1. Sekretorne endoproteaze dermatofita	17
1.6.2.2.2. Sekretorne egzoproteaze dermatofita.....	18
1.7. Klinička slika	18
1.7.1. Distalna i lateralna subungvalna onihomikoza (DLSO)	18
1.7.2. Superficialna bela onihomikoza (SBO).....	19
1.7.3. Proksimalna subungvalna onihomikoza (PSO).....	20
1.7.4. Endonyx onihomikoza	21
1.7.5. Candida onihomikoza	22
1.7.5.1. Hronična paronihija sa sekundarnom distrofijom nokta	23

1.7.5.2. Distalna infekcija nokta (<i>Candida oniholiza</i>)	23
1.7.5.3. Hronična mukokutana kandidoza (<i>Candida granulom</i>)	23
1.7.5.4. Sekundarna <i>Candida</i> onihomikoza	24
1.7.6. Totalna distrofična onihomikoza (TDO)	24
1.8. Faktori rizika za nastanak onihomikoza	25
1.8.1. Uзраст.....	25
1.8.2. Pol	25
1.8.3. Genetski faktori	26
1.8.4. Imunosupresija	26
1.8.5. Šećerna bolest.....	27
1.8.6. Psorijaza.....	27
1.8.7. Kompromitovana periferna cirkulacija.....	28
1.8.8. Upražnjavanje sportskih aktivnosti	28
1.9. Imunski odgovor.....	28
1.9.1. Urođeni imunski odgovor.....	29
1.9.2. Stečeni imunski odgovor	30
1.9.2.1. Humoralna imunost.....	30
1.9.2.2. Čelijski posredovan imunski odgovor	30
1.10. SCIO indeks	30
1.11. Laboratorijska dijagnoza onihomikoze	32
1.11.1. Uzorkovanje	33
1.11.2. Direktna mikroskopija.....	33
1.11.3. Patohistološki preparati	34
1.11.4. Kultivisanje	35
1.11.5. Metode molekularne biologije	36
1.11.5.1. Ekstrakcija DNK.....	37
1.11.5.2. Izbor adekvatnih ciljnih molekula	37

1.11.5.3. Konvencionalni PCR.....	38
1.11.5.4. Real-time PCR.....	38
1.11.5.5. Post-PCR tehnike	39
1.12. Terapija onihomikoza	39
1.12.1. Lokalna antimikotična terapija	40
1.12.2. Sistemska antimikotična terapija.....	41
1.12.3. Kombinovana terapija	44
1.12.4. Avulzija nokta	45
1.12.5. Terapija laserom	45
1.12.6. Fotodinamska terapija	46
1.13. Prevencija onihomikoza	46
2. Ciljevi istraživanja:	49
3. Materijal i metode.....	51
3.1. Dizajn studije i izbor ispitanika	51
3.2. Prikupljanje podataka	51
3.3. Prikupljanje uzoraka noktiju	52
3.4. Obrada uzoraka noktiju u mikološkoj laboratoriji	53
3.4.1. Konvencionalna mikološka laboratorijska dijagnoza	53
3.4.1.1. Direktni mikroskopski preparat sa KOH.....	53
3.4.1.2. Direktni mikroskopski preparat sa <i>Blankophor</i> -om	53
3.4.1.3. Kultivisanje na SDA	54
3.4.1.4. Kultivisanje na razblaženom SDA	54
3.4.1.5. Kultivisanje na DTM.....	55
3.4.1.6. Identifikacija izolovanih gljiva	55
3.4.2. Tripsinizacija metodom po Xess-u.....	56
3.4.3. Molekularna dijagnostika	57
3.4.3.1. Izolacija DNK.....	57

3.4.3.2. PCR prajmeri	58
3.4.3.3.Priprema <i>Master mix</i> -a	58
3.4.3.4. Reakcija lančanog umnožavanja – PCR	59
3.4.3.5. Elektroforeza i vizuelizacija produkata reakcije lančanog umnožavanja	59
3.5. Kriterijum za postavljanje dijagnoze onihomikoze	60
3.6. Određivanje SCIO indeksa	61
3.7. Statistička analiza	62
4. Rezultati	64
4.1. Karakteristike osoba sa sumnjom na onihomikozu	64
4.1.1. Demografske karakteristike osoba sa sumnjom na onihomikozu	64
4.1.2. Kliničke karakteristike osoba sa sumnjom na onihomikozu	66
4.2. Učestalost javljanja i najčešći izazivači onihomikoza	68
4.3. Validnost različitih laboratorijskih metoda za dijagnozu onihomikoza	72
4.3.1. Validnost korišćenih laboratorijskih metoda kod pacijenata sa sumnjom na onihomikozu na noktima na nogama	78
4.3.2. Validnost korišćenih laboratorijskih metoda kod pacijenata sa sumnjom na onihomikozu na noktima na rukama	81
4.4. Poređenje tripsinizacije metodom po Xess-u sa konvencionalnim metodama za dijagnozu onihomikoze	84
4.5. Faktori koji doprinose nastanku onihomikoza	85
5. Diskusija	93
6. Zaključci	108
7. Literatura	111

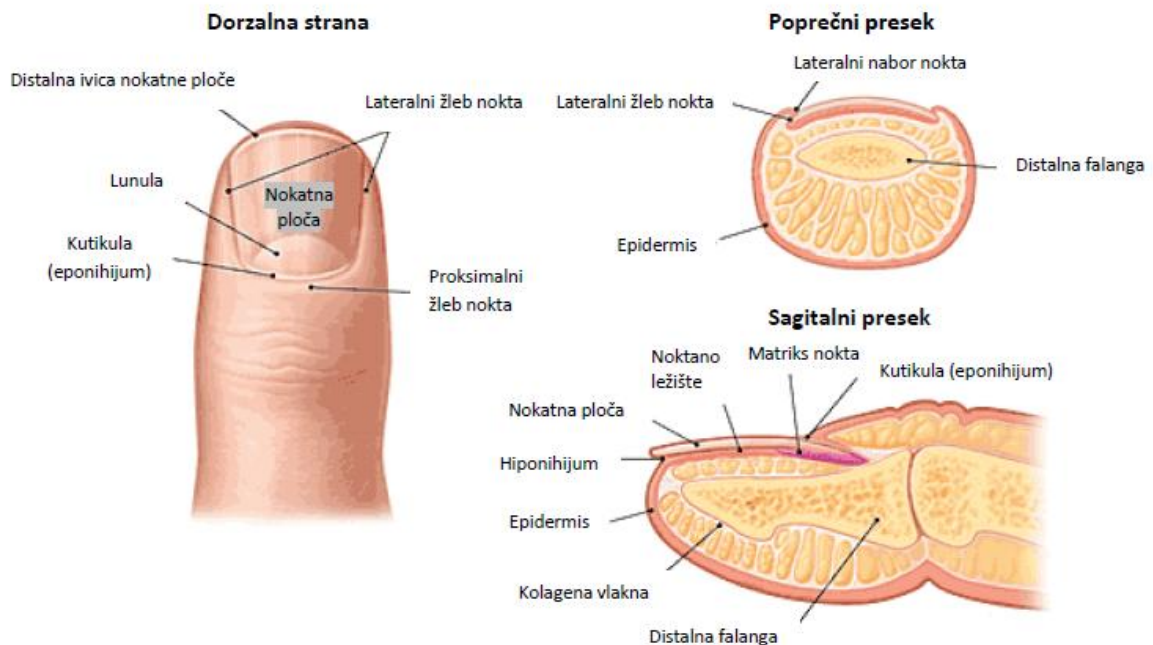
Uvod

1. Uvod

1.1. Definicija i terminologija onihomikoza

Onihomikoza predstavlja gljivičnu infekciju jednog ili više noktiju koja je izazvana bilo kojom vrstom gljiva: dermatofitima, kvasnicama ili nedermatofitnim plesnima. Oboljenje može da zahvati bilo koji deo nokta, uključujući matriks, nokatno ležište i/ili nokatnu ploču (Slika 1) (Singal et Khanna, 2011).

Termin onihomikoza, nastao je od grčkih reči „onyx“ što znači nokat i „mykes“ što znači gljiva, ranije se koristio da označi gljivičnu infekciju nokta izazvanu nedermatofitnim plesnima. Danas se koristi kao univerzalni termin kojim se označava infekcija nokta izazvana bilo kojim vrstom gljiva. Termin *tinea unguium* specifično se odnosi na infekciju nokta izazvanu dermatofitima (Kaur et al, 2008).



Slika 1. Anatomski prikaz zdravog nokta. (Preuzeto i modifikovano od Dave Klemm, 2006.)

1.2. Epidemiologija onihomikoza

Procene su da oko 5% svetske populacije ima neki oblik onihomikoze i zbog toga ova bolest predstavlja značajan zdravstveni problem (Grover et Khurana, 2012). Prema podacima iz literature u Severnoj Americi prevalencija onihomikoze je 7-9%, dok je u Evropi 2-8% (Elewski et al, 2002; Sigurgeirsson et al, 2002a). Međutim, smatra se da to zapravo nisu prave vrednosti, da je prevalencija znatno viša, a da su prethodno navedene vrednosti posledica neadekvatnog dijagnostikovanja oboljenja (Effendy et al, 2005). Novije studije ukazuju da je u zemljama zapadne i centralne Evrope prevalencija onihomikoza 3–22% (Relloso et al, 2012).

Rasprostranjenost pojedinih vrsta dermatofita, nedermatofitnih plesni ili kvasnica u nekoj oblasti zavisi od klime, geografskog regiona kao i od migracija stanovništva (Effendy et al, 2005).

U najvećoj epidemiološkoj studiji iz ove oblasti, projektu „Ahil“ koji je obuhvatio oko 90.000 ispitanika iz 20 zemalja Evrope, onihomikoza je laboratorijskim metodama potvrđena kod 29,6% ispitanika (Pierard, 2001). U velikoj severno-američkoj studiji, koja je obuhvatala 15.000 ispitanika, prevalencija onihomikoza je bila 6,5% (Gupta et al, 2000). U južno-američkoj studiji, koja je obuhvatala preko 12.000 ispitanika, onihomikoza je laboratorijskim testovima potvrđena kod čak 48% ispitanika (Arenas et al, 2010).

Udeo onihomikoza u svim onihopatijama iznosi 20-50%, a od svih površnih gljivičnih infekcija kože i njenih adneksa onihomikoza je najčešća klinička manifestacija (Relloso et al, 2012).

Kada je u pitanju Srbija, ne postoje podaci o učestalosti onihomikoza niti o najčešćim uzročnicima ovog oboljenja kod naših pacijenata.

1.3. Etiologija onihomikoza

Onihomikozu izazivaju gljive različite po morfološkim, biološkim, kulturnim osobinama, različitom patogenom potencijalu, kao i kliničkim prezentacijama i terapijskom pristupu.

1.3.1. Dermatofiti

Najčešći izazivači onihomikoza su striktno patogene plesni iz grupe dermatofita. Dermatofiti predstavljaju grupu od oko 40 taksonomski povezanih vrsta gljiva raspoređenih u 3 roda: *Trichophyton* spp., *Epidermophyton* sp. i *Microsporum* spp. Ove gljive su keratinofilne i keratinolitičke i izazivaju infekciju struktura bogatih keratinom kao što su koža, dlaka i nokti. U zavisnosti od svog prirodnog staništa dermatofiti mogu biti antropofilni, geofilni i zoofilni (Tabela 1).

Tabela 1. Prikaz najčešćih vrsta dermatofita u zavisnosti od rezervoara infekcije.

Antropofilne vrste	Zoofilne vrste	Geofilne vrste
<i>Trichophyton</i> spp.	<i>Trichophyton</i> spp.	<i>Trichophyton</i> spp.
<i>T. rubrum</i>	<i>T. equinum</i>	<i>T. terrestre</i>
<i>T. interdigitale</i>	<i>T. verrucosum</i>	<i>T. ajelloi</i>
<i>T. tonsurans</i>	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>T. gloriae</i>
<i>T. violaceum</i>	<i>T. simii</i>	<i>T. vanbreuseghemii</i>
<i>T. schoenleinii</i>	<i>T. erinacei</i>	<i>T. eboreum</i>
<i>T. concentricum</i>	<i>T. anamorph</i>	<i>T. flavescens</i>
<i>Microsporum</i> spp.	<i>Microsporum</i> spp.	<i>T. thuringiense</i>
<i>M. ferrugineum</i>	<i>M. canis</i>	<i>Microsporum</i> spp.
<i>M. audouinii</i>	<i>M. amazonicum</i>	<i>M. nanum</i>
<i>Epidermophyton</i> sp.		<i>M. gypseum</i>
<i>E. floccosum</i>		<i>M. praecox</i>
		<i>M. persicolor</i>
		<i>M. duboisii</i>
		<i>M. flavum</i>
		<i>M. cookei</i>

Geofilni dermatofiti žive u zemljištu i mogu povremeno izazvati infekcije ljudi i životinja. Zoofilni dermatofiti parazitiraju na koži i dlaci životinja, ali se mogu preneti i na ljude. Antropofilni dermatofiti inficiraju ljude i mogu se preneti sa inficirane osobe direktnim i indirektnim kontaktom. Antropofilne vrste dermatofita uglavnom izazivaju hronične, relativno neinflamatorne infekcije koje se po pravilu teško leče. S druge strane, geofilne i

zoofilne vrste izazivaju jaku reakciju domaćina, lezije su veoma inflamatorne i dobro reaguju na terapiju. Prema tome, identifikacija dermatofita do nivoa vrste je od prognostičkog značaja, a takođe, omogućava i primenu adekvatnih mera prevencije.

Dermatofiti izazivaju oko 90% infekcija noktiju na nogama i 50% na rukama. Iz grupe dermatofita, onihomikozu najčešće izazivaju *Trichophyton rubrum* (preko 90% onihomikoza noktiju na nogama), *Trichophyton interdigitale* i *Epidermophyton floccosum* (Singal et Khanna, 2011).

1.3.1.1. Taksonomija dermatofita

Gljivična priroda dermatofitoza po prvi put je prepoznata 1843. godine kada Gruby opisuje *Microsporum audouinii* ako uzročnika *tinea capitis* (Gruby, 1843). Dve godine kasnije Malmsten opisuje *Trichophyton rubrum* kao uzročnika gljivičnih infekcija kože i dlake (Malmsten, 1845). U narednih sedamdeset godina opisuju se najveći broj vrsta dermatofita, koji se i danas smatraju vodećim uzročnicima dermatofitoza. Međutim, nijedna od opisanih vrsta tada nije bila kultivisana već se identifikacija zasnivala na kliničkim karakteristikama oboljenja i izgledu gljiva u mikroskopskim preparatima (Grasser et al, 2000).

Značajan napredak u dijagnozi oboljenja izazvanih dermatofitima dao je Sabouraud 1910. godine koji je prvi uveo kultivisanje uzraka na veštačkim hranilištima, ističući značaj opisivanja kulturelnih karakteristika i morfologije gljivičnih izazivača u dijagnozi dermatofitoza (Sabouraud, 1910). Međutim, kasnije je uočeno da ove biološke karakteristike često nisu stabilne i da je sam Sabouraud stvorio više od 10 sinonima za vrstu *T. tonsurans* (Kwon-Chung et Bennett, 1992). Značajan uticaj na morfotaksonomiju dermatofita u 20. veku imala su istraživanja Emmonsa koji ističe da se klasifikacija mora zasnivati na opisu vegetativnih struktura i konidija (Emmons, 1934). Takođe, on započinje sa uvođenjem striktnih pravila u klasifikaciji gljiva iz grupe dermatofita, smanjuje broj vrsta na 19 i navodi 35 sinonima koji su tada bili u opticaju, iako se za neke kasnije ustanovilo da zapravo i predstavljaju zasebne vrste (Grasser et al, 2008).

Daljem napretku u taksonomiji dermatofita doprinelo je uvođenje nutritivnih fizioloških testova i testova tolerancije kao metoda nezavisnih od morfologije (Elewski et al, 2002). Uvođenje ovih metoda nije primarno imalo za cilj razlikovanje novih vrsta, već su

imale za cilj da pomognu u prepoznavanju postojećih vrsta. Ove metode su se zasnivale na upotrebi različitih veštačkih hranljivih podloga u cilju detekcije zahteva za vitaminima, *in vitro* testu perforacije dlake, rastu na pirinčanom agaru i detekciji prisustva ili odsustva ureaze. Kasnije su uvedeni i dodatni testovi kao što su rast na bromkrezol-ljubibičasto (*Bromcresol purple* – BCP) kazein agaru i kazamino acid-eritritol-albumin agaru kao i test tolerancije na NaCl (Kane et al, 1997).

Međutim, zbog čestih nepodudarnosti u postojećim taksonomskim kategorijama, ovakav poprilično komplikovan dijagnostički sistem ipak nije dao zadovoljavajuće rezultate već je dalje uvodio nove pojmove koji su označavani kao varijeteti ili subvarijeteti (Smith et al, 1968).

Novi pristup u taksonomiji dermatofita dalo je uvođenje bioloških kompleksa vrsta (biological species complex) koji definišu vrste kao grupe blisko povezanih populacija. U okviru ovog pristupa definisani su i *T. rubrum* kompleks i *T. mentagrophytes* kompleks. Osnov za ovaj koncept dalo je ponovo otkrivanje telemorfni formi pojedinih geofilnih i zoofilnih dermatofita koji pokazuju seksualni način razmnožavanja u okviru roda *Arthroderma* ili *Nannizzia* (Dawson et Gentles, 1961; Stockdale, 1968). Danas se *Nannizzia* smatra sinonimom sa *Arthroderma* (Grasser et al, 2008). Promene u patogenezi dermatofitoza, usled izostanka redovnog kontakta gljiva sa vlažnim zemljištem, najverovatnije su odgovorne za nepostojanje seksualnog razmnožavanja (telemorfni oblik) dovodeći do potpuno aseksualne evolucije (anamorfni oblik) pojedinih vrsta dermatofita (Grasser et al, 2008). Kao posledica toga specijacija dermatofita, posebno antropofilnih, nije potpuna što otežava njihovu adekvatnu identifikaciju (Tabela 2).

Poslednjih godina došlo je do značajnog napretka u taksonomiji dermatofita kao posledica karakterizacije genoma dermatofita (Tabela 2) (Grasser et al, 2006; Grasser et al, 2008). Zlatni standard u identifikaciji vrsta dermatofita danas se zasniva na sekvencama ITS (internal transcribed spacer) ribozomalne RNK koje su javno dostupne u „on-line“ genskim bazama podataka, kao što je Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS) koji postavlja internacionalne standarde u ovoj oblasti (Slika 2) (<http://www.cbs.knaw.nl/>). S druge strane, u ovoj bazi je postavljena i platforma za interpretaciju pleomorfne nomenklature i pseudonima što je od izuzetnog značaja za pravilno označavanje *T. rubrum* kompleksa, odnosno za *T. mentagrophytes* kompleksa (Grasser et al, 2000).

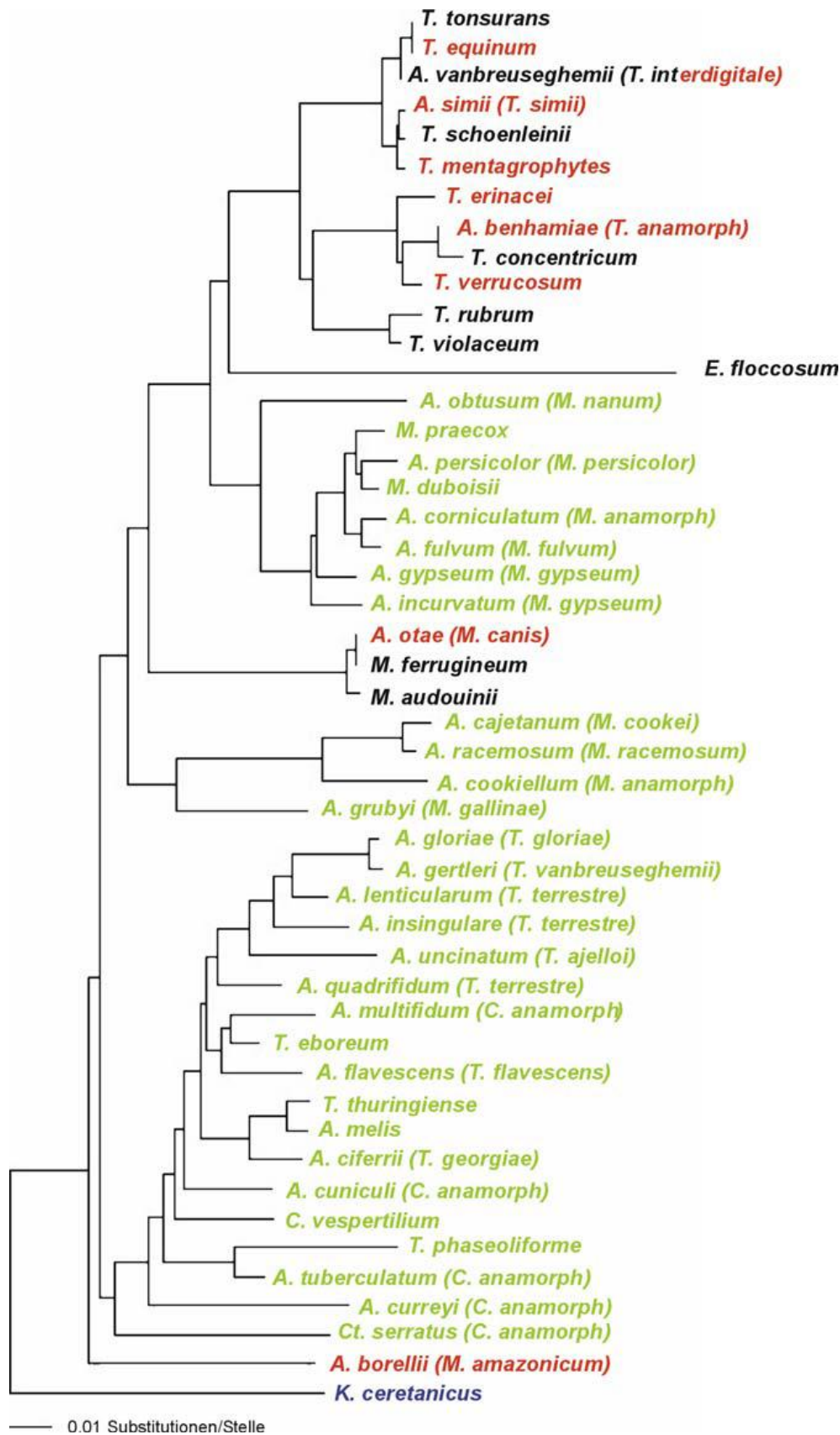
Tabela 2. Savremena taksonomija dermatofita na osnovu morfoloških, ekoloških i genotipskih osobina.

Savremena taksonomija Anamorfni oblik / Telemorfni oblik	Sinonimi – stari nazivi
<i>T. rubrum</i>	<i>T. circonvolutum</i> <i>T. fischeri</i> <i>T. fluviumuniense</i> <i>T. kanei</i> <i>T. kuryangei</i> <i>T. megninii</i> <i>T. pedis</i> <i>T. pervesii</i> <i>T. raubitscheckii</i> <i>T. rodhainii</i> <i>T. rubrum</i> var. <i>nigricans</i>
<i>T. interdigitale</i> / <i>A. vanbreuseghemii</i>	<i>T. batonrougei</i> <i>T. candelabrum</i> <i>T. krajdenii</i> <i>T. mentagrophytes</i> var. <i>interdigitale</i> <i>T. mentagrophytes</i> var. <i>nodular</i> <i>T. mentagrophytes</i> var. <i>goetzii</i> <i>T. rotundum</i> <i>T. verrucosum</i> var. <i>autotrophicum</i>
<i>T. mentagrophytes</i>	<i>T. depressum</i> <i>T. langeronii</i> <i>T. mentagrophytes</i> var. <i>quinckeanum</i> <i>T. papillosum</i> <i>T. sarkisovii</i>
<i>T. tonsurans</i>	<i>T. aerolatum</i> <i>T. equinum</i> var. <i>autotrophicum</i> <i>T. equinum</i> var. <i>equinum</i> <i>T. floriforme</i> <i>T. spadiceum</i>

	<i>T. tonsurans</i> var. <i>crateriforme</i>
	<i>T. tonsurans</i> var. <i>epilans</i>
	<i>T. tonsurans</i> var. <i>sulfureum</i>
<i>T. verrucosum</i>	<i>T. verrucosum</i> var. <i>album</i>
	<i>T. verrucosum</i> var. <i>discoides</i>
	<i>T. verrucosum</i> var. <i>ochraceum</i>
	<i>T. verrucosum</i> var. <i>verrucosum</i>
<i>T. violaceum</i>	<i>T. glabrum</i>
	<i>T. gourvilii</i>
	<i>T. soudanense</i>
	<i>T. violaceum</i> var. <i>indicum</i>
	<i>T. yaoundei</i>
<i>T. balcaneum</i>	<i>T. abissinicum</i>
	<i>T. immergens</i>
	<i>T. radicosum</i>
<i>T. simii</i> / <i>A. simii</i>	Identično
<i>T. schoenleinii</i>	Identično
<i>T. concentricum</i>	Identično
<i>E. floccosum</i>	Identično

Poslednjih godina započeta je inicijativa “jedna gljiva = jedno ime”, sa ciljem da se jedno ime dodeli za jedinstvenu ITS sekvencu bez obzira na seksualnu fazu rasta gljive i morfološke karakteristike, kako bi se unapredila i olakšala taksonomija dermatofita (Taylor, 2011).

Danas u većini rutinskih laboratorija u svetu konvencionalna laboratorijska identifikacija dermatofita još uvek se zasniva primarno na ispitivanju makroskopskih i mikroskopskih karakteristika izolata, po potrebi uz dodatak fizioloških testova za atipične izolate (Grasser et al, 2008).



Slika 2. Filogenetska povezanost dermatofita na osnovu ITS sekvenci. Keratinomyces ceretanicus je upotrebljen kao vrsta izvan grupe dermatofita. Crnom bojom su označene antropofilne vrste, crvenom bojom zoofilne, a zelenom geofilne vrste. (Grasser et al, 2008).

1.3.1.1.1. *Trichophyton rubrum* kompleks

Trichophyton rubrum kompleks se smatra najstarijom linijom iz grupe filamentoznih gljiva koji ima potpuno aseksualni način razmnožavanja. Kao posledica toga, s obzirom da ne poseduje druge procese osim prirodne selekcije za stabilizaciju i uniformisanje fenotipa, evoluirao je u veoma raznovrsno mnoštvo fenotipova, od kojih su neki klinički različiti, a drugi morfološki aberantni, što predstavlja veliki problem za identifikaciju. Smatra se da su svi fenotipovi nastali iz iste linije (Grasser et al, 2008).

Različiti pripadnici *T. rubrum* kompleksa se razlikuju među sobom po morfološkim karakteristikama, fiziološko-biohemijskim osobinama, kao i kliničkim karakteristikama oboljenja koja izazivaju. Fenotipovi povezani sa infekcijama skalpa uključuju *T. violaceum* i deo izolata koji predstavljaju Afričku populaciju *T. rubrum* (*T. soudanense*, *T. gourvilii*, *T. raubitschekii*, pa čak i neki ureaza negativni izolati *T. rubrum*). U najvećem broju slučajeva ovi izolati potiču iz endotriks oblika *tinea capitis* i *tinea corporis* kod dece i veoma retko od odraslih osoba koji su članovi njihovih porodica. S druge strane, *T. megninii* je povezan sa ektotriks oblikom *tinea capitis*, mada u novije vreme češće se izoluje kod *tinea corporis* (Grasser et al, 2008).

Klasični *T. rubrum* izolati koji izazivaju infekcije uglavnom na donjim ekstremitetima ljudi, obuhvataju veliki broj fenotipova grupisanih u dve velike grupe: mikrosatelitna grupa A i mikrosatelitna grupa B (Ohst et al, 2004). U okviru mikrosatelitne grupa A nalaze se izolati uglavnom iz Azije i južne Afrike koji izazivaju *tinea corporis* i *tinea cruris*. Ovi izolati retko mogu izazvati infekcije skalpa, ali ne formiraju endotriks i ektotriks strukture (Kane et al, 1990).

Dermatofit koji je rasprostranjen u najvećem delu sveta je mikrosatelitna grupa B, klasični *T. rubrum* sensu stricto. On stvara tipične pamučaste kolonije sa crvenim reversom, stvara retke makrokonidije ili produkuje uglavnom mikrokonidije na Sabouraud dekstroznom agaru (SDA). Izolati iz ove grupe uglavnom su izgubili ureaznu aktivnost. U najvećem broju slučajeva izazivaju infekcije na stopalima i noktima, ređe na rukama i na noktima na rukama. Veoma retko mogu izazvati i infekcije na neobrasloj koži kao i infekcije skalpa, ali ne formiraju endotriks i ektotriks oblike (Grasser et al, 2008).

1.3.1.1.2. *Trichophyton mentagrophytes* kompleks

U okviru ovog kompleksa nalaze se zoofilni i antropofilni izolati. Zoofilni izolati uglavnom potiču od glodara, zečeva, zamoraca ili sekundarno inficiranih domaćih životinja (goveda, psi itd.). Ovi izolati stvaraju mikrokonidije grupisane u formacije nalik na grozdove (*en grappe* ili *grappe-like* konidijacija) kao i karakteristične spiralno izuvijane hife. Ureaza su pozitivne (osim izolata kao što je *T. erinacei* ss. str. koji primarno izazivaju infekciju kod ježeva u Evropi), perforiraju dlaku *in vitro* i vrše brzu alkalizaciju BCP kazein agara.

Antropofilni izolati stvaraju kolonije nalik na somot (morfološki slične prethodno opisanim zoofilnim izolatima) i pamučaste kolonije koje proizvode male, laterlano postavljene mikrokonidije sa veoma malo ili bez spiralnih formacija. Po važećoj nomenklaturi antropofilni izolati iz ovog kompleksa označavaju se kao *Trichophyton interdigitale* ss. str. (Grasser et al, 2008).

1.3.2. Kvasnice

Kvasnice predstavljaju jednoćelijske gljive koje se dele pupljenjem ili fisijom kada se od progenitorske „majke“ ćelije odvaja identičan izdanak „ćerka“ ćelija. Novonastala ćelija može zadržati prvobitan ovalan oblik ili se izdužiti u tubularne strukture koje se nazivaju pseudohife, koje su jedan od najznačajnijih faktora virulencije kvasnica u izazivanju gljivičnih infekcija noktiju (Grover and Khurana, 2012; Murray et al, 2013).

Kvasnice češće izazivaju onihomikozu na noktima na rukama, nego noktiju na nogama gde su retki izolati. Od kvasnica najčešće se identifikuje *Candida albicans* koja se izoluje u oko 70% slučajeva svih onihomikoza izazvanih kvasnicama, dok su od ostalih vrsta najčešći izolati *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* i *C. krusei* (Singal et Khanna, 2011). Kvasnice uglavnom izazivaju onihomikozu na već prethodno oštećenim noktima, kao što je slučaj sa hroničnom paronihijom, ili kod imunosuprimiranih osoba (npr. hronična mukokutana kandidijaza) (Grover and Khurana, 2012). Onihomikoza izazvana kvasnicama češće se javlja kod domaćica, zemljoradnika i ribara usled hronične izloženosti vlazi i hemikalijama uključujući i deterdžente kao i usled kompromitovane lokalne imunosti usled trauma (Singal et Khanna, 2011).

Ostale gljive iz grupe kvasica znatno ređe izazivaju onihomikozu, opisani su slučajevi u kojima je izolovan *Trichosporon beigelli* (Ribeiro et al, 2015).

1.3.3. Nodermatofitne plesni

Nodermatofitne plesni su uslovno patogene gljive, koje se nalaze u ukolini čoveka i uglavnom izazivaju infekciju na prethodno oštećenim noktima, najčešće usled traume (Grover and Khurana, 2012). Da bi se plesni smatrale pravim izazivačima onihomikoze neophodno je da budu ispunjeni sledeći kriterijumi (Tosti et a, 2000):

1. Postojanje deformiteta nokta u skladu sa kliničkom dijagnozom
2. Pozitivan direktni mikroskopski preparat u kome se vide hife u keratinskom materijalu nokta
3. Kulture gljive negativne na porast dermatofita
4. Porast više od 5 kolonija identične nodermatofitne plesni u najmanje 2 uzastopna uzorka nokta od istog pacijenta

Nodermatofitne plesni izazivaju onihomikozu uglavnom na noktima na nogama i odgovorni su za oko 1,5 - 6% infekcija (Singal et Khanna, 2011). Od nodermatofitnih plesni najčešći izolati su *Scytalidium dimidiatum* i *Scytalidium hyalinum*, čiji porast u primarnom izolatu gotovo uvek bude potvrđen novim uzorkom i smatraju se pravim patogenima. Od ostalih vrsta izoluju se često i *Scopularopsis brevicaulis*, gljive rodova *Aspergillus*, *Fusarium*, *Acremonium* i mnoge druge (Singal et Khanna, 2011).

Na onihomikozu izazavanu nodermatofitnim plesnima treba posumnjati ako je pacijent imao traumu nokta, nema *tinea pedis*, a promene postoje na jednom ili dva nokta na nogama praćenih periungvalnom inflamacijom (Kaur et al, 2008).

1.4. Podela onihomikoza

Klinička klasifikacija onihomikoza je ranije predstavljala problem, s obzirom da su se koristili različiti kriterijumi, što je često dovodilo do zabune. Prvu modernu klasifikaciju onihomikoza, u zavisnosti od uzročnika infekcije kao i od mesta primarne infekcije i njenog

širenja, uradili su Roberts i saradnici (Roberts et al, 2003). Degreef je 2008 godine dopunio postojeću klasifikaciju, koja se danas i koristi, a obuhvata sledeće kliničke oblike onihomikoze (Degreef 2008):

1. Distalna i lateralna subungvalna onihomikoza (DLSO)
2. Superficialna bela onihomikoza (SBO)
3. Proksimalna subungvalna onihomikoza (PSO)
4. *Endonyx* onihomikoza
5. *Candida* onihomikoza
 - Hronična paronihija sa sekundarnom distrofijom nokta
 - Distalna infekcija nokta (*Candida* oniholiza)
 - Sekundarna *Candida* onihomikoza
 - Hronična mukokutana kandidoza (*Candida* granulom)
6. Totalna distrofična onihomikoza (TDO)

1.5. Način prenosa infekcije

Dermatofiti su široko rasprostranjeni u životnoj sredini i infekcija nastaje prenosom artrokonidija ili hifa, ili pak keratinskog materijala koji sadrži ove gljivične elemente sa inficirane osobe na osetljivog domaćina. Kao striktno patogeni agensi, dermatofitima za nastanak infekcije nije neophodna predhodna trauma nokta i/ili okolnog tkiva, te u najvećem broju slučajeva inficiraju intaktno tkivo nokta. Dermatofiti se najčešće prenose preko vlažnih podova, kao što je slučaj na bazenima, saunama, spa centrima, tuš kabinama koje koriste više ljudi, svlačionicama u sportskim objektima i slično, kao i nošenjem zajedničke obuće i odeće u porodicama, kolektivima, sportskim aktivnostima i drugo (Effendy et al, 2005). Moguć je i direktan interhumani prenos s obzirom da su najčešći izazivači antropofilni dermatofiti. Prenosanje antropofilnih vrsta (*T. rubrum*, *T. interdigitale*) kao najčešćih izazivača onihomikoza, je naročito olakšano u urbanim, gusto naseljenim sredinama u kojima se ljudi bave brojnim socijalnim aktivnostima (npr. upražnjavanje sportskih aktivnosti, putovanja).

U većini slučajeva onihomikoza, infekcija je prisutna na noktima na nogama. Nokti na nogama su u proseku 25 puta češće inficirani nego nokti na rukama. Na ovo verovatno utiče i

činjenica da nokti na nogama u proseku za 50-60% rastu sporije od noktiju na rukama, što omogućava gljivama da usled duže izloženosti lakše dovedu do nastanka oboljenja.

Palac na nozi je najčešće mesto infekcije, verovatno zato što trpi najveći pritisak i traumu usled nošenja obuće (Kaur et al, 2008). Daleko najčešće, u 75-86% slučajeva su prvo zahvaćeni palčevi i osobe sa ovim oboljenjem mogu autoinfekcijom preneti gljivične izazivače na ostale nokte na stopalima, kao i na nokte na rukama (Papini et al, 2013; Perea et al, 2000; Romano et al, 2005). U Španiji nokti na nogama su 4 puta, dok u Kanadi čak 19 puta češće bili zahvaćeni od noktiju na rukama (Gupta et al, 2000).

Znatno ređe, infekcija može nastati preko kontakta sa životinjama i zemljom kod zoofilnih i geofilnih vrsta (npr. *T. verrucosum*). Dermatofiti mogu dugo ostati vijabilni u deskvaminiranim ćelijama kože, kosi i noktima. U spoljašnjoj sredini mogu ostati vijabilni i preko šest meseci, što znatno doprinosi rasprostranjenosti ovog oboljenja (Wang et al, 2006).

Infekcija nedermatofitnim plesnima najčešće nastaje sekundarno na već izmenjenim noktima (npr. trauma nokta kod starije populacije). Kvasnice kao izazivači onihomikoze takođe se mogu preneti direktnim i indirektnim putem. *Candida* spp. kao najčešći izazivači iz ove grupe, dospevaju do noktiju kod najvećeg broja pacijenata autoinfekcijom sa bukalne sluznice, a kod žena i sa vaginalne sluznice, gde predstavljaju deo fiziološke mikroflore (Singal et Khanna, 2011).

1.6. Patogeneza

U patogenezi dermatofitoza odnos gljiva-domaćin je veoma specifičan jer ove gljive izazivaju oboljenja kod imunokompetentnih osoba, a pri tome napadaju samo površne keratinske strukture. Prema tome klinička ekspresija dermatofitoza direktno zavisi kako od karakteristika gljiva izazivača tako i od osobina domaćina. Geofilne i zoofilne vrste dermatofita uglavnom izazivaju akutne infekcije koje karakteriše brza eliminacija uzročnika primenom adekvatne terapije udružene sa efikasnim mehanizmima urođene i stečene imunosti. Antropofilne vrste po pravilu izazivaju hronične infekcije koje karakteriše veoma malo ili čak potpuno odsustvo simptoma, dužeg, a u nekim slučajevima i neizvesnog terapijskog ishoda, kao i manje efikasnim imunskim odgovorom (Vermout et al, 2008).

Smatra se da je za nastanak infekcije i promena koje pri tome nastaju, od značaja veći broj faktora virulencije ovih gljiva.

1.6.1. Adherencija i adhezini

Studije na eksperimentalnim modelima pokazale su vremenski zavisani porast broja adherirajućih spora, praćenih germinacijom i invazijom *stratum corneum* hifama koje rastu u različitim pravcima. Prva istraživanja su pokazala da se maksimum adherencije artrokonidija gljiva roda *Trichophyton* za keratinocite dešava za oko 3-4 časa. Sposobnost *T. rubrum* da adherira za manozu i galaktozu keratinocita pripisuje se adhezivima specifičnim za ugljenohidrate (engl. carbohydrate-specific adhesions - CSA) koji se ekspimiraju na površini mikrokonidija (Esquenazi et al, 2004). Monod i sar. su utvrdili da postoji jedinstvena dipeptidil-peptidaza IV (DppIV) identifikovana kod *Trichophyton rubrum* koja igra značajnu ulogu u adherenciji ove gljive za keratinocite (Monod et al, 2005).

U toku adherencije kod *T. mentagrophytes* uočeno je prisustvo fibrilarnih struktura na površini gljivične ćelije koje povezuju gljivične artrokonidije za keratinocite na površini kože i noktiju. U dubljim slojevima kože i noktiju novoformirane artrokonidije stvaraju tanke i kratke izdanke koji pokrivaju čitavu površinu artrokonidija i omogućavaju stvaranje velike kontaktne površine između konidija i kože, odnosno noktiju (Kaufman et al, 2007).

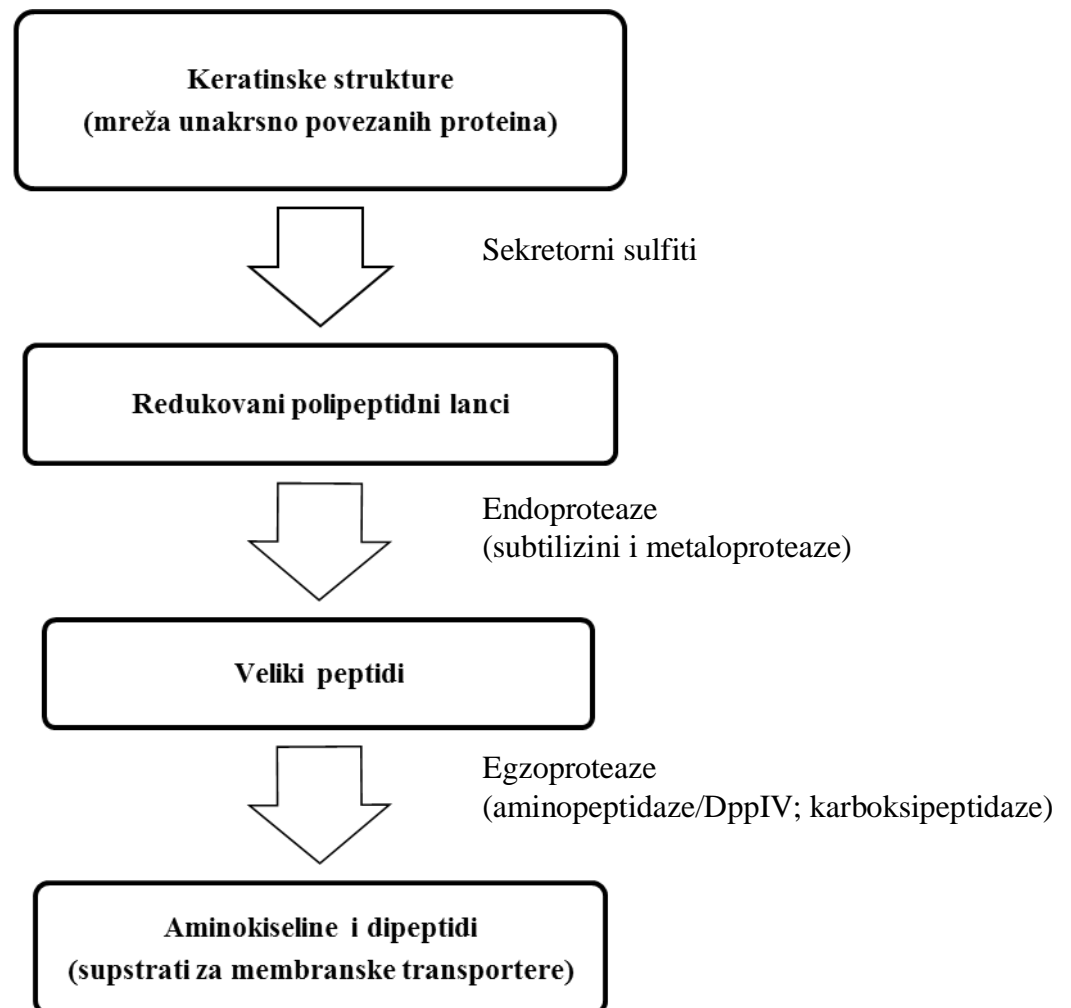
Kod *Microsporum canis* ispituje se uticaj sekretornih subtilina, metaloproteaza i dipeptidil-peptidaza na proces adherencije i ranu fazu invazije (Monod et al, 2005).

Polazeći od činjenice da sekretorne aspartat proteaze igraju ključnu ulogu u adherenciji *Candida albicans* za epitelne ćelije, smatra se da i dermatofitne sekretorne proteaze mogu olakšati ili čak biti ključne za efikasnu adherenciju (De Bernardis et al, 2007).

1.6.2. Rast na keratinskim strukturama i razgradnja proteina

Tkiva bogata keratinom kao što su epidermis, nokti i dlaka sadrže pored keratina i mrežu izgrađenu od različitih ukršteno povezanih proteina kao što su involukrin, lorikrin i mali proteini bogati prolinom koji izgrađuju rožnati omotač ćelije (Kalini et al, 2000). Proteini rožnatog sloja, naročito lorikrin i proteini bogati prolinom, sadrže brojne cisteinske ostatke koji formiraju disulfidne mostove. Ovo dovodi do stvaranja nerastvorljivog

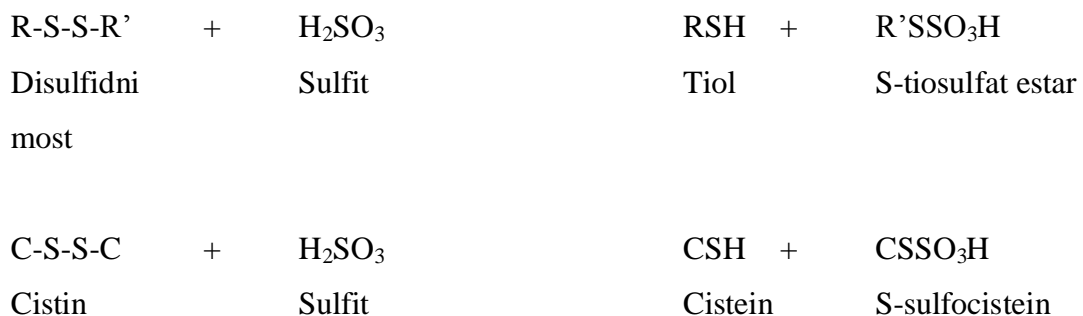
proteinskog kompleksa izgrađenog od mreže unakrsno povezanih proteina. Za efikasnu razgradnju proteina u keratinskim strukturama (Slika 3) neophodno je da prvo dođe do redukcije cistinskih disulfidnih mostova kako bi dalje sekretorne proteaze mogle da razgrade kompaktne keratinske strukture (Monod, 2008).



Slika 3. Shematski prikaz koraka u razgradnji keratinskih struktura od strane dermatofita. (Preuzeto i modifikovano iz Monod, 2008).

1.6.2.1. Redukcija cistinskih disulfidnih mostova

Tokom infekcije, dermatofiti i filamentozne gljive, ekskretuju sulfite koji imaju redukcionu ulogu (Kunert, 1972). U prisustvu sulfita dolazi do raskidanja disulfidnih veza u keratinskim strukturama i stvara se cistein i S-sulfocistein (Slika 4). Sulfitoliza predstavlja esencijalni korak u razgradnji kompleksnih keratinskih struktura. Na ovaj način redukovani proteini postaju dostupni za dalju razgradnju uz pomoć proteolitičkih enzima (Monod, 2008).



Slika 4. Redukcija disulfidnih mostova sulfitom.

R' – označava bilo koju hemijsku grupu u kojoj je ugljenikov ili vodonikov atom vezan za ostatak molekula. (Preuzeto i modifikovano iz Monod, 2008).

1.6.2.2. Sekretorne proteaze dermatofita

Dermatofiti stvaraju brojne proteaze čiji je cilj razgradnja keratina do oligopeptida i aminokiselina koje se mogu dalje apsorbovati. Sekretorne proteaze dermatofita su značajni faktori virulencije ovih gljiva i mogu se podeliti na endoproteaze i egzoproteaze (Monod, 2008).

1.6.2.2.1. Sekretorne endoproteaze dermatofita

Dermatofiti sekretuju 2 grupe endoproteaza: subtilizine (serin proteaze) i fungalizine (metaloproteaze). Endoproteaze raskidaju peptidne veze unutar polipeptida. Dermatofiti poseduju genom koji kodira bateriju sekretornih proteaza slično kao kod gljiva roda

Aspergillus. Kod *T. rubrum* detektovano je 5 MEP (geni za endometaloproteaze) i 3 SUB (geni za serin proteaze) gena. Dermatofitni subtilizini su u proseku molekulske mase 30-37 kDa i nisu glikozilirani. Dermatofitni fungalizini su glikoproteini molekulske mase 40-48 kDa koji pokazuju optimum aktivnosti na pH 7-8 (Monod, 2008).

1.6.2.2. Sekretorne egzoproteaze dermatofita

Egzopeptidaze raskidaju peptidne veze samo na N- i C-terminalnom kraju peptidnih lanaca. *T. rubrum* sekretuje dve leucin aminopeptidaze, Lap1 and Lap2, kao i dve dipeptidil-peptidaze, DppIV i DppV. Zbog pokazanog afiniteta ka 7-amido-4-metilkumarinu (Leu-AMC) kao supstratu Lap 1 i Lap 2 se nazivaju leucin aminopeptidazama. Dipeptidil peptidaze su glikoproteini i pripadaju serin proteazama.

Dermatofiti takođe sekretuju i metalokarboksipeptidazu (McpA) koja je homologa humanoj pankreasnoj karboksipeptidazi A. Takođe, kod *T. rubrum* detektovana je i sekrecija dve serin karboksipeptidaze ScpA i ScpB (Monod, 2008).

1.7. Klinička slika

1.7.1. Distalna i lateralna subungvalna onihomikoza (DLSO)

DLSO predstavlja najčešći klinički oblik onihomikoze. Ulazno mesto gljiva predstavlja distalni i lateralni subungvalni žleb nokta. Infekcija zahvata hiponihijum i širi se proksimalno, nasuprot pravca rasta nokta, duž ležišta nokta. Ovo dovodi do zadebljanja hiponihijuma usled čega dolazi do podizanje slobodne ivice nokta. U početnim fazama nokatna ploča nije zahvćena infekcijom.

Klinčki znaci su oniholiza i subungvalna hiperkeratoza koja zapravo predstavlja rezervoar gljivičnih elemenata. Javlja se promena boje nokta koja je u opsegu od bele do braon. Kod uznapredovale infekcije nokat postaje trošan i lako lomljiv što je rezultat invazije nokatne ploče i keratinolitičke aktivnosti gljiva (Slika 5).



Slika 5. Distalna i lateralna subungvalna onihomikoza (Oakley, 2009).

Ovaj oblik onihomikoze uglavnom se javlja na noktima na nogama, često udružen sa gljivičnom infekcijom stopala (*tinea pedis*). Na noktima na rukama se takođe javlja, ali uglavnom kod osoba koje već imaju infekciju noktiju na nogama (autoinfekcija) i praćena je manjim zadebljanjem nokta.

Dermatofiti su najčešći uzročnici DLSO, znatno ređe nedermatofitne gljive ili kvasnice. Od dermatofita najčešće se izoluje *T. rubrum*, zatim *T. interdigitale*, eventualno *T. tonsurans* ili *E. floccosum*.

1.7.2. Superficijalna bela onihomikoza (SBO)

SBO se javlja znatno ređe i kod ovog oblika nokatna ploča predstavlja primarno mesto infekcije. Kod SBO gljive direktno napadaju površne slojeve nokatne ploče stvarajući dobro ograničena bela polja (Slika 6). Sa napredovanjem oboljenja može doći do spajanja ovih polja, a nokat postaje hrapav, mekan i lako se kruni.

Kod dece, nokat može postati homogeno beo, neproziran i savitljiv. SBO izazvan gljivama roda *Candida* uglavnom se javlja kod prevremeno rođene dece, ako su majke imale vaginalnu kandidijazu, zahvatajući i nokte na nogama i na rukama (Jayayatilake et al, 2009). Kod odraslih SBO uglavno zahvata samo jedan nokat na nozi.



Slika 6. Superficialna bela onihomikoza (Oakley, 2009).

T. interdigitale je odgovoran za više od 90% slučajeva SBO, rede i *T. rubrum*. Ponekad se mogu izolovati i neki od nedermatofita, kao što su *Acremonium* spp, *Aspergillus terreus* i *Fusarium oxysporum*.

1.7.3. Proksimalna subungvalna onihomikoza (PSO)

PSO se javlja veoma retko. Kod ovog oblika gljive dospevaju do nokta preko proksimalnog noktnog žleba i kutikule i napadaju tek formirani proksimalni deo noktne ploče. Gljive zatim mogu migrirati distalno dovodeći do subungvalne hiperkeratoze, proksimalne oniholize i destrukcije proksimalnog dela nokatne ploče. S obzirom da je dominantno zahvaćen matriks nokta, površina noktne ploče je neizmenjena. Javlja se belo žuta prebojenost proksimalnog dela noktne ploče (*leukonychia*) dok je distalni deo nokta normalne boje (Slika 7). Može se javiti i izražena i bolna periungvalna inflamacija praćena gnojnim zapaljenjem što se može pogrešno protumačiti kao bakterijska infekcija.

Ovaj oblik onihomikoze može se javiti i na noktima na rukama kao i na nogama. Osobe sa kompromitovanom perifernom cirkulacijom i šećernom bolesti češće imaju ovaj oblik onihomikoze. Rapidno progresivna forma PSO često je povezana sa stanjima imunodeficijencije. Primećen je porast incidencije rapidno progresivne forme kod osoba sa

sindromom stečene imunodeficijencije (engl. acquired immune deficiency syndrome - AIDS).



Slika 7. Proksimalna subungvalna onihomikoza (Oakley, 2009).

Najčešći izazivač je *T. rubrum*, zatim *T. interdigitale*. Opisani su i sporadični slučajevi izazvani *T. megnini*, *T. schoenleinii* i *E. floccosum* (Baran et al, 2006) .

1.7.4. Endonyx onihomikoza

Tosti i saradnici su 1999. godine opisali ovaj oblik kao zaseban klinički tip onihomikoze (Tosti et al, 1999). Kod ovog retkog oblika onihomikoze infekcija započinje od nokatne pulpe kao i kod DLSO, ali ne zahvata ležište nokta već gljive vrše invaziju distalnog dela nokatne ploče. Prema tome, kod ovog oblika primećuje se veliko prisustvo gljivičnih hifa u samoj nokatnoj ploči i potpuno odsustvo gljivičnih elemenata u ležištu nokta.

Klinički se uočava difuzna mlečno-bela prebojenost nokatne ploče uz odsustvo subungvalne hiperkeratoze i oniholize. Nokatna ploča je normalnih karakteristika i nema zadebljanja (Slika 8).

Najčešći izazivač ovog oblika onihomikoze je *T. soudanense*, a opisano je i par slučajeva izazvanih sa *T. violaceum*.



Slika 8. *Endonyx* onihomikoza (Piraccini et Alessandrini, 2015).

1.7.5. *Candida* onihomikoza

Ovaj termin se koristi da označi onihomikozu izazvanu i drugim gljivama iz grupe kvasnica, mada su svakako gljive roda *Candida* najčešće. U preko 70% slučajeva izazivač je *C. albicans*, ređe *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* i *C. krusei*. Infekcija se može javiti i na noktima na nogama, mada je lokalizacija na rukama znatno češća i čini oko 50% svih onihomikoza na noktima na rukama (Slika 9). Gljive direktno napadaju nokat dovodeći do sledećih kliničkih manifestacija:



Slika 9. *Candida* onihomikoza (Dermis, 2016).

1.7.5.1. Hronična paronihija sa sekundarnom distrofijom nokta

Hronična paronihija se uglavnom javlja sekundarno na noktima na rukama kod osoba koje rade u vlažnim uslovima (ribari, barmeni i sl.), kao i kod domaćica zbog česte upotrebe sapuna i deterdženata. Ovo je najčešći oblik *Candida* onihomikoze. Karakteriše se bolnim otokom i eritemom proksimalnog i lateralnih žlebova nokta, koji nastaju usled hroničnog izlaganja noktiju na rukama vodi, usled čega se kutikula odvaja od nokatne ploče i smanjuje se njena zaštitna uloga. Opisani su i slučajevi gde je *Candida* onihomikoza bila udružena sa alergijskim reakcijama na određene vrste hrane za koje se veruje da su bili važni faktori rizika za nastanak infekcije. Na ovaj način omogućen je prodor kvasnica u prostor ispod kutikule što dalje dovodi do otoka i odvajanja kutikule. Kada infekcija dospe do matriksa nokta nastaje proksimalna distrofija nokta i javljaju se poprečne brazde na nokatnoj ploči (*Baeu-ove* linije). Nokat postaje konveksan, nepravilan, hrapav, bez subungvalne hiperkeratoze (Roberts et al, 2003, Degreef, 2008).

1.7.5.2. Distalna infekcija nokta (*Candida* oniholiza)

Ovo je redak oblik *Candida* onihomikoze i javlja se gotovo isključivo kod pacijenata sa *Raynaud* fenomenom ili nekim drugim oblikom vaskularne insuficijencije. Još uvek nije razjašnjeno da li sam vaskularni problem dovodi do oniholize ili ona nastaje usled infekcije kvasnicama. Kod ovog oblika distalna subungvalna hiperkeratoza, u vidu žuto-sive mase, podiže nokatnu ploču i odvaja je od ležišta nokta dovodeći do oniholize. Klinički promene na noktima jako liče na DLSO i teško ih je razlikovati. Za razliku od DLSO, promene su prisutne samo na noktima na rukama i postoji manji stepen subungvalne hiperkeratoze (Roberts et al, 2003, Degreef, 2008).

1.7.5.3. Hronična mukokutana kandidoza (*Candida* granulom)

Ovaj redak oblik onihomikoze je multifaktorske etiologije koji nastaje usled oslabljene ćelijski posredovane imunosti. Klinički znaci oboljenja variraju u zavisnosti od stepena imunosupresije. Kod najtežih oblika javlja se veliko zadebljanje nokta dovodeći do stvaranja *Candida* granuloma. Takođe, kod pacijenata gotovo uvek postoje i promene na sluznicama izazvane gljivama roda *Candida* (Roberts et al, 2003, Degreef, 2008).

1.7.5.4. Sekundarna *Candida* onihomikoza

Oboljenje se javlja u sklopu drugih oboljenja nokta, najčešće kod psorijaze. Gljive sekundarno napadaju prethodno izmenjen nokat usled osnovnog oboljenja (Roberts et al, 2003, Degreef, 2008).

1.7.6. Totalna distrofična onihomikoza (TDO)

TDO ne predstavlja zaseban klinički oblik onihomikoze. Bilo koji od prethodnih oblika, usled napredovanja infektivnog procesa, može dovesti do totalne distrofije nokta. Kod ovog oblika nokatna ploča je potpuno razorena, kruni se i nestaje, ostavljajući za sobom zadebljano ležište nokta ispunjeno keratinskim debrisom (Slika 10).



Slika 10. Totalna distrofična onihomikoza (laboratoriju za parazitologiju i mikologiju).

1.8. Faktori rizika za nastanak onihomikoza

Za nastanak onihomikoza od posebne važnosti su sledeći faktori:

1.8.1. Uzrast

Prevalencija onihomikoza raste sa godinama. Brojne studije su pokazale da je prevalencija onihomikoza najčešća u uzrasnoj grupi preko 60 godina starosti i procene su da iznosi oko 20-30% (Gupta et al, 2000; Faergemann et Baran, 2003; Sigurgeirsson et Steingrimsson, 2004).

Razlozi su brojni: starije osobe imaju lošiju perifernu cirkulaciju, češće imaju dijabetes i ponovljene traume nokta, teže održavaju adekvatnu higijenu noktiju, imunski sistem je slabiji, duža je izloženost gljivama, veća je površina, a sporiji rast noktiju (Tosti et al, 2005).

S obzirom, da je generalno u svetu, a i kod nas, sve više osoba starijih od 65 godina dijagnostikovanje i lečenje onihomikoze u ovoj populaciji predstavlja sve veći zdravstveni problem.

Značajna je činjenica da je onihomikoza u konstantnom porastu i kada su u pitanju deca. Pojedini autori procenjuju da je prevalencija onihomikoze, kod osoba mlađih od 18 godina, oko 30 puta manja u odnosu na odrasle i iznosi 0-2,6% (Ginter-Hanselmayer et al, 2008). Kod dece je nokatna ploča znatno manja i nokti brže rastu što otežava gljivama da uspostave infekciju (Sigurgeirsson et Steingrimsson, 2004).

1.8.2. Pol

Muškarci češće obolevaju generalno od dermatofitnih infekcija (Garg et al, 2004). Istraživanja su pokazala da progesteron deluje inhibitorno na rast dermatofita usled čega žene ređe obolevaju (Clemons et al, 1998). Takođe, muškarci se češće bave sportskim aktivnostima što dodatno povećeva rizik za nastanak oboljenja. Osim toga i trume nokta su

češće kod muškaraca. Ovo sve doprinosi češćoj pojavi onihomikoze na noktima na nogama kod muškaraca (Tchernev et al, 2013).

S druge strane, žene češće obolevaju od onihomikoze na noktima na rukama. S tim u vezi je tradicionalna uloga žena u obavljanju kućnih poslova. Ručno pranje odeće i posuđa i druge aktivnosti koje podrazumevaju češći kontakt noktiju sa vodom dovodi do slabljenja zaštitnih mehanizama i olakšava prodiranje infektivnih agenasa do nokta (Bramono et Budimulja, 2005).

1.8.3. Genetski faktori

Primećeno je da nisu sve osobe podjednako osetljive na dermatofite i da se u pojedinim porodicama oboljenje češće javlja (Faergemann et al, 2005). Zaias i saradnici su ispitivali 12 osoba i članove njihovih porodica sa DLSO izazvanom *T. rubrum*. Studija je pokazala da supružnici osoba sa onihomikozom čak i posle mnogo godina nisu dobili infekciju. S druge strane, svi inficirani potomci su imali barem jednog od roditelja sa DLSO, što je ukazalo na autozomno dominantni tip nasleđivanja (Zaias et al, 1996).

Zaitz i saradnici su analizirali zastupljenost humanog leukocitnog antigena (HLA) II klase kod brazilskih Aškenazi Jevreja sa onihomikozom i pokazali su prisustvo HLA-DR52 antigena kod svih pacijenata. S druge strane, HLA-DR53 bio je prisutan samo kod kontrola što je dovelo do zaključka da verovatno predstavlja jedan od ključnih faktora u imunskom odgovoru T ćelija na gljivične peptide. Takođe, smatra se da HLA-DR53 predstavlja protektivni faktor koji štiti njegove nosioce od hronične *T. rubrum* onihomikoze (Zaitz et al, 1996). Primećeno je da se onihomikoza kao i *tinea pedis* češće javljaju kod odraslih osoba, ali i kod dece sa *Down*-ovim sindromom, mada se tačan razlog ove pojave još uvek ne zna (Svejgaard et Nilsson, 2004).

1.8.4. Imunosupresija

Različite studije su pokazale da je prevalencija onihomikoza kod imunosuprimiranih osoba viša o odnosu na imunokompetentne osobe i kreće se oko 20-30% (Gupta et al, 2000; Criber et al, 1998). Jedan od razloga je i manji broj CD4⁺ limfocita kod ovih osoba, kao i postojanje onihomikoze u ličnoj i porodičnoj anamnezi (Gupta et al, 2000). Kod

imunosuprimiranih PSO se značajno češće javlja nego kod imunokompetentnih osoba (Gupta et al, 2000). Brojne studije su pokazale da se PSO gotovo isključivo javlja kod osoba sa nekim oblikom imunodeficijencije kao što su osobe sa AIDS-om, HIV (engl. human immunodeficiency virus) pozitivne osobe, osobe sa transplantacijom bubrega, pacijenti na imunosupresivnoj terapiji i pacijenti sa defektnom hemotaksom polimorfonukleara (Tosti et al, 2005; Faergemann et al, 2003). Kod imunosuprimiranih osoba onihomikoza, naročito izazvana nedermatofitnim plesnima kao što su gljive iz roda *Fusarium*, može biti životno ugrožavajuća s obzirom da ove gljive lošije reaguju na sistemsku antimikotičnu terapiju od dermatofita i kvasnica (Girmenia et al, 1992; Arrese et al, 1996).

1.8.5. Šećerna bolest

Procene su da se onihomikoza javlja kod najmanje 1/3 osoba sa dijabetesom. Ovo oboljenje dovodi do brojnih komplikacija koje utiču na funkciju različitih organskih sistema, a za nastanak onihomikoze značajan je uticaj na mikrocirkulaciju naročito na donjim ekstremitetima (Faergemann et al, 2003). Rezultati multicentrične studije sprovedene u Kanadi i Sjedinjenim Američkim Državama pokazali su da osobe sa dijabetesom imaju 2,77 puta veću verovatnoću da dobiju onihomikozu od osoba bez ovog oboljenja (Gupta et al, 1998). Kod osoba sa dugogodišnjim dijabetesom tip II infekcija sa noktiju može da progredira u dublja tkiva dovodeći do kutanih i subkutanih infekcija (Gong et al, 2007).

1.8.6. Psorijaza

Onihomikoza se češće javlja kod osoba sa psorijazom nego kod osoba bez ovog oboljenja. Procene su da se prevalencija onihomikoze kod pacijenata sa ovim oboljenjem kreće od 13-22% (Tosti et al, 2005; Larsen et al, 2003). Postojanje psorijaze kod pacijenta povećava rizik za nastanak onihomikoze više od dva puta (Sigurgeirsson et Steingrimsson, 2004). Pored navedenog, jedan od problema u diferencijalnoj dijagnozi psorijaze noktiju i onihomikoze je često slična klinička prezentacija ova dva oboljenja (Larsen et al, 2003).

1.8.7. Kompromitovana periferna cirkulacija

Oboljenje perifernih arterija predstavlja nezivisni prediktor onihomikoze i kod pacijenata sa ovim oboljenjem onihomikoza se javlja kod 22,4% obolelih (Gupta et al, 2000). Kod pacijenata sa oboljenjem perifernih arterija češće se javlja SBO nego kod pacijenata bez ovog oboljenja (Gupta et al, 2000).

Takođe, kod osoba koje imaju hroničnu vensku insuficijenciju pokazano je da je onihomikoza češće prisutna nego u opštoj populaciji i da se javlja kod 36,1% pacijenata (Saez de Ocariz et al, 2001).

1.8.8. Upražnjavanje sportskih aktivnosti

Upražnjavanje sportskih aktivnosti povećava verovatnoću nastanka onihomikoze (Caputo et al, 2001). Kod osoba koje se bave plivanjem onihomikoza se 3 puta češće javlja nego kod ostatka populacije (Sigurgeirsson et Steingrimsson, 2004). Nošenje zatvorene obuće, poput patika naročito je povezano sa nastankom onihomikoze. Ovakva obuća pojačava znojenje nogu i takođe često stvara ponavljane mikrotraume nokta, koje mogu služiti gljivama kao ulazno mesto infekcije, pa nije iznenađujuće da je upravo najčešća učestalost onihomikoze kod fudbalera (Tchernev et al, 2013).

Brojne studije su pokazale da različiti dodatni faktori mogu uticati na češće javljanje onihomikoze kao što su zanimanje pacijenata, geografski region, odnosno uticaj klimatskih faktora, prethodna oboljenja nokta i ranije postojanje onihomikoze kao i *tinea pedis* kod pacijenata, putovanja, prethodna trauma nokta, nošenje neadekvatne zatvorene obuće, pojačano znojenje nogu, neadekvatna higijena nogu, kontakt sa životinjama, kontakt sa zemljom, onihofagija, dugotrajna upotreba antibiotika i imunosupresivne terapije itd. (Chaitra et Bala, 2014; Tchernev et al, 2013; Singal et Khanna, 2011; Sigurgeirsson et Steingrimsson, 2004).

1.9. Imunski odgovor

U imunskom odgovoru na gljive učestvuju protektivni mehanizmi koji se rano tokom evolucije detektuju kod višćelijskih organizama (urođena imunost) kao i mehanizmi koji se specifično indukuju tokom infekcije i oboljenja (stečena imunost).

1.9.1. Urođeni imunski odgovor

Imunski odgovor na dermatofite započinje interakcijom gljiva sa ćelijama *stratum corneum*. U prisustvu dermatofitnih antigena, kao što je trihofitin, keratinociti oslobađaju IL-8 koji dovodi do akumulacije neutrofila u *stratum corneum* (Grappel et Blank, 1972). Prema tome keratinociti nemaju samo ulogu u formiranju mehaničke barijere već imaju značajnu ulogu u započinjanju kožne inflamatorne reakcije (Almeida, 2008). Polimorfonuklearni leukociti (PMNL) i monociti imaju značajnu ulogu u odbrani organizma od gljiva. Fagocitoza i respiratorni prasak su 2 osnovna mehanizma kojima PMNL ubijaju gljive. Makrofagi fagocituju konidije *T. rubrum*, dok egzoantigeni ili manani ove gljive mogu inhibirati ovaj proces. Fagocitivane konidije *T. rubrum* utiču na nishodnu regulaciju molekula glavnog kompleksa tkivne podudarnosti MHC II (engl. major histocompatibility complex) kao i ekspresiju kostimulatornih molekula i indukuje produkciju snažnog antiinflamatornog citokina IL-10. Takođe unutar samih makrofaga može doći do diferencijacije konidija u hife što može dovesti do smrti samih makrofaga. Na ovaj način gljivične ćelije inhibirajući funkciju makrofaga i indukujući supresivne citokine izbegavaju imunski odgovor (Campos et al, 2006).

Imunski sistem takođe je razvio i sistem za nadzor nad patogenima, tzv. receptori za prepoznavanje obrazaca koji prepoznaju često sretane strukture produkata mikroorganizama. U ovu grupu spadaju i receptori slični Toll-u (engl. Toll-like receptors - TLR). Primećeno je da TLR-2 zavisni mehanizmi indukovani od strane pojedinih mikroorganizama (verovatno i *T. rubrum*) dovode do izbegavanja ili inhibicije imunskog odgovora (Kopp et Medzhitov, 2003).

Dektin-1, β -glukanski receptor koji se prvenstveno nalazi na makrofagima i dendritičnim ćelijama, predstavlja mali tip II transmembranski receptor koji sadrži lektinu slične ugljenohidratne domene prepoznavanja koje prepoznaju β 1,3- i β 1,6- vezane glukane kao i intaktne ćelije kvasnica. Dektin-1 posreduje u ćelijskom odgovoru na kvasnice ili konidije gljiva indukujući produkciju proinflamatornih citokina (Brown et al, 2003).

Otkriven je i drugi ugljenohidratni receptor dektin-2 koji se dominantno vezuje za hife *T. rubrum* kao i za hife drugih vrsta gljiva i dovodi do aktivacije makrofaga (Sato et al, 2006).

1.9.2. Stečeni imunski odgovor

1.9.2.1. Humoralna imunost

Brojne studije su pokazale da humoralni imunski odgovor na dermatofite nije protektivan. Međutim, antitela se mogu detektovati kod inficiranih životinja i ljudi. Kod pacijenata sa hroničnom dermatofitozom detektovane su visoke koncentracije IgE i IgG4 antitela. S druge strane koncentracije antitela su niske kod osoba sa pozitivnim kožnim testom kasne preosetljivosti. Pozitivan test rane preosetljivosti često se viđa kod osoba sa hroničnom dermatofitozom (Almeida et al, 2008).

1.9.2.2. Ćelijski posredovan imunski odgovor

Karakterističan ćelijski posredovan imunski odgovor na gljive predstavlja kasni tip preosetljivosti u kome su krajnje efektorske ćelije aktivirani makrofagi. Do aktivacije makrofaga dolazi usled proizvodnje interferona (IFN- γ) od strane CD4⁺ T limfocita. Ovaj odgovor karakteriše induracija na mestu ubrizgavanja usled regrutovanja ćelija u kožu i pridruženog taloženja fibrina. Pozitivna reakcija kasne preosetljivosti povezana je sa niskim titrom IgG antitela usmerenih ka antigenima gljiva roda *Trichophyton* i odsustvo IgE ili IgG4 antitela (Almeida et al, 2008).

1.10. SCIO indeks

S obzirom, da različite promene na noktima mogu da izgledaju kao onihomikoza, radi pravilnog i jedinstvenog procenjivanja oštećenja nokatne ploče, uveden je zbirni klinički indeks onihomikoze, SCIO indeks (*Scoring Clinical Index for Onychomycosis*) (Sergeev et al, 2002). SCIO indeks se određuje na osnovu niza parametara kao što su klinički tip i lokalizacija onihomikoze, stepen zahvaćenosti nokatne ploče, stepen zadebljanja nokatne ploče i uzrast pacijenta. SCIO indeks omogućava objektivnu procenu kliničke manifestacije onihomikoze obolelih bez obzira na njihove demografske razlike i potencijalne faktore rizika za nastanak infekcije.

U odnosu na vrednost SCIO indeksa, procenjuje se stepen oštećenja nokta i primenjuju odgovarajući terapijski protokoli.

SCIO index se izračunava po sledećoj formuli:

$$SCIO = [(d/3)^{3-f} (f + h (3 - f)) (L) (a + 3)/3]^{1 - [(2-f)(3-f)/2]}$$

d – stepen zahvaćenosti nokta; f – klinički oblik; h – stepen zadebljanja nokta; L – lokalizacija; a –uzrast pacijenta.

Tabela 3. Preporuke za izbor terapijskog pristupa u zavisnosti od vrednosti SCIO indeksa po Sergeev-u.

SCIO indeks	Terapijski pristup
LOKALNA TERAPIJA	
1 – 3	Maksimalno ukloniti zahvaćene delove nokta. Aplikovati antimikotike sve dok potpuno ne izraste zdrav nokat.
4 – 6	Uspeh terapije zavisi često od brzine rasta nokta. Preporučuje se sistemska terapija kod noktiju koji sporije rastu ili kod PSO.
SISTEMSKA TERAPIJA	
7 – 9	Koristiti terapijske protokole preporučene za nokte na rukama (npr. Itrakonazol: pulsna terapija 2 × 200 mg 2×dan).
10 – 12	Koristiti terapijske protokole preporučene za nokte na nogama (npr. Itrakonazol: pulsna terapija 3 × 200 mg 2×dan).
13 – 16	Koristiti produžene terapijske protokole sa bilo kojim antimikotikom (npr. Itrakonazol: pulsna terapija 4-5 × 200 mg 2×dan).
KOMBINOVANA TERAPIJA	
17 – 20	Sistemske antimikotik + topikalna terapija. Preporučuje se adekvatan keratinolitički tretman.
21 - 30	Preporučuje se avulzija nokta (npr. urea pastom), a zatim nastaviti sa sistemskom terapijom.

Vrednosti SCIO indeksa se izražavaju brojevima 1-30. Više vrednosti SCIO indeksa ukazuju na veću ozbiljnost onihomikoze i neophodnost duže antimikotične terapije (Sergeev et al, 2002). Izbor terapijskog pristupa u zavisnosti od vrednosti SCIO indeksa predstavljen je u Tabeli 3.

1.11. Laboratorijska dijagnoza onihomikoze

Dijagnoza onihomikoze se ne može postaviti samo na osnovu kliničke slike. S obzirom da različiti izazivači mogu često dati identičnu kliničku sliku, sumnju na onihomikozu je neophodno potvrditi laboratorijskim analizama, kako zbog utvrđivanja uzročnika, tako i zbog primene adekvatne terapije. Iako je od svih promena na noktima onihomikoza najčešća, njen udeo u svim onihopatijama je 20-50%. U sklopu oboljenja kao što su psorijaza, periferna vaskularna oboljenja, *lichen planus*, tumor i trauma nokta nastaju promene na noktima koje liče na onihomikozu. S druge strane, identifikacija omogućava i uvid o antropofilnoj, zoofilnoj ili geofilnoj prirodi dermatofita što omogućava primenu preventivnih mera. U zavisnosti od tipa onihomikoze zavisi način uzorkovanja kliničkog materijala (Kaur et al, 2008). Neophodno je obezbediti dovoljnu količinu uzorka kao preduslov za pravilno dijagnostikovanje odgovarajućim laboratorijskim metodama. U cilju laboratorijske potvrde onihomikoza najčešće se primenjuju sledeće metode:

- ❖ Pregled direktnog mikroskopskog preparata (DMP) uz korišćenje reagenasa za razgradnju keratina (KOH, dimetil-sulfoksid - DMSO, NaOH)
- ❖ Upotreba različitih boja u DMP: Chlorazol black E (CBE), KOH-CBE, Periodic acid-Schiff (PAS), Blue-Black Ink permanent, Cotton blue, Congo red
- ❖ Upotreba različitih fluorescentnih supstanci u DMP: Calcofluor white, Blankophor, Acridinium orange, Uvitex
- ❖ Korišćenje različitih tehnika bojenja u patohistološkim preparatima: PAS, Grocott-Gomori silver
- ❖ Kultivisanje na različitim hranljivim podlogama: Sabouraud dekstrozni agar (SDA), Potato dextrose agar (PDA), Dermatofit test medijumu – DTM, Dermatofit Identification medium – DIM, CHROM agar, Borelli lactrimel agar, Baxter medium, Takashio medium (razblaženi SDA – R-SDA)
- ❖ Biohemijski i fiziološki testovi: test ureazne aktivnosti, „*mating*“ test
- ❖ Različite tehnike molekularne biologije: Polymerase Chain Reaction (PCR – reakcija lančanog umnožavanja), Polymerase chain reaction-enzyme-linked immunosorbent assay (PCR-ELISA), restriction fragment length polymorphism (RLFP)
- ❖ Matrix-assisted laser desorption ionization time of flight masena spektrometrija (MALDI-TOF MS)

1.11.1. Uzorkovanje

Preduslov uspešne laboratorijske dijagnostike onihomikoza je obezbeđivanje kvalitetnog uzorka nokta. Uzorak je idealno uzeti pre započinjanja bilo kakve antimikotične terapije. Ukoliko je pacijent već bio na terapiji, s obzirom da se antimikotici nakupljaju u tkivu nokta, potrebno je da prođe minimum 2 nedelje od poslednjeg aplikovanja lokalnih antimikotika, odnosno 4 nedelje posle uzimanja sistemskih antimikotika kako bi se izbegli lažno negativni rezultati (Singal et Khanna, 2011). Neposredno pre uzimanja uzorka nokta, površinu nokta je potrebno pebisati 70% alkoholom kako bi se smanjio broj prisutnih plesni i bakterija. Dezinfekcija nokta nije neophodna ako će se prilikom kultivisanja koristiti podloge koje sadrže cikloheksimid (aktivan protiv plesni) ili hloramfenikol (aktivan protiv bakterija) (Tchernev et al, 2013). Prilikom uzorkovanja potrebno je uzeti što je moguće više materijala s obzirom da su gljivični elementi „zarobljeni“ u keratinu. Kako bi se izbegli lažno negativni rezultati potrebno je izabrati pravo mesto sa koga će se uzeti uzorak nokta, što direktno zavisi od kliničkog tipa onihomikoze (Robert et Pihet, 2008). Kod osoba sa hipertrofičnim i distrofičnim noktima uzorkovanje može biti poprilično zahtevno. Pojedini autori su razvili alternativne, invazivnije metode kako bi poboljšali dijagnostiku onihomikoza korišćenjem mikrotoma ili čak tehnikama bušenja nokatne ploče u cilju dobijanja što kvalitetnijeg uzorka (Qureshi et al, 2004; Gunasekera et al, 2011).

1.11.2. Direktna mikroskopija

Direktna mikroskopija predstavlja najbrži metod u dijagnozi onihomikoza. Tehnički je jednostavna i jeftina metoda, ali zahteva visoku stručnost i obučenost osobe koja posmatra preparate. Prema pojedinim autorima lažno negativni rezultati se javljaju u oko 5-15% (Panasiti et al, 2006). U rutinskoj dijagnozi onihomikoza uglavnom predstavlja prvi korak tzv. „*screening*“ metoda jer omogućava vizuelizaciju eventualno prisutnih gljivičnih elemenata, ali se ne može izvršiti identifikacija uzročnika do nivoa roda/vrste. DMP se standardno prave sa 10-30% kalijum hidroksidom (KOH) sa ili bez dodatka dimetil sulfoksida (DMSO). KOH razgrađuje keratin i druge proteine, lipide i većinu epitelnih ćelija prisutnih u preparatima, ali ne i gljivični ćelijski zid koji je izgrađen od polisaharida hitina, polimera N-acetil-D-glukozamina (Grover et al, 2012). Takođe, umesto KOH može se koristiti i 10% natrijum hidroksid (NaOH) (Robert et al, 2008). Proces razgradnje se može ubrzati kratkim zagrevanjem preparata sa KOH i/ili DMSO (Tchernev et al, 2013).

Vizuelizacija gljivičnih elemenata u direktnim preparatima noktiju je često zahtevna i potrebno je pregledati preparat u roku 20 minuta do 2 sata po pravljenu preparata. Međutim, ukoliko je nokat bio naročito hipertrofičan razgradnja keratina traje duže, pa se preparat često mora ostaviti preko noći u vlažnoj komori kako ne bi došlo do isušivanja (Grover et al, 2012). Senzitivnost DMP sa KOH i/ili DMSO je poprilično niska, prema većini studija kreće se oko 50-60% (Grover et al, 2012).

Pojedini autori pre pripreme DMP i kultivisanja uzoraka preporučuju metodu tretiranja uzorka tripsinom. Naime, tripsin takođe razgrađuje keratin, ali je senzitivnost DMP nakon primene tripsina znatno veća i kreće se do 90% (Xess et al, 2004).

U cilju povećavanja senzitivnosti mikroskopiranja i lakšeg uočavanja gljivičnih elemenata mogu se dodavati različite boje radi lakšeg uočavanja gljivičnih elemenata u DMP. Najčešće se koriste Chloraloz black E, Blue-black Parker ink ili Cotton blue, ali s obzirom da se ove boje ne vezuju samo za pojedine specifične strukture gljiva, moguća je pojava artefakta (npr. „mozaična gljiva“), usled čega su mogući lažno pozitivni rezultati (Robert et al, 2008).

U novije vreme koriste se i nespecifične fluorescentne boje kao što su *Blankophor* i *Calcofluor white* (Kaur et al, 2008). Ovi derivati distilbena se vezuju za hitin koji predstavlja glavni polsaharid u ćelijskom zidu gljiva. Pojedine studije su pokazale da se na ovaj način senzitivnost DMP može povećati i do 88%. Pomenuta fluorescentna bojenja još uvek nisu u rutinskoj upotrebi u većini dijagnostičkih laboratorija zato što je za posmatranje preparata neophodan fluorescentni mikroskop (Abdelrahman et al, 2006).

1.11.3. Patohistološki preparati

Patohistološki preparati standardno se prave sa PAS i hife se vide kao crveno prebojene gljivične strukture u tkivu nokta. Senzitivnost ove tehnike je veoma dobra, prema pojedinim studijama kreće se i do 92% (Weinberg et al, 2003). Međutim, ovaj vid dijagnoze onihomikoze se relativno retko koristi u rutinskoj praksi. Osnovni problem je invazivni postupak dobijanja uzorka nokta. Osim toga, biopsiju nokta nije uvek moguće ni odraditi, kao što je slučaj kod pacijenata sa dijabetesom (Tchernev et al, 2013). Suarez i saradnici su pokazali visok stepen lažno negativnih rezultata na početku infekcije, dok još gljive nisu izvršile invaziju nokatne ploče (Suarez et al, 1991). Dodatni problem je što ne omogućava

uvid u vitalnost gljivičnih elemenata kao ni mogućnost identifikacije do nivoa roda/vrste (Robert et al, 2008). Groccot-Gomori silver bojenje prema pojedinim autorima predstavlja bolji vid bojenja jer omogućava bolji kontrast i lakšu vizuelizaciju gljivičnih elemenata (Grover et al, 2012).

1.11.4. Kultivisanje

Za izolaciju uzročnika onihomikoza najčešće se koristi standardna mikološka podloga Sabouraud dekstrozni agar (SDA). Ovu podlogu je osmislio francusku dermatolog Raymond J. A. Sabouraud krajem 19. veka specijalno za kultivaciju dermatofita (Sabouraud, 1896a). Na ovoj podlozi moguć je porast i kvasnica i nedermatofitnih plesni. S obzirom da je podloga nastala u preantibiotskoj eri, Sabouraud je porast bakterija inhibirao niskim pH (pH 5,6) (Sabouraud, 1896b). U kombinaciji sa KOH preparatom SDA predstavlja najčešći vid dijagnostike onihomikoze u rutinskim laboratorijama, gde kultivisanje gljiva traje u proseku 7 dana, a za dermatofite do 21 dan na temperaturama 28°C i 37°C. Međutim senzitivnost ove kombinacije nije zadovoljavajuća i uglavnom ne prelazi 50-70% (Tchernev et al, 2013). Osim toga, identifikacija gljiva na ovoj podlozi, posebno dermatofita, je ponekad veoma teška usled njihove fenotipske varijabilnosti. Takođe, kod *T. rubrum* crveni pigment koji se javlja prilikom rasta se na ovoj podlozi retko uočava. Istraživanja su pokazala da je stepen lažno negativnih rezultata prilikom kultivisanja uzoraka noktiju na SDA i do 30%.

Razblaženi SDA (RSDA) pripada grupi osiromašenih podloga, predstavlja modifikaciju SDA, i inkubira se pod istim uslovima. Nizak sadržaja glukoze (svega 0,2%) i dodavanje soli ($MgSO_4 \times 7 H_2O$) omogućavaju bolju sporulaciju zasejanih gljiva čime je njihova identifikacija olakšana (Takashio, 1972).

Dermatofit test medijum (DTM) predstavlja selektivnu podlogu za dermatofite kojom se može potvrditi prisustvo dermatofita u kliničkom uzorku. Za razliku od standardnih mikoloških podloga, DTM omogućava brže detektovanje dermatofita u proseku za 3-7 dana. Porast dermatofita na ovoj podlozi dovodi do porasta pH usled prisustva alkalnih metabolita koji se oslabadaju tokom rasta dermatofita. Porast pH uzrokuje promenu boje indikatora fenol crveno u podlozi i dovodi do prelaska boje podloge iz žute u crvenu. Podlogu je prvi opisao Taplin koji je tačno identifikovao dermatofite na osnovu promene boje podloge u 97% od 1400 ispitivanih gljivičnih kultura (Taplin et al, 1969).

Kultivisanje i dalje predstavlja zlatni standard u dijagnostici onihomikoza na osnovu kojeg je moguće izvršiti identifikaciju do nivoa roda, odnosno vrste uzročnika. Različite studije pokazuju da senzitivnost kultivisanja varira 25-80% (Grover et al, 2012; Kaur et al, 2008).

Kultivisanjem je moguće identifikovati uzročnog faktora onihomikoze, ali usled sporog rasta gljiva neophodno je sačekati najmanje 3 nedelje, a nekada i duže. Takođe, identifikacija gljiva je nekada veoma teška usled izrazitog fenotipskog varijabiliteta naročito dermatofita. Senzitivnost kultivisanja je i dalje veoma niska, česti su lažno negativni rezultati, jer gljivični elementi iako prisutni i primećeni u direktnim mikroskopskim preparatima ostaju zarobljeni u keratinskom omotaču, pa ne dolazi do porasta gljiva na kulturama. Još jedan od razloga niske senzitivnosti kultivisanja leži u činjenici da uzorkovanje najčešće podrazumeva uzimanje distalnog dela nokatne ploče gde su gljivični elementi u određenom broju slučajeva nevijabilni, a kultivisanje podrazumeva razmnožavanje gljiva na podlozi.

1.11.5. Metode molekularne biologije

U cilju prevazilaženja nedostataka prethodno pomenutih laboratorijskih metoda za potvrdu kliničke dijagnoze onihomikoza, uvedene su metode molekularne biologije s ciljem da se skрати vreme neophodno za postavljanje dijagnoze onihomikoze i da se procenat lažno negativnih rezultata svede na najmanju moguću meru (Alexander et al, 2011). Značaj primene metoda molekularne biologije u dijagnozi onihomikoza naročito se ogleda u preciznosti identifikacije uzročnika. Naime, identifikacija dermatofita konvencionalnim metodama na osnovu mikroskopskih i makroskopskih karakteristika često je veoma zahtevna usled morfološke sličnosti vrsta, varijabilnosti i prisutnog polimorfizma (Kanbe, 2008). Istraživanja u oblasti hromozomske dezoksiribonukleinske kiseline (DNK) dermatofita ukazala su na izrazitu genetsku homogenost unutar ove grupe uprkos fenotipskih i ekoloških varijacija. Dalja istraživanja bila su usmerena ka mitohondrijalnoj i ribozomskoj DNK što je doprinelo razvoju tehnika za identifikaciju dermatofita zasnovanih na metodama molekularne biologije (Kac, 2000). Senzitivnost ovih metoda zavisi od primenjenog protokola i kreće se 37-93% (Paugam et al, 2013).

1.11.5.1. Ekstrakcija DNK

Da bi uzorak nokta bio pogodan za reakciju lančanog umnožavanja (engl. polymerase chain reaction – PCR) mora prethodno da se pripremi i da se iz njega ekstrahuje DNK. Za uspešnu ekstrakciju DNK potrebno je primeniti tehnike kojima se razara rigidan ćelijski zid gljiva, a u pojedinim slučajevima su u biološkom materijalu prisutni inhibitori PCR reakcije. Brojne studije koristile su različiti postupke ekstrakcije kao što je manuelna homogenizacija kliničkih uzoraka (Garg et al, 2009; Uchida et al, 2009), mehanička liza perlama (Ebihara et al, 2009; Sato et al, 2010), procedure ponovnog zamrzavanja i odmrzavanja (Litz et Cavagnolo, 2010) kao i tradicionalna fenol-hloroformna ekstrakcija (Li et al, 2011; Kim et al, 2011). Prve PCR reakcije su bile tehnički zahtevne, sa brojnim koracima u proceduri koje su predstavljale potencijalnu opasnost za kontaminaciju uzoraka (Kardjeva et al, 2006). Novije procedure ekstrakcije DNK koje koriste brzu digestiju pomoću proteinaze K, znatno su skratile i unapredile tehnički postupak i kontaminaciju uzoraka svele na minimum (Brillowska-Dabrowska et al, 2010; Wisselnik et al, 2011; Beifuss et al, 2011; Alexander et al, 2011).

1.11.5.2. Izbor adekvatnih ciljnih molekula

Gen za hitin sintetazu 1 (engl. chitin synthase1 - CHS 1) već nekoliko godina se koristi kao ciljni molekul za dokazivanje svih dermatofita (pan-dermatofitne tehnike) s obzirom na konzerviranost ovog regiona (Kano et al, 2003). U testovima za dokazivanje pojedinih vrsta unutar grupe dermatofita kao ciljni molekul najčešće se koristi ribozomalni RNK region koji obuhvata 18S, ITS1, 5.8S, ITS2 i 26S. U ovom region se nalaze repetitivne sekvence (multikopije gena) pa značajno povećavaju senzitivnost dijagnostičkih testova (Jensen et Arendrup, 2012). Za dokazivanje pojedinih vrsta dermatofita kao ciljni molekul može se koristiti i gen za topoizomerazu II (Beifuss et al, 2011), kao i mikrosatelitne markere (Brasch et al, 2011).

Metode molekularne dijagnostike mogu se podeliti u 3 grupe:

1.11.5.3. Konvencionalni PCR

PCR predstavlja reakciju lančanog umnožavanja željenog segmenta DNK u *in vitro* uslovima, koji se odvija u ponovljenim ciklusima DNK replikacije. Prednost primene komercijalnog PCR u laboratorijskoj potvrđi dijagnoze onihomikoze ogleda se u relativnoj jednostavnosti postupka i visokoj pouzdanosti testa, gde je cena analize približno jednaka ceni izvođenja konvencionalne laboratorijske dijagnostike koja podrazumeva preglede DMP i kultivisanje uzorka na različitim hranljivim podlogama (Gupta et al, 2007b). Osnovni problem u primeni ove metode predstavlja interpretacija rezultata, koja se uglavnom radi elektroforezom na agaroznom gelu, s obzirom da se radi o otvorenom sistemu, pa postoji mogućnost kontaminacije „stranom“ DNK (Jensen et Arendrup, 2012).

Prednost PCR metode je u tome što predstavlja brzu dijagnostičku metodu koja omogućava identifikaciju gljiva do nivoa roda/vrste direktno u uzorcima noktiju. Konvencionalni PCR u laboratorijskoj potvrđi dijagnoze onihomikoze najčešće je usmeren ka detekciji dermatofita uopšteno (pan-dermatofitne metode) ili ka pojedinim vrstama dermatofita. Na osnovu toga negativan nalaz PCR ujedno označava da je uzorak nokta negativan na bilo koju vrstu dermatofita. Pojedine studije su visok stepen senzitivnosti i specifičnosti PCR postizale kombinacijom 2 ili više PCR metoda, kako bi se detektovala sva tri roda dermatofita ili su koristile samo jedan pan-dermatofitni PCR koji je mogao detektovati dermatofite uopšteno (Brillowska-Dabrowska et al, 2010; Kondori et al, 2010; Kim et al, 2011). Drugi autori su koristili konvencionalni PCR za detekciju svih potencijalnih gljiva (kako dermatofita, tako i kvasnica i nedermatofitnih plesni) uzročnika onihomikoza upotrebom pan-fungalnog tripleks PCR. Ovaj pristup je od značaja u regionima sa visokom učestalošću onihomikoze izazvane nedermatofitnim gljivama, ali osnovni nedostatak je što ne omogućava identifikaciju do nivoa roda/vrste pa je samim tim teža interpretacija ovakvih rezultata (Li et al, 2011).

1.11.5.4. Real-time PCR

Real-time PCR predstavlja metodu kojom se istovremeno vrši umnožavanje DNK segmenta i njegovo kvantitiranje. U laboratorijskoj potvrđi dijagnoze onihomikoze ova metoda se sve češće koristi jer je interpretacija rezultata automatizovana i dešava se u

zatvorenom sistemu pa ne postoji rizik od kontaminacije, a moguća je istovremena detekcija više različitih gljivičnih vrsta (Jensen et Arendrup, 2012).

Real-time PCR u dijagnozi onihomikoze najčešće se koristi za dijagnozu *T. rubrum*, odnosno pojedinih vrsta dermatofita (Alexander et al, 2011; Bergmans et al, 2010). Wisselnik i saradnici su pored detekcije pojedinih vrsta dermatofita u uzorcima noktiju detektovali i dermatofite uopšteno kao što je pan-dermatofitni marker (Wisselnik et al, 2011).

1.11.5.5. Post-PCR tehnike

Primenom post-PCR metoda unapređuje se osetljivost analize, ali glavni problem predstavlja povećan rizik od kontaminacije (Jensen et Arendrup, 2012). Preporuke su da se uvek prilikom izvođenja PCR analize koriste interne kontrole kako bi se jasno razlikovali stvarno negativni od lažno negativnih uzoraka. Naime, klinički uzorci često sadrže supstance koje mogu inhibirati PCR, pa usled izostanka amplifikacije uzorci se označavaju lažno negativnim uprkos prisustvu ciljne DNK u uzorku nokta (Jensen et Arendrup, 2012).

Beifuss i saradnici su u pokazali da kada se koristi detekcija PCR produkata ELISA testom (Enzyme linked immunosorbent assay) reakcija je 10 puta senzitivnija od klasične gel elektroforeze (Beifuss et al, 2011). Litz i saradnici su koristili „nested“ PCR za detekciju dermatofita smatrajući da kombinacija ove tehnike sa mikroskopijom treba da predstavlja inicijalni korak u laboratorijskoj potvrđi dijagnoze onihomikoze (Litz et al, 2010) .

1.12. Terapija onihomikoza

Terapija onihomikoza je značajno unapređena poslednjih godina, što znači da u većini slučajeva možemo očekivati potpuno i trajno izlečenje. Međutim, preduslov za izbor odgovarajućeg terapijskog protokola predstavlja tačna identifikacija uzročnika onihomikoze. Takođe, prilikom izbora terapijskog pristupa pored poznavanja uzročnog faktora mora se voditi i računa o stepenu zahvaćenosti nokta infekcijom (Effendy et al, 2005).

DLSO se po pravilu teško leči i povezana je sa visokom stopom recidiva infekcije (Noble et al, 1998). Step en uspešnog izlečenja onihomikoze je viši kod noktiju na rukama, s obzirom da oni brže rastu i da prilikom lečenja zahtevaju kraće terapijske protokole, nego

kada su u pitanju nokti na nogama (Gupta et al, 2003). Ukoliko je onihomikozi prethodila trauma nokta, izrastanje novog nokta može biti usporeno i često noktat, uprkos eradikaciji infekcije, ne postiže normalan izgled. Za uspešan terapijski ishod onihomikoze neophodna je saradnja pacijenta uz razumevanje da izlečenje neće nastupiti brzo i da je neophodno dugo praćenje pacijenata da bi se blagovremeno uočili relapsi infekcije (Gupta et Cooper, 2008).

Lokalna antimikotična terapija primenjuje se u blažim slučajevima kada još nije došlo do invazije matriksa nokta. U slučajevima gde je i matriks zahvaćen infektivnim procesom primenjuje se sistemska i kombinovana terapija, a u najtežim slučajevima i hirurška avulzija nokta (Effendy et al, 2005).

Kao dopunski tretman lokalnoj i/ili sistemske terapiji onihomikoze primenjuje se i debridman nokta, naročito u slučajevima kada je nokat poprilično zadebljao ili kada se gljive nakupljaju na jednom mestu na noktu pa formiraju dermatofitome, linije infekcije ili kod lateralno lokalizovane infekcije. Ovaj postupak se uz poseban oprez izvodi kod osoba sa dijabetesom i kompromitovanom perifernom cirkulacijom, koje su naročito sklone razvoju ozbiljnih komplikacije usled eventualnog oštećenja dubljih struktura nokta i okolne kože (Gupta et al, 2008). Pacijenti sa onihomikozom koji su uz standardnu terapiju bili podvrgnuti i debridmanu imali su značajno bolji terapijski uspeh (Tavakkol et al, 2006; Potter et al, 2007).

U lečenju onihomikoza primenjuju se sledeći terapijski pristupi:

1.12.1. Lokalna antimikotična terapija

Lokalna antimikotična terapija je indikovana u slučajevima blage do umerene infekcije, kada je infektivnim procesom zahvaćeno $\leq 50\%$ nokatne ploče (gledano od distalne ivice nokta), nema invazije matriksa nokta i infekcija postoji samo na nekoliko (3-4) noktiju. Osnovna prednost lokalne terapije je u tome što je jednostavna za primenu i izaziva znatno manje neželjenih efekata od oralne antimikotične terapije (Lecha et al, 2005). Dva lokalna preparata u formi lakova za nokte, koji dobro penetriraju u nokat i odobreni su kao monoterapija u onihomikozi, su: ciklopiroks i amorolfin (Tabela 4). Preparati u vidu laka su superiorniji od lokalnih lekova u drugim oblicima s obzirom da usled njihove isparljivosti ostavljaju na površini nokta okluzivni film koji obezbeđuje stalnu visoku koncentraciju leka i sprečavajući isušivanje nokta povećava difuziju lekovite supstance u dublje strukture nokta

(Baran et Kaoukhov, 2005). Oba leka imaju širok spektar dejstva i efikasni su u lečenju onihomikoze izazvane dermatofitima, kvasnicama kao i plesnima (Singal et Khanna, 2011).

Ciklopiroks je derivat hidroksipiridona koji inhibira enzimske procese uključene u preuzimanje hranljivih suspcstanci, produkciji energije i degradaciji toksičnih intracelularnih peroksida (Bohn et Kraemer, 2000). U vidu 8% laka za nokte koristi se za onihomikozu izazvanu *T. Rubrum* kao i *S. brevicaulis* i *Candida* spp. Primenjuje se jednom dnevno tokom 48 nedelja. Preporuke su da se koristi uz debridman nokta kako bi se obezbedilo prodiranje leka do dela nokta zahvaćenog infekcijom i kako bi se smanjilo opterećenje gljivičnim elementima. Mikološko izlečenje u 48 nedelji kreće se od 33-67% i nisu primećeni neželjeni efekti primene leka (Gupta et al, 2008).

Amorolfin je sintetski antimikotik koji ima širok spektar dejstva. Inhibira δ -14 reduktazu i enzime δ -8 i δ -7 izomerazu u biosintezi ergosterola. Ispoljava fungicidnu aktivnost protiv *C. albicans* i *T. interdigitale*. U vidu 5% laka za nokte primenjuje se 1-2 puta nedeljno tokom 6-12 meseci. Stepem mikološkog izlečenja ovim preparatom je 60-67% i primećeni su blagi neželjeni efekti lokalno na mestu primene leka (Gupta et al, 2004).

Loklna primena terbinafina, leka koji se veoma često koristi u svakodnevnoj praksi u lečenju gljivičnih infekcija kože, može biti korisna kao pomoćna terapija u teškim infekcijama koje se već leče terbinafinom za oralnu primenu ili u slučajevima postojanja paronihije (Lecha et al, 2005). Retko se lokalno u profilaktičke svrhe mogu primenjivati i azoli i alilamini, kao i mikonazol puder, ali uspešnost ovakve profilakse nije pokazala zadovoljavajuće rezultate (Warshaw et St Clair, 2005).

Novi preparat AN 2690 (5-fluoro-1,3-dihidro-1-hidroksi-2,1-benzoksaborol), koji je trenutno u fazi kliničkog ispitivanja, sadrži male molekule dizajnirane da lako penetriraju u tkivo nokta (Van Minnebruggen et al, 2010). Pored dobre kinetike dosadašnja *in vitro* istraživanja pokazala su i širok spektar antimikotične aktivnosti ovog preparata (Baker et al, 2006; Hui et al, 2007; Barak et Loo, 2007).

1.12.2. Sistemska antimikotična terapija

Sistemska terapija je indikovana u situacijama kada je zahvaćeno više od 50% nokatne ploče, veći broj noktiju zahvaćen infektivnim procesom (više od 4) i kada je zahvaćen matriks nokta (Singal et Khanna, 2011). Trenutno su 3 antimikotika odobrena u

sistemske terapiji onihomikoza: grizeofulvin, terbinafin i itrakonazol (Tabela 4) (Roberts et al, 2003).

Grizeofulvin je slab fungistatik koji inhibira sintezu nukleinske kiseline, obustavlja deobu ćelije i inhibira sintezu ćelijskog zida. Tokom poslednjih četiri decenije grizeofulvin je bio jedini dostupni antimikotik koji se koristio u terapiji onihomikoza (Van Minnebruggen et al, 2010). Koristi se samo u lečenju onihomikoze izazvane dermatofitima (Singal et Khanna, 2011). To je jedini lek koji je odobren za lečenje onihomikoze kod dece starije od mesec dana, u dozi 10 mg/kg dnevno. Preporučena doza za lečenje odraslih je 500 mg dnevno tokom 6-9 meseci za lečenje onihomikoze na noktima na rukama, odnosno 12-18 meseci za lečenje onihomikoze na noktima na nogama. Uzima se uz masan obrok kako bi se pospešila apsorpcija leka. Lek je kontraindikovano u trudnoći (Roberts et al, 2003). Iako je grizeofulvin odobren za sistemske terapije onihomikoza, zbog slabog afiniteta za keratin, neophodne duge terapije i slabe efikasnosti zamenjen je azolima i alilaminima (Gupta et al, 2008).

Terbinafin je alilamin koji, inhibirajući enzim skvalen epoksidazu, blokira konverziju skvalena u skvalen epoksid u biosintetskom putu ergosterola. Na ovaj način dolazi do smanjenja ergosterola, integralne komponente citoplazmatske membrane gljiva, što ima fungistatski efekat. S druge strane usled akumulacije skvalena dolazi do direktnog fungicidnog efekta (Ryder et Favre, 1997). Koristi se u lečenju onihomikoze izazvane dermatofitima, nedermatofitima, ređe i kvasnicama. Upotrebljava se u dozi 250 mg dnevno tokom 6 nedelja za lečenje onihomikoze na noktima na rukama, odnosno tokom 12 nedelja za lečenje onihomikoze na noktima na nogama (Roberts et al, 2003).

Itrakonazol pripada grupi azola koji, inhibirajući enzim lanosterol 14- α -demetilazu, inhibira sintezu ergosterola što dovodi do povećane propustljivosti ćelijske membrane gljiva. Ima širi spektar dejstva od ostalih antimikotika i koristi se u terapiji onihomikoze izazvane kvasnicama, dermatofitima i nekim nedermatofitnim plesnima (Singal et Khanna, 2011). *In vitro* istraživanja su pokazala da nije toliko aktivan protiv dermatofita kao terbinafin. Generalno se smatra fungistatikom, ali može dostići i fungicidne koncentracije s obzirom da mu je minimalna fungicidna koncentracija (MFK) oko 10 puta viša od minimalne inhibitorne koncentracije (MIK). Upotrebljava se u dozi 200 mg dnevno kontinuirano tokom 12 nedelja, ili alternativno u vidu pulsne terapije u dozi 400 mg dnevno tokom jedne nedelje u mesecu. Preporuka je da se dva pulsa terapije koriste u lečenju onihomikoze na noktima na rukama, odnosno 3 pulsa za nokte na nogama (Roberts et al, 2003).

Tabela 4. Antimikotici za sistemsku i lokalnu primenu.

Antimikotik	Kontraindikacije	Primena	Neželjeni efekti
Antimikotici za sistemsku primenu			
Grizeofulvin	Bolesti jetre	500 – 1000 mg dnevno tokom 6-9 meseci za nokte na rukama i 12-18 meseci za nokte na nogama	Glavobolja, gastrointestinalne smetnje
Terbinafin	Bolesti jetre i bubrega	250 mg dnevno tokom 6 nedelja za nokte na rukama i 12-16 nedelja za nokte na nogama	Glavobolja, gastrointestinalne smetnje
Itrakonazol	Srčana insuficijencija, hepatotoksičnost	200 mg dnevno kontinuirano tokom 12 nedelja ili „pulsna terapija“ u dozi 400 mg dnevno tokom jedne nedelje u mesecu. Dva pulsa terapije za nokte na nogama 3 pulsa za nokte na nogama	Glavobolja, gastrointestinalne smetnje
Flukonazol	Bolesti jetre i bubrega	150 – 450 mg nedeljno tokom 3 meseca za nokte na rukama i najmanje 6 meseci za nokte na nogama	Glavobolja, gastrointestinalne smetnje
Antimikotici za lokalnu primenu			
Ciklopiroks	Nema	8% lak za nokte jednom dnevno tokom 48 nedelja	Retki: loklani eritem, peckanje, svrab
Amorolfin	Nema	5% lak za nokte jednom ili dva puta nedeljno tokom 6-12 meseci	Retki: periungvalni eritem

Flukonazol takođe pripada grupi azola sa istim mehanizmom dejstva kao i itrakonazol. Ovaj lek nije zvanično odobren za lečenje onihomikoze, ali se u praksi veoma često koristi (Ameen et al, 2014). Najbolju efikasnost pokazuje u lečenju onihomikoze izazvane gljivama roda *Candida*, osim *C. glabrata* i *C. krusei*, zatim i dermatofitima. U noktima se može detektovati za 2 nedelje od započinjanja terapije i u visokim koncentracijama se održava u noktu čak 3-6 meseci posle prekida terapije. Zbog brze penetracije i tendencije da se koncentriše u keratinskim strukturama uglavnom se aplikuje jednom nedeljno (Singal et Khanna, 2011). Upotrebljava se u dozi 150 mg (za lečenje kvasnica i dermatofita), odnosno 300-450 mg (za lečenje nedermatofitinih plesni) jednom nedeljno tokom 6-12 meseci. U lečenju onihomikoze na noktima na nogama terapija flukonazolom u proseku traje 9-15 meseci, a na noktima na rukama 4-9 meseci (Gupta et al, 2008).

1.12.3. Kombinovana terapija

Iako oralna monoterapija onihomikoza pokazuje dobre rezultate, kombinacija oralnih preparata sa dodatnom lokalnom antimikotskom terapijom pokazala je da poboljšava rezultate lečenja onihomikoze (Baran et Kaoukhov, 2005; Frankum et al, 2005). U Islandskoj kohortnoj studiji praćena je efikasnost lečenja onihomikoze tokom 5 godina. Na kraju ispitivanog perioda samo 46% pacijenata lečenih terbinafinom, odnosno 13% lečenih itrakonazolom su bili zaisata izlićeni, što je ukazivalo da se kod velikog broja pacijenata koji su primali monoterapiju javljaju relapsi i reinfekcije (Sigurgeirsson et al, 2002b). Prilikom kombinovane primene dva ili više antimikotika javlja se sinergija lekova usled koje primenjena kombinacija lekova pokazuje veću efikasnost u odnosu na aditivne efekte svakog pojedinaćnog leka (Evans, 2003). To se ogleda u povećanoj efikasnosti, bržem postizanju pozitivnih efekata terapije, širem spektru dejstva primenjenih lekova i boljom tolerancijom primenjene terapije od strane pacijenata sa onihomikozom (Olafsson et al, 2003). Naime, razlike u načinu primene oralnih i lokalnih antimikotika u kombinovanoj terapiji omogućavaju dobru penetraciju leka u različitim delovima nokta, gde se pojedinaćno primenjeni lekovi ne bi akumulirali u efektivnim koncentracijama. Sistemski antimikotici se akumuliraju u ležištu nokta, dok lokalni antimikotici penetriraju u nokatnu ploću i mogu biti efikasni u preveniranju reinfekcija (Olafsson et al, 2003).

1.12.4. Avulzija nokta

Avulzija nokta primenjuje se kod pacijenata sa ozbiljnom kliničkom slikom onihomikoze koja se manifestuje uznapređovalom oniholizom, izraženim zadebljanjem nokatne ploče ili prisustvom longitudinalnih pruga tzv. dermatofitoma (Thappa, 2007). Ovakvo izražene promene na noktima uglavnom loše reaguju na standardne protokole lečenja sistemskim i lokalnim antimikoticima, pa zahtevaju dodatni agresivniji medicinski pristup (Baran et Hay, 1985). Avulzija nokta može biti hemijska ili hirurška (Gupta et Cooper, 2008). Hemijska avulzija predstavlja atrumatsko uklanjanje nokta ili dela nokta lokalnim nanošenjem uree ili jedinjenja bifonazola na obolele nokte. Kod hirurške avulzije uklanja se nokat ili deo nokta agresivnim hirurškim metodama. Kada god je potrebno ukloniti nokat, započinje se sa hemijskom avulzijom jer nije bolna za pacijenata i za razliku od hirurške avulzije nema potencijala da trajno deformiše ležište nokta (Seebacher et al, 2007). Uklanjanjem inficirane noktane ploče eliminiše se najveći broj invazivnih gljiva i omogućeno je tretiranje tkiva ispod noktane ploče lokalnim antimikoticima kako bi se uništile eventualno preostale gljive i sprečila pojava recidiva infekcije. Parcijalna avulzija nokatne ploče najčešće se radi u slučajevima SBO ili ranim stadijumima DLSO (Hay et al, 2001). Veoma dobre kliničke rezultate pokazala je primena hirurške avulzije nokta u slučajevima onihomikoze izazvane nedermatofitnim plesnima kao što su *Scopulariopsis brevicaulis* i *Acremonium* sp. (Lai et al, 2011).

1.12.5. Terapija laserom

U novije vreme u terapiji onihomikoza primenjuje se i laserska terapija (Hohenleutner, 2010). Najčešće se primenjuje kao pulsni 0,65 ms Nd:Yag 1,064 nm laser. Pacijenti se podvrgavaju terapiji laserom 2-3 puta sa minimalnim razmakom od 3 nedelje između svakog tretmana. Laserska terapija se bazira na zračenju površine veličine 2 mm energijom od 233 J/m² bez upotrebe rashlađivajućih sprejeva, gelova ili lokalnih anestetika. Svaki nokat se pojedinačno tretira vertikalno i horizontalno, pri čemu se formira mreža iznad površine nokta. Trajanje tretmana iznosi oko 45 sekundi po svakom noktu, a u cilju sprečavanja reinfekcija pacijentima se savetuje dnevna upotreba antimikotske kreme. Ovakva terapija dala je bolje rezultate kod pacijenata u ranijim fazama onihomikoze (Hochman, 2011).

Noveon laser koristi dve talasne dužine od 870 nm i 930 nm. Zbog svog jedinstvenog fotoletalnog efekta na infektivne agense pokazao je dobre rezultate u lečenju onihomikoze bez obzira na stepen oštećenja nokta (Landsman et al, 2010).

Femtosecond (f-sec) infracrveni titanijum-safir laser omogućava selektivno dopremanje energije do dubokih slojeva nokatnog ležišta. Usled duboke penetracije u nokatno ležište dovodi do eliminisanja dermatofita, a da pri tome ne dolazi do oštećenja okolnog tkiva (Manevitch, 2010).

U terapiji onihomikoze dobre rezultate je pokazala i primena CO₂ lasera (Borovoy et Tracy, 1992).

1.12.6. Fotodinamska terapija

Fotodinamska terapija (FDT), bazirana na upotrebi fotosenzitivnih agenasa i svetlosti odgovarajuće talasne dužine, naročito je pogodna u terapiji DLSO uzrokovane *T. Rubrum* (Sotiriou et al, 2010). Najčešće se u lečenju ove infekcije koristi u kombinaciji sa 5-aminolevulinskom kiselinom (ALK). Naime, *T. rubrum* metaboliše ALK u protoporfirin IX, što se vidi kao crvena fluorescencija pomoću Wood-ove lampe ili fluorescentnog mikroskopa. U optimalnoj koncentraciji od 1-10 mmol/L ALK dovodi do značajne redukcije rasta dermatofita i manifestuje se odsustvom fluorescencije (Kamp et al, 2005). FDT se može primeniti i u lečenju onihomikoze izazvne nedermatofitnim plesnima kao što je *Acremonium sclerotigenum* prilikom koje se, u kombinaciji sa metil-aminolevulinskom kiselinom, aplikuje 3 puta u intervalima od 15 dana između svakog tretmana (Aspiroz et al, 2011). U toku FDT terapije nokat se izlaže horizontalnom i vertikalnom zračenju pulsним laserom na 630 nm i energijom od 100 J/m² jednom nedeljno. Terapija je praćena prolaznim blažim bolom, a do kliničkog poboljšanja onihomikoze dolazi najčešće posle 6-7 tretmana (Watanabe et al, 2008).

1.13. Prevencija onihomikoza

Prevencija onihomikoza ima za cilj sprečavanje nastanka onihomikoze, njenog širenja kao i ponovnog javljanja infekcija kod osoba koje su već imale ovo oboljenje. Značaj onihomikoza se veoma često umanjuje jer se smatra da samo utiču na kvalitet života

pacijenata. Međutim, na onihomikoze ne možemo gledati samo kao na „kozmetički problem“ s obzirom da inficirani nokti predstavljaju hronične rezervoare infekcije koji mogu dovesti do porasta rekurentnih kožnih mikoza i širenja infekcije na druga tkiva i organe (Jesudanam et al, 2002; Szepietowski et al, 2006).

U sprečavanju nastanka infekcije, a posebno reinfekcija kod pacijenata, ključna je odgovarajuća medicinska edukacija o adekvatnoj higijeni stopala i noktiju na nogama. Pacijenti bi trebalo da izbegavaju da hodaju bosu u zajedničkim prostorima koje koriste veliki broj ljudi, kao što su kupaonice, javni tuševi, bazeni, kao i da dobro osuše stopala posle kupanja, tuširanja ili plivanja (Gupta et al, 2005). Ukoliko vremenske prilike dozvoljavaju savetuje se nošenje otvorene obuće ili često menjanje obuće, na 2-3 dana, uz često menjanje čarapa kako bi se izbegao dugotrajan boravak stopala u vlažnim uslovima naročito kod osoba koje su sklone pojačanom znojenju stopala (Gupta et al, 2005). Nokte bi trebalo kratko podsecati i truditi se da uvek budu čisti, koristeći vlastiti pribor ili eventualno dobro dezinfikovati pribor pre i posle upotrebe. Obuća bi trebalo da u potpunosti odgovara, kako ne bi izazvala traume tokom nošenja. Savetuje se da čarape budu od prirodnih materijala, kao što je pamuk, koji imaju sposobnost upijanja znoja. U cilju destrukcije prisutnih gljivičnih elemenata savetuje se često menjanje i/ili adekvatna dezinfekcije obuće kao i pranje čarapa na temperaturi od 60°C uz upotrebu deterdženata (Seebacher et al, 2007; Ameen et al, 2014).

Ciljevi istraživanja

2. Ciljevi istraživanja:

Imajući u vidu sve pomenute činjenice vezane za prevalenciju onihomikoza, uzročne faktore i laboratorijske dijagnostičke metode, ciljevi ovog istraživanja bili su sledeći:

1. Odrediti učestalost javljanja onihomikoza, kao i najčešće uzročnike onihomikoza.
2. Analizirati validnost različitih laboratorijskih metoda za dijagnozu onihomikoza.
3. Ispitati da li primena tripsina utiče na bolju identifikaciju uzročnika onihomikoza.
4. Identifikovati faktore koji doprinose nastajanju onihomikoza.

Materijal i metode

3. Materijal i metode

3.1. Dizajn studije i izbor ispitanika

U okviru ove studije slučajeva uključeno je 374 ispitanika kod kojih je na osnovu kliničkog pregleda od strane specijalista dermatovenerologije ustanovljeno da postoji sumnja na onihomikozu u periodu od 01. oktobra 2012. godine do 31. decembra 2013. godine. Pacijenti su prikupljeni iz šest ustanova: Institut za Mikrobiologiju i imunologiju, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu; Zavod za javno zdravlje, Pančevo; Opšta bolnica „Dr Đorđe Joanović“, Zrenjanin; Opšta bolnica, Užice; Zavod za javno zdravlje „Timok“, Zaječar; Zavod za javno zdravlje, Kraljevo.

Iz studije su isključeni ispitanici koji su koristili lokalne antimikotike dve nedelje pre uzorkovanja, odnosno sistemske antimikotike četiri nedelje pre uzimanja uzorka nokta, kao i pacijenti koji su odbili da daju uzorke nokatne ploče. Takođe, isključeni su i ispitanici od kojih nije prikupljeno dovoljno uzorka noktiju za izvođenje svih laboratorijskih dijagnostičkih testova. Svi ispitanici uključeni u istraživanje bili su detaljno upoznati sa ciljevima i svrhom istraživanja i pristupili su uzorkovanju nakon davanja informativne saglasnosti. Etički komitet Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu odobrio je istraživanje (broj: 29/IV-6).

3.2. Prikupljanje podataka

Od ispitanika anketnim upitnikom (Prilog 1) su prikupljeni osnovni demografski podaci (pol, uzrast, mesto stanovanja i zanimanje), podaci iz lične anamneze (telesna težina i visina, postojanje kompromitovane periferne cirkulacije, dijabetesa, psorijaze i drugih bolesti, primena imunosupresivne terapije, dugotrajna primena antibiotika), podaci o postojanju onihomikoze u porodičnoj anamnezi, podaci o kliničkoj slici i prethodnom postojanju onihomikoze (klinički tip i lokalizacija onihomikoze, stepen zahvaćenosti nokta, stepen zadebljanja nokatne ploče, prethodno postojanje onihomikoze, prethodna terapija onihomikoze, vrsta terapije i način primene antimikotika, dužina prethodne terapije, postojanje paronihije, promena kvaliteta nokatne ploče, promena boje, postojanje deformiteta

nokta i oniholize, postojanje bola i estetski aspekt pacijenta o oboljenju), kao i podaci koji se odnose na prethodnu traumu nokatne ploče, putovanje u poslednjih godinu dana, sprovođenje fizičke aktivnosti, vrstu obuće, pojačano znojenje nogu, posedovanje životinja i kontakt sa zemljom.

Uпитнике su popunjavali lekari dermatovenerolozi koji su prethodno sprovedli klinički pregled ispitanika. U zavisnosti od lokalizacije patološkog procesa na noktima klinički tipovi onihomikoze su označavani kao DLSO, SBO i PSO. Ispitanici sa TDO su klasifikovani u jedan od prethodno navedena 3 klinička tipa u zavisnosti od lokalizacije patološkog procesa na noktima na početku oboljenja, a prema iskazu ispitanika.

3.3. Prikupljanje uzoraka noktiju

Od svakog pacijenta, u zavisnosti od tipa onihomikoze, uzorkovan je odgovarajući deo nokatne ploče struganjem inficiranih delova ili isecanjem slobodne distalne ivice nokta. Pre uzorkovanja površina nokta je prebrisana 70% alkoholom u cilju smanjenja mogućnosti kontaminacije uzorka bakterijama i nedermatofitnim plesnima. Kod DLSO makazicama se iseca slobodna distalna ivica nokta i uzima se kiretom sadržaj ispod nokta što bliže ležištu nokta, naročito sa ivice promene. U slučaju sumnje na PSO površni deo nokta u predelu lunule se odstranjuje i uzima se kiretom sadržaj ispod njega. Kod SBO kiretom se prikuplja uzorak struganjem belih promena na površini nokatne ploče, dok se kod TDO uzorkuje bilo koji dostupan deo nokta koji je zahvaćen patološkim procesom (Robert et al, 2008).

Prikupljeni uzorci noktiju stavljeni su u sterilne plastične Petri šolje, adekvatno obeležene (ime i prezime pacijenta, vrsta uzorka, broj protokola, datum i vreme uzorkovanja). U svakoj ustanovi prikupljeni uzorci su se čuvali u frižiderima na +4°C do momenta transporta, najviše do 7 dana. Uzorci su transportovani jednom nedeljno do mikološke laboratorije, Instituta za mikrobiologiju i imunologiju, Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu gde je vršena dalja obrada materijala.

3.4. Obrada uzoraka noktiju u mikološkoj laboratoriji

U mikološkoj laboratoriji uzorci noktiju su prvo usitnjavani u sterilnim uslovima, makazicama i skalpelom, kako bi se dobili dovoljno mali delovi noktiju koji su korišćeni za izvođenje laboratorijskih testova. Za svaki uzorak nokta urađeni su sledeći laboratorijski testovi u cilju otkrivanja uzročnog faktora onihomikoze:

3.4.1. Konvencionalna mikološka laboratorijska dijagnoza

Od svakog uzorka noktiju pravljene su dve vrste DMP i zasejavani su uzorci na 3 mikološke podloge:

3.4.1.1. Direktan mikroskopski preparat sa KOH

Fino usitnjeni delovi noktiju nanošeni su na predmetno staklo. Dodavana je po 1-2 kapi 10% rastvora kalijum hidroksida (KOH), a zatim su pokriveni pokrivnom ljušpicom. Preparati su zatim kratko zagrevani na plamenu i ostavljani u vlažnim uslovima 20 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon toga preparati su posmatrani pod svetlosnim mikroskopom na uveličanjima 100× i 400× u cilju otkrivanja gljivičnih elemenata.

3.4.1.2. Direktan mikroskopski preparat sa *Blankophor*-om

Na predmetno staklo nanošen je deo usitnjenog nokta. Dodavana je 1-2 kapi nespecifične fluorescentne boje *Blankophor* (Bayer, Leverkusen, Germany), a zatim stavljena pokrivna ljušpica. Preparati su ostavljani preko noći, u vlažnim uslovima, u frižideru na temperaturi +4°C. Sledećeg dana preparati su posmatrani pod fluorescentnim mikroskopom (ekscitacioni filter 330-380 nm, emisioni filter >420 nm) na uveličanjima 100× i 400×. Prisutni gljivični elementi fluoresciraju plavom svetlošću.

3.4.1.3. Kultivisanje na SDA

Za kultivisanje uzoraka noktiju korišćena je standardna mikološka podloga SDA. Dehidratirani SDA (Himedia, Mumbai, India) pripreman je prema uputstvima proizvođača. Pripremljena podloga razlivana je u male plastične Petri šolje (9 ml; 55 mm-dijametar) u laminarnoj komori za sterilan rad. Svaki uzorak noktiju zasejavan je na 2 SDA ploče u laminarnoj komori za sterilan rad. Zasejane podloge, stavljene u sterilne plastične vrećice, inkubirane su 3 nedelje (po potrebi i duže) na temperaturama 28°C i 37°C. Na ovoj podlozi omogućen je porast kvasnica i plesni, kako dermatofitnih tako i nedermatofitnih.

3.4.1.4. Kultivisanje na razblaženom SDA

Deo uzoraka noktiju od svakog pacijenta zasejavan je i na 2 ploče razblaženog SDA (RSDA) (*Takashio* agar). Zasejane podloge, stavljene u sterilne plastične vrećice, inkubirane su 3 nedelje (po potrebi i duže) na temperaturama 28°C i 37°C. Na ovoj podlozi omogućen je porast kvasnica i plesni, kako dermatofitnih tako i nedermatofitnih.

RSDA je pravljen prema sledećoj recepturi:

❖ Pepton	20,0 g
❖ Glukoza	10,0 g
❖ Magnezijum sulfat	1,0 g
❖ KH ₂ PO ₄	1,0 g
❖ Agar	20,0 g
❖ Destilovana voda	900ml

Napravljena podloga je autoklavirana 15 minuta na 121°C. Posle autoklaviranja, kada je medijumi ohlađen na oko 45-50°C, razlivan je u male, sterilne Petri šolje (9 ml; 55 mm-dijametar) u laminarnoj komori za sterilan rad. Nakon hlađenja i prelaska u čvrsto stanje, podloge su adekvatno obeležene i čuvane u frižideru na +4°C do momenta korišćenja, najduže do mesec dana (Takashio, 1972).

3.4.1.5. Kultivisanje na DTM

Deo svakog uzorka nokta zasejavan je, u laminarnoj komori za sterilan rad, i na selektivnoj podlozi za dermatofite. Korišćena je gotova, razlivena komercijalna podloga Dermatophyte agar (DTM) (Liofilchem, Roseto degli Abruzzi, Italy). Zasejane podloge, stavljene u sterilne plastične vrećice, inkubirane su 3 nedelje (po potrebi i duže) na temperaturi 28°C. Rast dermatofita na ovoj podlozi (u proseku za 3-7 dana), usled oslobađanja alkalnih metabolita, dovodi do promene boje podloge iz žute u crvenu (Slika 11).

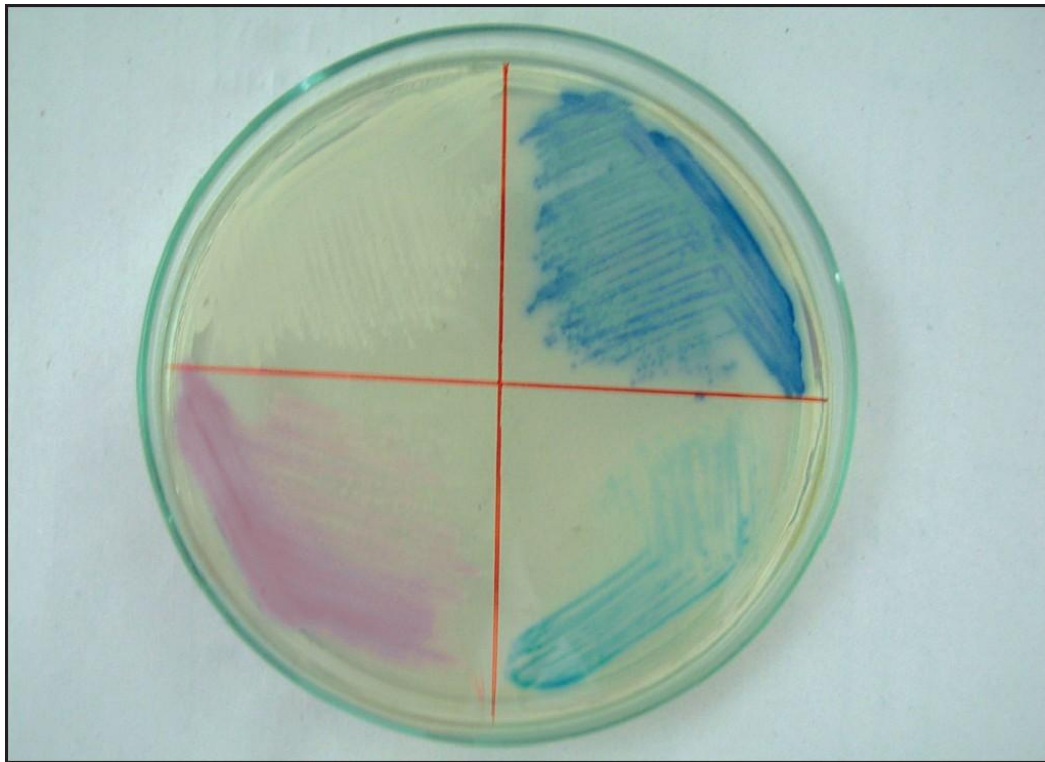


Slika 11. Dermatofit test medijum (DTM): žuta boja - nezasejan, b) crvena boja - porast gljive iz grupe dermatofita (laboratorija za parazitologiju i imunologiju).

3.4.1.6. Identifikacija izolovanih gljiva

Zasejane podloge (SDA, RSDA, DTM) kontrolisane su na nedeljnom nivou u cilju uočavanja rasta gljiva. Posle porasta gljiva na odgovarajućim podlogama pravljene su preparati sa kulture i identifikovane su gljive do nivoa roda, odnosno vrste na osnovu makroskopskih i mikroskopskih karakteristika (Hoog et al, 2000; Larone 1995). Podloge na kojima i posle četiri nedelje inkubacije nije došlo do porasta gljiva, smatrale su se negativnim. Ukoliko je na podlozi došlo do porasta dermatofita uzorak je smatran pozitivnim. U slučaju porasta kvasnica i nedermatofitnih plesni, uziman je nov uzorak nokta od pacijenta. Ukoliko je i u ponovljenom uzorku dobijena identična gljiva iz grupe kvasnica, odnosno nedermatofitnih plesni, uzorak je tada smatran pozitivnim. Za identifikaciju kvasnica do nivoa vrste korišćena je hromogena podloga CHROM agar (Himedia, Mumbai, India). Ova

podloga omogućava identifikaciju četiri najčešće vrste iz roda *Candida* na osnovu promene boje kolonija: *C. albicans* (zelena), *C. krusei* (ružičasta), *C. glabrata* (bež) i *C. tropicalis* (plava) (Slika 12). Za identifikaciju ostalih vrsta kvasnica korišten je komercijalni identifikacioni sistem API 20 C AUX (Biomerieux, Marcy L'Etoile, France).



Slika 12. *Candida* CHROM agar: zeleno – *C. albicans*, plavo – *C. tropicalis*, ružičasto – *C. krusei*, bež – *C. glabrata* (Nayak et al, 2012).

3.4.2. Tripsinizacija metodom po Xess-u

U cilju oslobađanja gljivičnih elemenata iz keratina, svaki uzorak nokta je tretiran tripsinom metodom po Xess-u (Xess et al, 2004).

Za izvođenje testa pripremljeni su 2% rastvor tripsina i 0,5% rastvor vitalne boje Neutral red (Merck, New York, USA) u fosfatnom puferu. Oba rastvora su u cilju sterilizacije propuštena kroz 0,22 μm membranske filtre. Pripremljeni rastvori su čuvani u frižideru na temperaturi +4°C do momenta korišćenja.

Deo uzorka nokta od svakog pacijenta stavljan je u Ependorff tube (1,5 ml) i prelivan sa 1 ml 2% rastvora tripsina. Nakon inkubacije od 2 sata na temperaturi od 37°C, uzorci su

centrifugirani (10 minuta na 1500 RPM). Posle centrifugiranja odlivan je supernatant i preko taloga dodato 300 µl fosfatnog pufera. Uzorci su kratko stavljeni na vorteks. Postupak ispiranja sa fosfatnim puferom ponovljen je još dva puta. Nakon poslednjeg ispiranja, dodavano je po konačnih 300 µl fosfatnog pufera u svaki uzorak nokta.

Za kultivisanje na ispitivanim mikološkim podlogama (SDA, RSDA, DTM) je korišteno 200 µl prethodno pripremljenog rastvora. Na svaku podlogu sterilnom pipetom su nanete po 3 kapi rastvora. Podloge su zatim inkubirane pod istim uslovima i interpretirane na isti način kao u prethodno opisanoj konvencionalnoj mikološkoj dijagnostici.

U preostalih 100 µl rastvora dodavano je 100 µl prethodno pripremljene 0,5% boje *Neutral red*. Ovako pripremljen rastvor inkubiran je na sobnoj temperaturi u trajanju od 1 časa. Nakon inkubacije 1-2 kapi rastvora je stavljana na predmetno staklo i prekrivana pokrivnom ljupticom. Preparati su posmatrani pod svetlosnim mikroskopom na uveličanjima 100× i 400× u cilju otkrivanja gljivičnih elemenata. Vijabilni gljivični elementi uočavaju se na preparatu kao crveno prebojeni, s obzirom da *Neutral red* ima sposobnost prolaska kroz intaktnu ćelijsku membranu i deponuje se u lizozomima živih ćelija. Nevijabilni gljivični elementi ostaju nebojeni.

3.4.3. Molekularna dijagnostika

Radi identifikovanja gljiva direktno u kliničkom materijalu PCR metodom svaki uzorak je testiran pomoću *Dermatophyte PCR* kita (Statens Serum Institut, Copenhagen, Denmark). Ovim testom moguće je identifikovati da li gljiva pripada grupi dermatofita (panfungalni marker) ili je u pitanju *T. rubrum* (specifični marker za *T. rubrum*) (Brillowska-Dabrowska et al, 2007). *Dermatophyte PCR* kit čuvan je u zamrzivaču na -20°C do datuma isteka valjanosti.

3.4.3.1. Izolacija DNK

Dermatophyte PCR kit je izvađen iz zamrzivača i ostavljen na sobnoj temperaturi da se otope reagensi. Ekstrakcija je rađena u laminarnoj komori za sterilan rad.

U plastične Ependorff tube od 1,5 ml stavljen je deo uzorka nokta svakog pacijenta. Dodato je po 100 µl ekstrakcionog pufera (60 mM/L NaHCO₃, 250 mM/L KCl i 50 mM Tris, pH 9,5). Nakon inkubacije na 95°C tokom 10 minuta u termostatu Dry block heating thermostat, BIO TDB-100 (Biosan, Riga, Latvia), odmah je dodavano po 100 µl anti-inhibicionog pufera (2% goveđi serumski albumin). Posle kratkog Vortex mešanja uzorci su spemljeni za PCR. Ovako pripremljeni uzorci čuvani su u frižideru na +4°C do momenta testiranja, najduže 10 dana.

3.4.3.2. PCR prajmeri

Primer mix sadži dva para prajmera usmerenih ka genima koji kodiraju hitin sintetazu 1 (CHS 1), za detekciju dermatofita uopšteno (panDerm 1 i panDerm 2) i sekvencu ITS2 (internal transcribed spacer), za detekciju *T. Rubrum* (uni i Trubrum-rev). Prajmeri su imali sledeće sekvence:

panDerm 1, 5'-GAAGAAGATTGTCGTTTGCATCGTCTC-3'

panDerm 2, 5'-CTCGAGGTCAAAAGCACGCCAGAG-3'

uni: 5'-TCTTTGAACGCACATTGCGCC-3'

Trubrum-rev, 5'-CGGTCCTGAGGGCGCTGAA-3'

PCR proizvod za detekciju dermatofita uopšteno bio je dug oko 366 baznih parova (bp), a za detekciju *T. rubrum* oko 203 bp.

Takođe jedna interna plazmidska kontrola koja služi kao matrica za *T. rubrum* specifične prajmere je dodata u *Primer mix*. Njen PCR proizvod bio je dug oko 660 bp.

3.4.3.3. Priprema *Master mix-a*

Master mix je pripreman u laminarnoj komori za sterilan rad. U plastičnu Ependorff tubu od 1,5 ml dodavan je *PCR Ready mix* (po 10 µl za svaki uzorak nokta, odnosno svaku kontrolu) i *Primer mix* (po 8 µl za svaki uzorak nokta, odnosno svaku kontrolu). Za svako izvođenje PCR reakcije koristili smo 3 kontrole: pozitivne *T. rubrum* i pan-derm, kao negativnu kontrolu.

U Ependorff tube od 0,2 ml pipetirano je po 18 μ l prethodno pripremljenog *Master mix*. Do krajnjeg volumena od 20 μ l, dodato je po 2 μ l supernatanta iz prethodno pripremljenih uzoraka noktiju svakog pacijenta u odgovarajuće tube. U tube namenjene za pozitivne kontrole dodato je 2 μ l *T. rubrum* DNK (u *T. rubrum* kontrolu), odnosno 2 μ l pan-derm DNK (u pan-derm kontrolu). U negativnu kontrolu dodato je po 1 μ l ekstrakcionog i anti-inhibicionog pufera.

3.4.3.4. Reakcija lančanog umnožavanja – PCR

Prethodno pripremljene Ependorff tube od 0,2 ml, u kojim su bile reakcione smeše sa DNK, pažljivo su zatvorene u cilju sprečavanja isparavanja i postavljane su u termoblok aparata Multigene (Labnet International, New York, USA). Reakcija se odvijala pod sledećim uslovima: prvih 5 minuta smeše su izlagane temperaturi od 94°C, namenjenoj za inicijalnu denaturaciju DNK; potom je sledio niz od 45 temperaturnih ciklusa koji su se sastojali od denaturacije DNK na temperaturi od 94°C u trajanju od 30 sekundi, 60°C za vezivanje parjmerna za matricu (annealing) u trajanju od 30 sekundi i 72°C u trajanju od 30 sekundi za elongaciju. Na kraju finalna elongacija je vršena na temperaturi od 72°C u trajanju od 3 minuta.

Uzorci sa umnoženom DNK mogu se čuvati u frižideru na +4°C do 7 dana, dok je za duže čuvanje neophodno obezbediti -20°C.

3.4.3.5. Elektroforeza i vizuelizacija produkata reakcije lančanog umnožavanja

Radi vizuelizacije proizvoda reakcije lančanog umnožavanja vršena je elektroforeza istih u 2% agaroznom gelu.

Agarozni gel 2%:

- ❖ agaroza 2,0 g
- ❖ TBE 100,0 ml

Rastvor je nalivan između ploča za elektroforezu, postavljen je češalj i ostavljen da polimerizuje. Nakon polimerizacije gel je postavljen u sistem za horizontalnu elektroforezu, a uzorci su mešani sa puferom za elektroforezu i ulivani u bunarčiće gela. Elektroforeza se odvijala pri naponu od 120 V i jačini struje od 200 mA u trajanju od 45 minuta, nakon čega je sledilo bojenje gela etidijum bromidom i vršena je vizuelizacija uzoraka osvetljavanjem gela UV svetlošću.

Veličina nastalog DNK produkta je poređena sa veličinom DNK fragmenta u markeru (100 bp DNA ladder, Invitrogen). Sve PCR reakcije izvođene su u prisustvu interne kontrole. Pozitivan uzorak nokta na *T. Rubrum* imao je jaku liniju na 203 bp i slabiju ili bez linije na 366 bp zbog relativno većeg broja kopija ITS2 u poređenju sa CHS1. Slično, pozitivan uzorak nokta na dermatofite nije uopšte imao ili je pak imao slabu liniju interne kontrole. Negativni uzorci bez interne kontrole smatrani su inhibiranim. Takvi uzorci su dvostruko razblaživani i ponavljan je PCR. Nakon toga uzorak je označavan kao pozitivan, negativan ili inhibiran.

3.5. Kriterijum za postavljanje dijagnoze onihomikoze

Kriterijum za postavljanje dijagnoze onihomikoze podrazumevao je postojanje jasne kliničke sumnje na onihomikozu (najmanje jedan od navedenih parametara: promena boje nokta, postojanje zadebljanja, pojava oniholize, promena kvaliteta nokta, potpuna distrofija nokatne ploče) uz pozitivnost bilo kog primenjenog laboratorijskog testa (Lawry et al, 2000). Na osnovu laboratorijske dijagnoze ispitanici su podeljeni u dve grupe: osobe sa laboratorijski potvrđenom dijagnozom onihomikoze (bez obzira na vrstu testa) i pacijenti bez ovog oboljenja, u cilju identifikacije faktora rizika za nastajanje onihomikoze.

3.6. Određivanje SCIO indeksa

Kod svakog pacijenta određivan je SCIO indeks na osnovu kliničkog tipa onikomikoze, uzrasta pacijenta, stepena zahvaćenosti nokta, lokalizacije i stepena zadebljanja nokatne ploče (Sergeev et al, 2002). Pre izračunavanja SCIO indeksa neophodno je prethodno odrediti klinički indeks onihomikoze (engl. *Clinical Index Component* - CIC) kod pacijenta na osnovu:

1. kliničkog oblika onihomikoze (DLSO, PSO i SBO)
2. stepena zahvaćenosti nokatne ploče
3. stepena zadebljanja nokta

	I stepen	II stepen	III stepen
Klinički oblik (f)	DLSO	SBO	PSO
Stepen zahvaćenosti nokta (d)	< 1/3	1/3 – 2/3	> 2/3
Stepen zadebljanja nokta (h)	nema ili < 1 mm	1 – 2 mm	> 2 mm

Prethodne vrednosti su zatim unete u formulu:

$$CIC = [(d/3)^{3-f} (f + h (3 - f))]^{1 - [(2-f)(3-f)/2]}$$

Na osnovu ove formule vrednosti za SBO je 1, za PSO 3, a za DLSO 1 - 5.

Da bi se konačno odredio SCIO indeks pored CIC moraju se uzeti u obzir i komponenta rasta koja zavisi prevashodno od lokalizacije onihomikoze (noga ili ruka, kao i koji prst) kao i od uzrasta pacijenta. Komponenta rasta nam najpribližnije određuje koliko je potrebno vremena noktu da potpuno izraste što nam je od presudnog značaja za izbor najadekvatnijeg terapijskog pristupa.

	I stepen	II stepen	III stepen
Lokalizacija (L)	II – V prst na ruci	Palac na ruci ili II – V prst na nozi	Palac na nozi
Uzrast pacijenta (a)	<25	25 – 60	> 60

Uvođenjem CIC i komponenata rasta u sledeću formulu računat je SCIO indeks:

$$\text{SCIO} = [(d/3)^{3-f} (f + h (3 - f)) (L) (a + 3)/3]^{1 - [(2-f)(3-f)/2]}$$

Vrednosti SCIO indeksa kreću se od 1 – 30.

3.7. Statistička analiza

U statističkoj obradi prikupljenih podataka primenjene su univarijantna logistička regresiona analiza (ULRA) i multivarijantna logistička regresiona analiza (MLRA). U MLRA ušle su sve one varijable koje su prema rezultatima ULRA bile povezane sa onihomikozom na nivou verovatnoće $\leq 0,10$.

Statistička analiza značajnosti uočenih razlika među dobijenim vrednostima vršena je primenom χ^2 testa. Vrednost parametra p manja od 0,05 je smatrana statistički značajnom. U kompjuterskoj obradi podataka korišćen je SPSS program verzija 15.

Osim toga, određivana je i osetljivost (engl. sensitivity – Sn) i specifičnost (engl. specificity – Sp), kao i pozitivna prediktivna vrednost (PPV) i negativna prediktivna vrednost (NPV) svih primenjenih laboratorijskih testova, kao i njihovih kombinacija. Takođe, za svaki ispitivani test određivan je pozitivni faktor verovatnoće LR+ (engl. positive likelihood ratio), negativni faktor verovatnoće LR- (engl. negative likelihood ratio), kao i dijagnostički unakrsni odnos (DUO). U cilju određivanja navedenih dijagnostičkih karakteristika ispitivanih testova, za zlatni standard je korišćena metoda sa najvišim stepenom pozitivnosti.

Odnos između osetljivosti i specifičnosti ispitivanih metoda za laboratorijsku potvrdu onihomikoza predstavljena je pomoću ROC (engl. Receiver Operator Characteristics) krive.

Rezultati

4. Rezultati

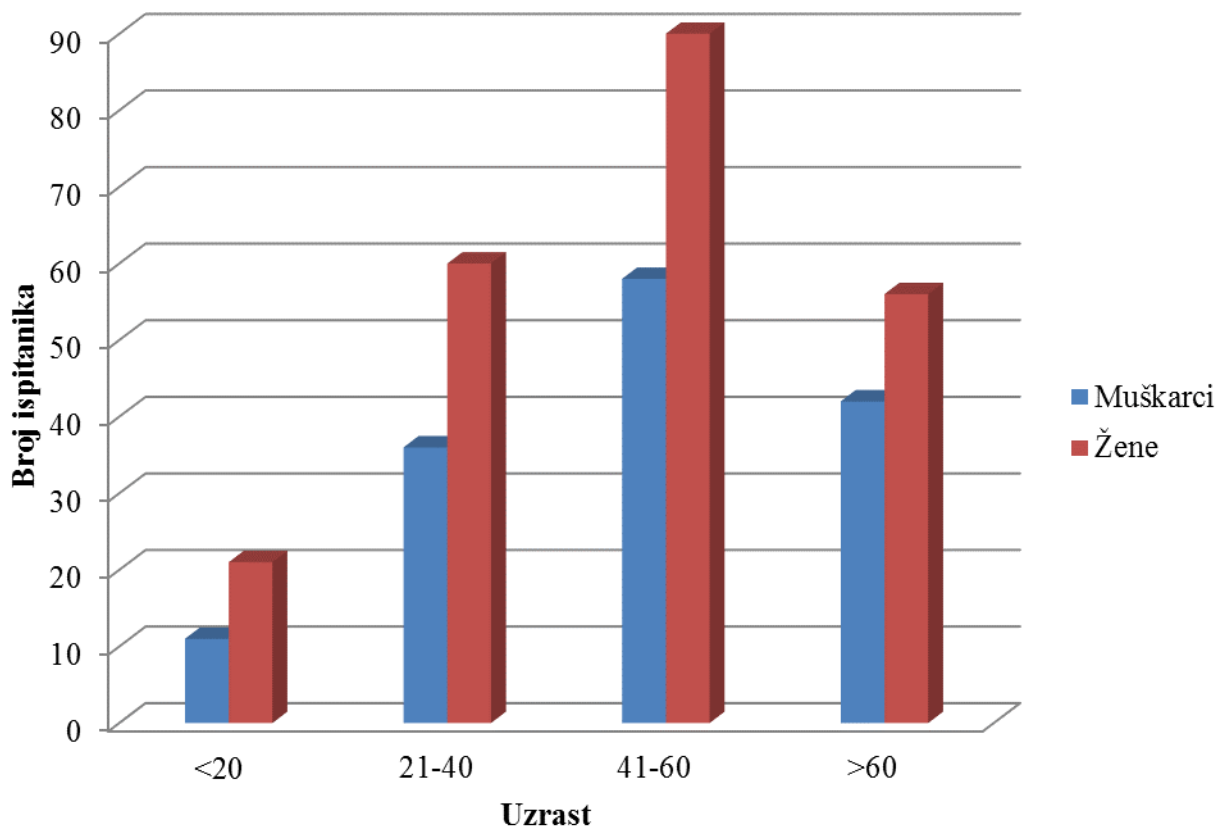
4.1. Karakteristike osoba sa sumnjom na onihomikozu

4.1.1. Demografske karakteristike osoba sa sumnjom na onihomikozu



Slika13. Distribucija pacijenata sa sumnjom na onihomikozu u odnosu na mesto stalnog boravka.

U odnosu na mesto stalnog boravka, ispitanici su bili iz različitih regiona Srbije, pokrivajući gotovo čitavu teritoriju. Od 374 ispitanika iz 25 gradskih opština, najveći broj je poticao iz Beograda 19,79%. Sa područja Vojvodine (6 gradskih opština) je bilo 25,13%, dok je 55,08% ispitanika poticalo iz centralnih i južnih delova Srbije (18 gradskih opština) (Slika13).

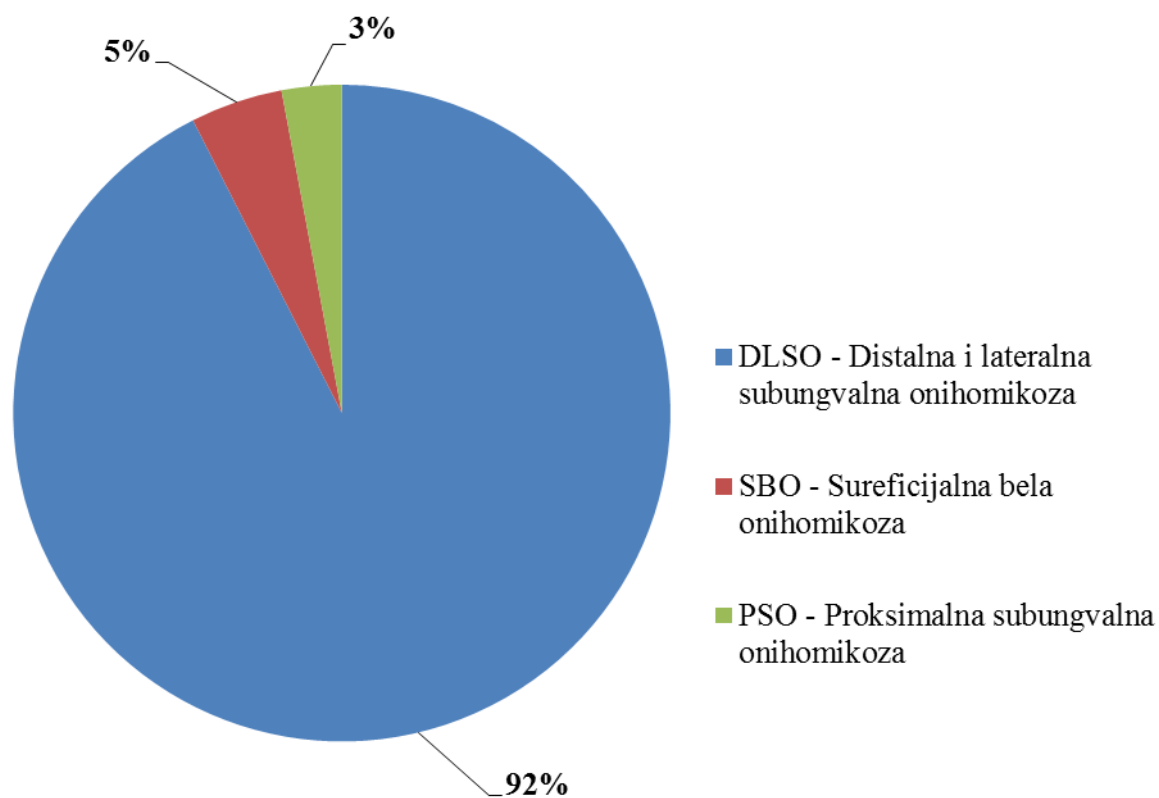


Grafikon 1. Pol i uzrast osoba sa sumnjom na onihomikozu

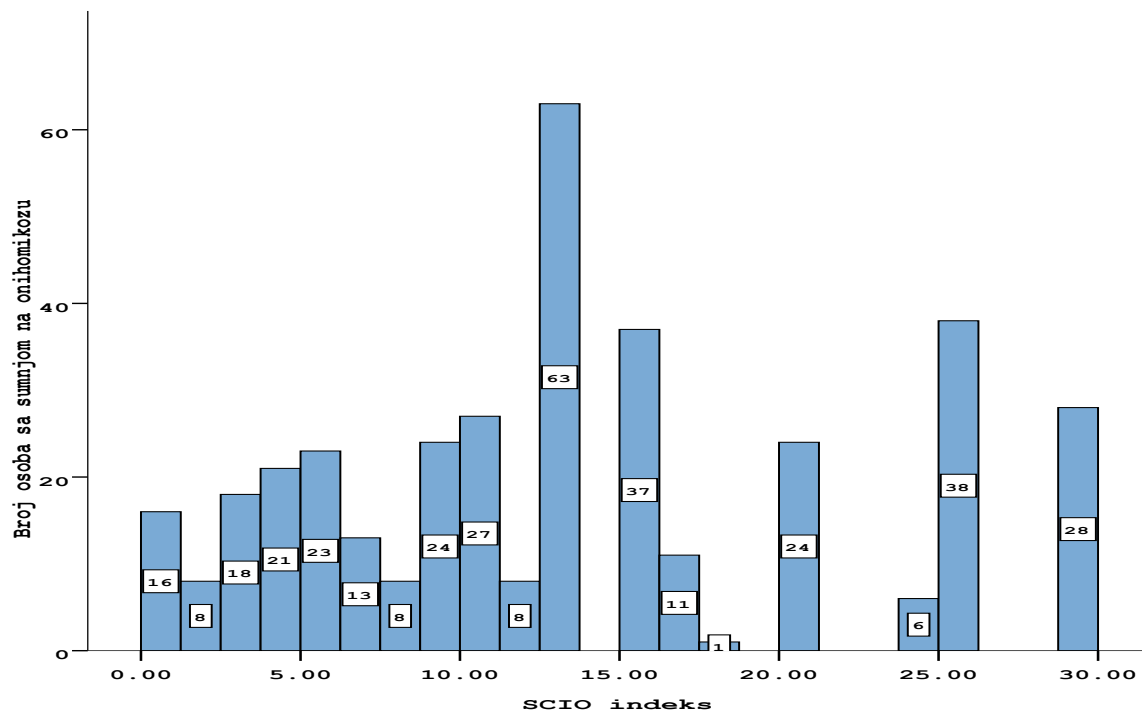
Od 374 osobe sa sumnjom na onihomikozu 227 (60,7%) su činile žene, a 147 (39,3%) muškarci. Prosečna starost žena iznosila je $46,94 \pm 18,99$ godina (opseg godina 4 - 89), a muškaraca $49,44 \pm 18,99$ (opseg godina 2 - 85) (Grafikon 1).

4.1.2. Kliničke karakteristike osoba sa sumnjom na onihomikozu

Najčešći klinički tip onihomikoze kod naših pacijenata je bio DLSO, nađen kod 92,51% pacijenata (Grafikon 2).



Grafikon 2. Zastupljenost pojedinih kliničkih tipova onihomikoze kod pacijenata sa sumnjom na onihomikozu.



Grafikon 3. Histogram frekvencija vrednosti SCIO indeksa kod osoba sa sumnjom na onihomikozu.

Srednja vrednost SCIO indeksa kod pacijenata sa sumnjom na onihomikozu iznosila je $13,56 \pm 8,23$. Najveći broj pacijenata, njih 63, imalo je vrednost indeksa 13,33 (Grafikon 3).

Na osnovu vrednosti SCIO indeksa 178 (47,59%) pacijenata je indicovano za sistemska terapija, 97 (25,94%) za kombinovanu terapiju, dok je kod 99 (26,47%) dovoljno primeniti lokalnu antimikotičnu terapiju.

Kod 111 (29,68%) pacijenata sa sumnjom na onihomikozu vrednosti SCIO indeksa su iznosile 13 - 16 što odgovara primeni sistemske terapije primenom terapijskih protokola preporučenih za nokte na rukama. Kod 72 (19,25%) pacijenta promene na noktima su imale vrednosti SCIO indeksa 21-30 što je indicacija za hemijsku avulziju nokta praćenu sistemskom antimikotičnom terapijom (Tabela 5).

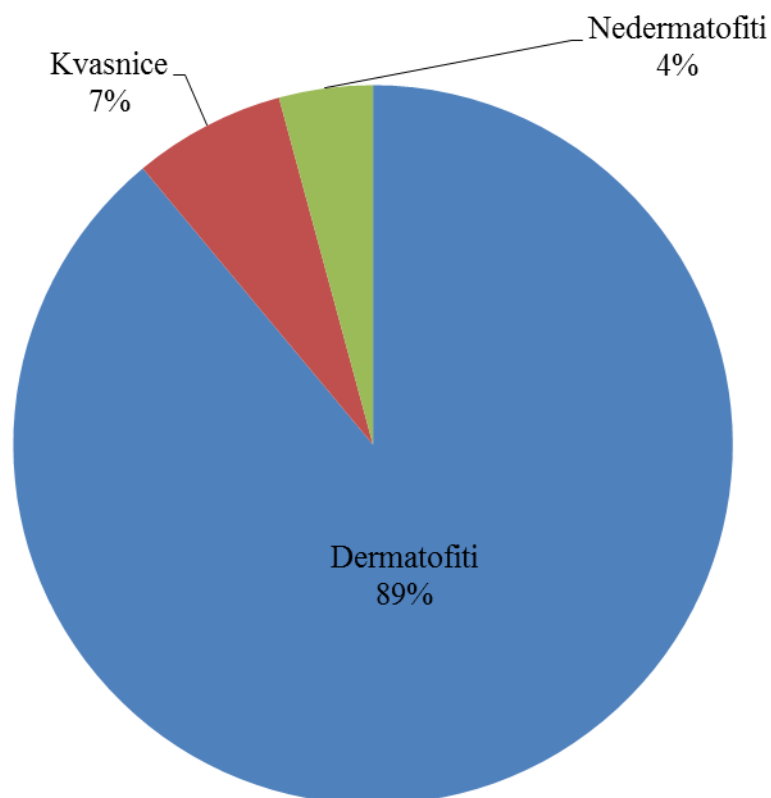
Tabela 5. Distribucija pacijenata sa sumnjom na onihomikozu u zavisnosti od vrednosti SCIO indeksa.

SCIO indeks	Terapijski pristup	Broj pacijenata
LOKLALNA TERAPIJA		
1 – 3	Maksimalno ukloniti zahvaćene delove nokta. Aplikovati antimikotike sve dok potpuno ne izraste zdrav nokat.	42
4 – 6	Uspeh terapije zavisi često od brzine rasta nokta. Preporučuje se sistemska terapija kod noktiju koji sporije rastu ili kod PSO.	57
SISTEMSKA TERAPIJA		
7 – 9	Koristiti terapijske protokole preporučene za nokte na rukama (npr. Itrakonazol: pulsna terapija 2 × 200 mg 2 × dan).	32
10 – 12	Koristiti terapijske protokole preporučene za nokte na nogama (npr. Itrakonazol: pulsna terapija 3 × 200 mg 2 × dan).	35
13 – 16	Koristiti produžene terapijske protokole sa bilo kojim antimikotikom (npr. Itrakonazol: pulsna terapija 4-5 × 200 mg 2 × dan).	111
KOMBINOVANA TERAPIJA		
17 – 20	Sistemički antimikotik + topikalna terapija. Preporučuje se adekvatan keratinolitički tretman.	25
21 - 30	Preporučuje se avulzija nokta (npr. urea pastom), a zatim nastaviti sa sistemskom terapijom.	72

4.2. Učestalost javljanja i najčešći izazivači onihomikoza

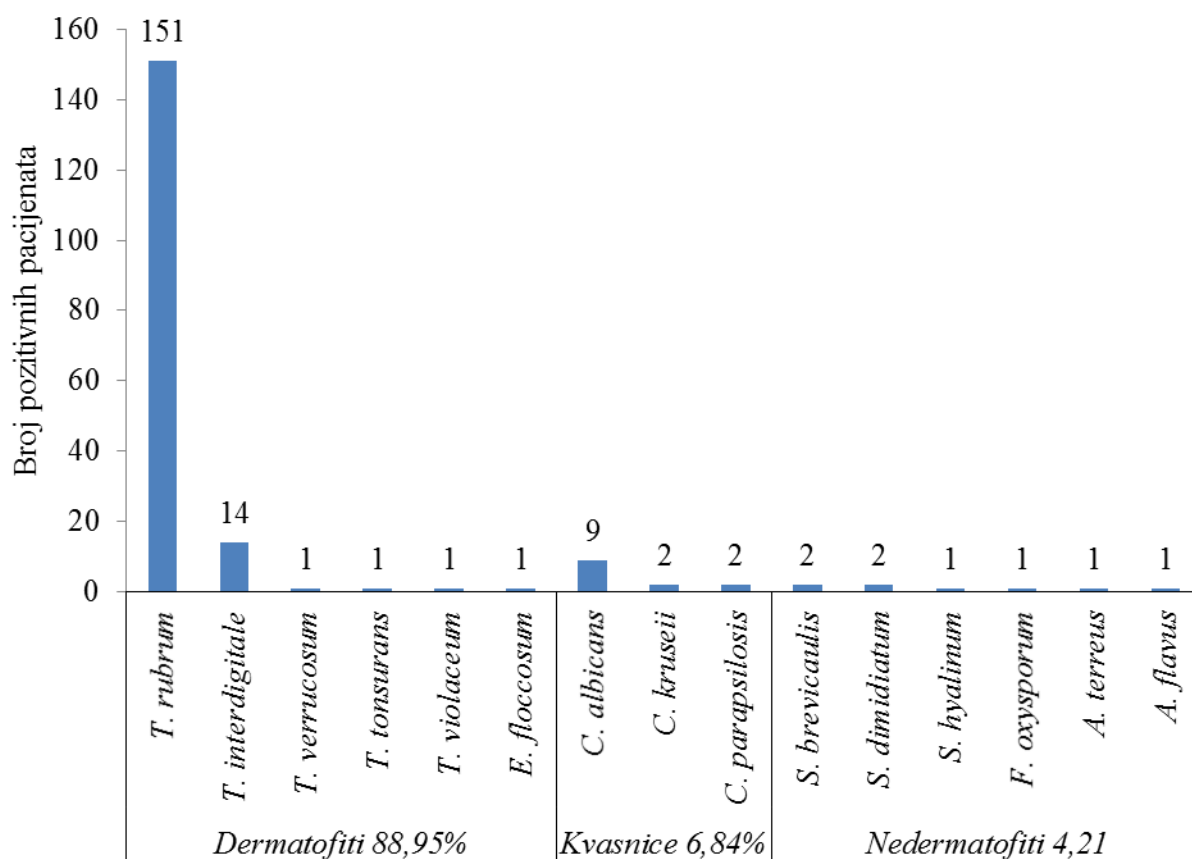
Od ukupno 374 pacijenata sa sumnjom na onihomikozu, oboljenje je potvrđeno laboratorijskim testovima kod 190 (50,8%). Pacijenti su smatrani pozitivnim ukoliko je onihomikoza potvrđena bilo kojim od primenjenih laboratorijskih testova (direktan mikroskopski preparat, kultivisanje, PCR).

Najčešći izazivači onihomikoze kod naših pacijenata su bili dermatofiti kod čak 88,95% pozitivnih pacijenata (Grafikon 4).



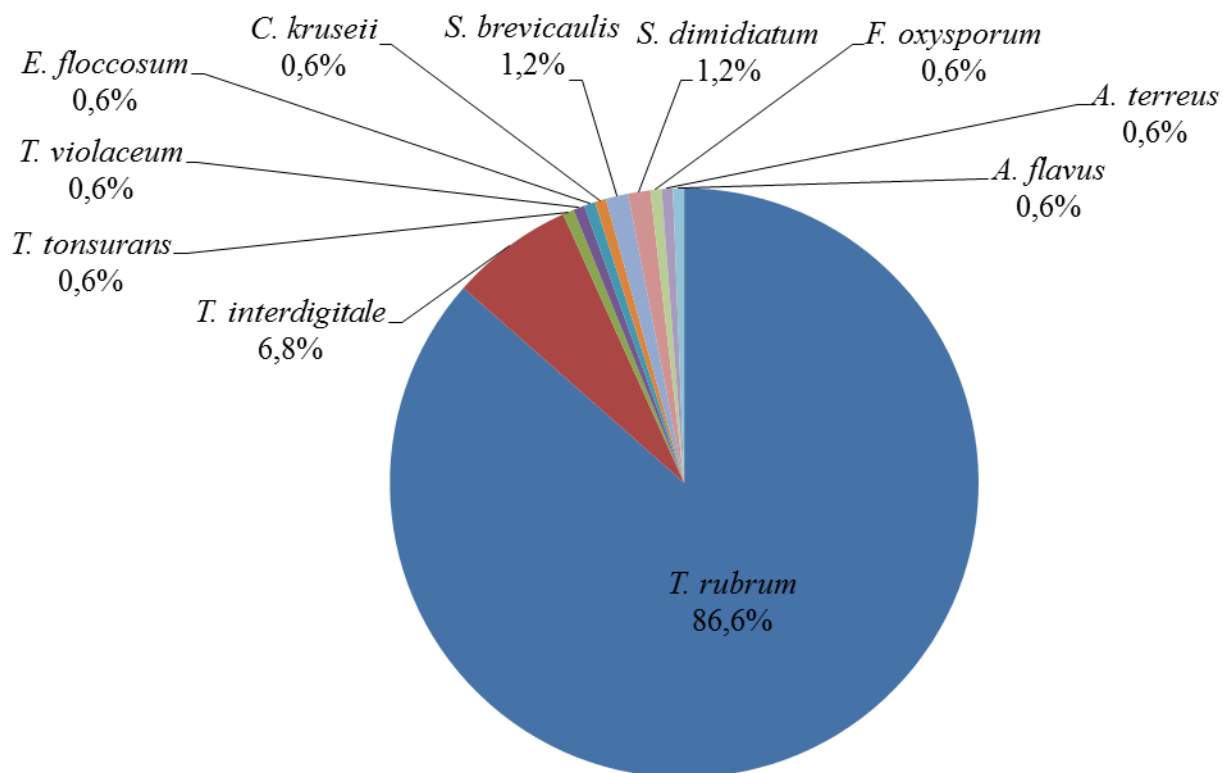
Grafikon 4. Zastupljenost pojedinih grupa gljiva kod pacijenata sa onihomikozom.

U grupi dermatofita najčešći je bio *T. rubrum* (89,35%), a zatim *T. interdigitale* (8,28%). Kod 13 pacijenata (6,84%) kvasnice su identifikovane kao uzročnici onihomikoza, od kojih je kod devetoro *C. albicans* bila uzročni faktor. Nedermatofitne plesni su izolovane kod 8 (4,21%) pacijenata, a među njima najčešći izolati su bili *Scopulariopsis brevicaulis* i *Scytalidium dimidiatum* izolovani kod po 2 pacijenta. Prikaz svih izazivača dat je na Grafikonu 5.



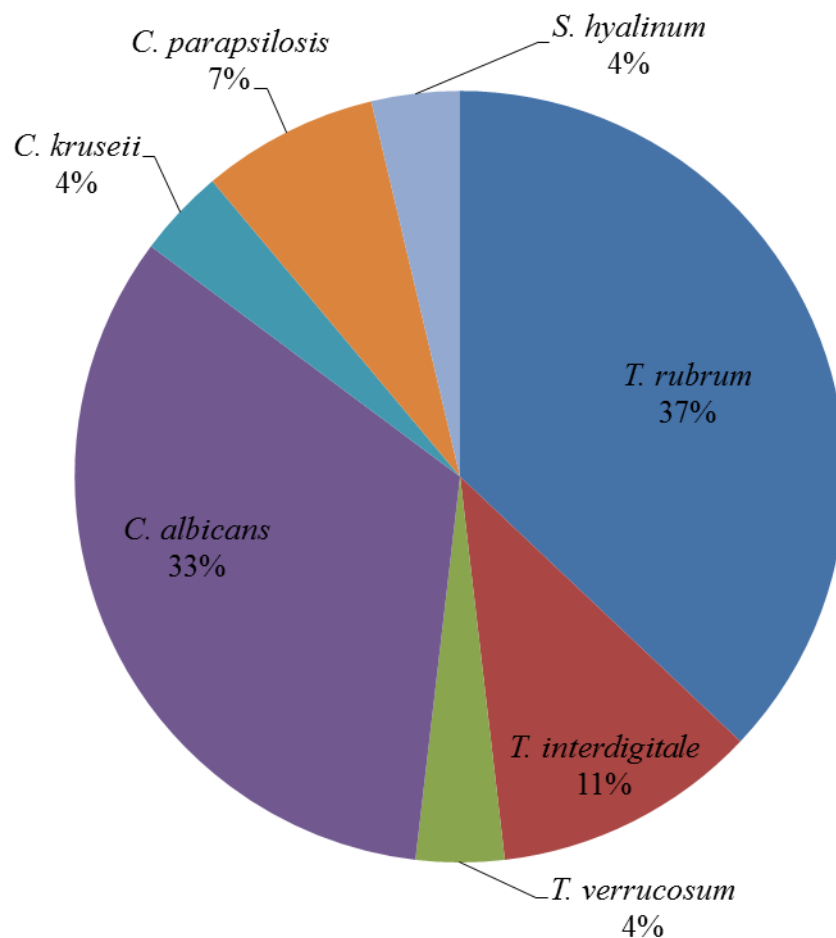
Grafikon 5. Prikaz svih izazivača onihomikoza kod 190 pacijenata sa laboratorijski potvrđenom dijagnozom onihomikoze.

Od 190 pozitivnih pacijenata, 163 (85,8%) su imali onihomikozu na noktima na nogama (Grafikon 6). Među njima, 16 pacijenata su istovremeno imali onihomikozu i na noktima na rukama. Izazivači onihomikoze na noktima na nogama su bili dermatofiti kod 95,1% pacijenata. Najzastupljeniji je bio *T. rubrum* potvrđen kod 141/163 (86,6%), zatim *T. interdigitale* u 6,8%. Od nedermatofitnih plesni najčešći su bili *Scopulariopsis brevicaulis* (1,2%) i *Scytalidium dimidiatum* (1,2%), dok su ostale vrste izuzetno retko izolovane. Kada su u pitanju kvasnice, kod jednog pacijenta je izolovana *C. krusei* (0,6%) kao izazivač onihomikoze na noktima na nogama.



Grafikon 6. Prikaz izazivača kod pacijenata sa laboratorijski potvrđenom onihomikozom na noktima na nogama.

Onihomikoza samo na noktima na rukama potvrđena je kod 27/190 (14,2%) pacijenata. Dermatofiti su i na noktima na rukama bili najzastupljeniji, potvrđeni laboratorijskim metodama kod 52% pacijenata. Kod 37% je potvrđen *T. rubrum*, zatim *T. interdigitale* (11%) i *T. verrucosum* (4%). Kvasnice su potvrđene kod 13/27 (44%). Od njih najzastupljenija je bila *C. albicans* (9/13; 69%). Od nedermatofitnih plesni, samo kod jednog pacijenta je izolovan *S. hyalinum* (4%) kao izazivač onihomikoze na noktima na rukama (Grafikon 7).



Grafikon 7. Prikaz izazivača kod pacijenata sa laboratorijski potvrđenom onihomikozom na noktima na rukama.

4.3. Validnost različitih laboratorijskih metoda za dijagnozu onihomikoza

Kod 184 (49,2%) ispitanika nijedan od primenjenih laboratorijskih testova nije bio pozitivan. Od 190 pozitivnih pacijenata kod 24 (12,63%) svi primenjeni laboratorijski testovi su bili pozitivni.

Kod najvećeg procenta ispitanika (37,37%) laboratorijska dijagnoza onihomikoze je postavljena kombinacijom sve 3 grupe ispitivanih testova DMP, kultivisanje i PCR gde je barem jedan od testova u svakoj grupi bio pozitivan (Tabela 6).

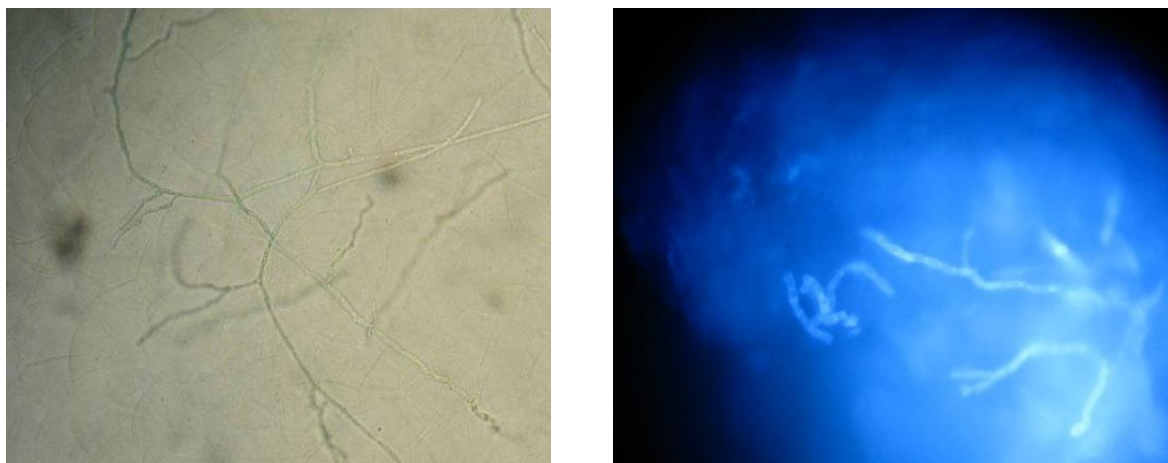
Tabela 6. Prikaz ispitanika sa laboratorijski potvrđenom dijagnozom onihomikoze u zavisnosti od načina postavljanja dijagnoze onihomikoze.

Način postavljanja dijagnoze OM	Br. pozitivnih pacijenata (n=190)	Procenat (%)
DMP + Kultivisanje + PCR	71	37,37
KOH, BP, SDA, RSDA, DTM, PCR	24	
KOH, BP, RSDA, DTM, PCR	7	
KOH, SDA, RSDA, DTM, PCR	2	
BP, SDA, RSDA, DTM, PCR	12	
KOH, BP, DTM, PCR	6	
KOH, RSDA, DTM i PCR	2	
BP, SDA, RSDA i PCR	1	
BP, SDA, DTM, PCR	1	
BP, RSDA, DTM, PCR	9	
BP, SDA, PCR	1	
BP, RSDA, PCR	4	
BP, DTM i PCR	2	
DMP + Kultivisanje	12	6,32
KOH, BP, SDA, RSDA	6	
BP, SDA, RSDA	3	
BP i RSDA	2	
KOH, BP i SDA	1	
DMP + PCR	40	21,05
KOH i BP i PCR	24	
KOH i PCR	2	
BP i PCR	14	
Kultivisanje + PCR	19	10,00
SDA, RSDA, DTM i PCR	2	
SDA, RSDA, PCR	4	
SDA, DTM i PCR	2	
RSDA, DTM, PCR	7	
DTM i PCR	4	
Samo DMP	7	3,68

KOH i BP	4	
BP	3	
Samo Kultivisanje	3	1,58
SDA i RSDA	2	
RSDA	1	
Samo PCR	38	20,00

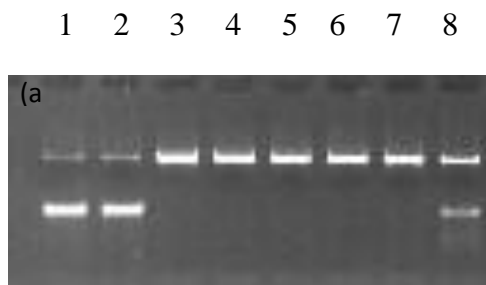
OM – onihomikoza; KOH – 10% Kalijum hidroksid; BP – Blankophor; SDA – Sabouraud dekstrozni agar; RSDA – razblaženi Sabouraud dekstrozni agar; DTM – dermatofit test medijum; PCR –rekcija lančanog umnožavanja

DMP omogućavaju vizualizaciju eventualno prisutnih gljivičnih elemenata (hifa, pseudohifa, artrokonidija, blastospora) (Slika 14). DMP sa KOH je bio pozitivan kod 20,86% pacijenata sa sumnjom na onihomikozu, odnosno kod 41,05% (78/190) pacijenata sa laboratorijski potvrđenom dijagnozom onihomikoze. Senzitivnost DMP je znatno povećana u preparatu sa BP koji je bio pozitivan kod 33,42% pacijenata sa sumnjom na onihomikozu, odnosno kod 65,79% (125/190) pacijenata sa laboratorijski potvrđenom onihomikozom (Tabele 7 i 8).

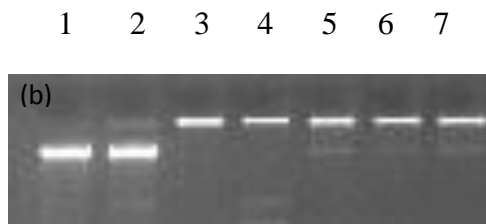


Slika 14. Direktni mikroskopski preparati uzorka nokta: (a) preparat sa 10% Kalijum hidroksidom; (b) preparat sa Blankophor.

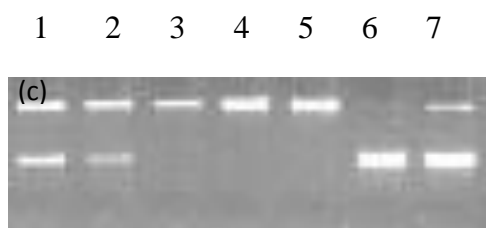
Oko petina ispitanika (21,05%) imao je pozitivan PCR u kombinaciji sa barem jednim DMP (KOH i/ili BP), dok je kod čak 20% ispitanika dijagnoza onihomikoze postavljena samo na osnovu PCR (Tabele 7 i 8) (Slika 15).



Interna kontrola (~600 bp)
T. rubrum (~203 bp)



Interna kontrola (~600 bp)
 Panderrmatofitni marker (~366 bp)



Interna kontrola (~600 bp)
T. interdigitale (~271 bp)

Slika 15. Elektroforeza u agaroznom gelu umnoženih PCR produkata iz kliničkih uzoraka noktiju pacijenata sa sumnjom na onihomikozu. (a) Linije 1-2: pozitivne kontrole (*T. rubrum*), linije 3-4: negativne kontrole, linije 5-7: negativni uzorci pacijenata, linija 8: pozitivni uzorak pacjenta; (b) Linije 1-2: pozitivne kontrole (panderrmatofitni marker), linije 3-4: negativne kontrole, linije 5-7: pozitivni uzorci pacijenata; (c) Linije 1-2: pozitivne kontrole (*T. interdigitale*), linije 3-4: negativne kontrole, linija 5: negativni uzorak pacijenta, linije 6-7: pozitivni uzorci pacijenata.

Tabela 7. Stepen pozitivnosti pojedinačnih i kombinacija testova za dijagnozu onihomikoza u odnosu na lokalizaciju oboljenja.

Laboratorijski metod	Stepen pozitivnosti		
	Svi pacijenti (n=374) % (broj/n)	OM na nozi (n=321) % (broj/n)	OM na ruci (n=53) % (broj/n)
KOH	20,86 (78/374)	21,18 (68/321)	18,87 (10/53)
BP	33,42 (125/374)	32,71 (105/321)	37,74 (20/53)
SDA	16,31 (61/374)	15,88 (51/321)	18,87 (10/53)
RSDA	23,53 (88/374)	23,05 (74/321)	26,41 (14/53)
DTM	21,39 (80/374)	24,30 (78/321)	3,77 (2/53)
KOH i SDA*	28,88 (108/374)	28,35 (91/321)	32,07 (17/53)
KOH i RSDA*	33,69 (126/374)	32,71 (105/321)	39,62 (21/53)
KOH i DTM*	31,55 (118/374)	33,33 (107/321)	20,75 (11/53)
BP i SDA*	36,63 (137/374)	35,51 (114/321)	43,40 (23/53)
BP i RSDA*	38,50 (144/374)	37,69 (121/321)	43,40 (23/53)
BP i DTM*	38,23 (143/374)	38,32 (123/321)	37,74 (20/53)
PCR	44,92 (168/374)	48,29 (155/321)	24,53 (13/53)

OM – onihomikoza; KOH – 10% Kalijum hidroksid; BP – Blankophor; SDA – Sabouraud dekstrozni agar; RSDA – razblaženi Sabouraud dekstrozni agar; DTM – dermatofit test medijum; PCR – reakcija lančanog umnožavanja; *u kombinacijama testova pacijent je smatran pozitivnim ukoliko je barem jedan od testova imao pozitivnu vrednost

Na Tabeli 7 prikazan je stepen pozitivnosti svih ispitivanih laboratorijskih metoda za dijagnozu onihomikoza. Kada su u pitanju kombinacije testova, pacijent je smatran pozitivnim ukoliko je barem jedan od testova bio pozitivan. Najmanje pozitivnih pacijenata je detektovano upotrebom SDA (16,31%), a najviše uz pomoć PCR (44,92%).

Slična je situacija bila i ako posmatramo samo pacijente sa onihomikozom na noktima na nogama (SDA 15,88%; PCR 48,29%). Za dalja računanja validnosti korišćenih laboratorijskih metoda na noktima na nogama odabrali smo PCR metodu kao zlatni standard.

Kod onihomikoze lokalizovane na noktima na rukama, DTM je bio pozitivan kod samo 2 pacijenta (3,77%), dok je najviše pozitivnih pacijenata detektovano *Blankophor*-om u kombinaciji sa RSDA ili SDA (43,40%). Imajući u vidu da su obe navedene kombinacije dale

iste rezultate, a s obzirom da je kombinacija sa RSDA dala nešto bolje rezultate na noktima na nogama kao i kada posmatramo sve pacijente zajedno, za dalja računanja validnosti korišćenih laboratorijskih metoda na noktima na rukama odabrali smo kombinaciju BP i/ili RSDA kao zlatni standard.

Tabela 8. Stepen pozitivnosti pojedinačnih i kombinacija testova za dijagnozu onihomikoza kod 190 pacijenata sa laboratorijski potvrđenom dijagnozom onihomikoze u zavisnosti od vrste identifikovane gljive.

Laboratorijski metod	Stepen pozitivnosti			
	Ukupno (n=190) % (broj/n)	Dermatofiti (n=169) % (broj/n)	Kvasnice (n=13) % (broj/n)	Nedermatofiti (n=8) % (broj/n)
KOH	41,05 (78/190)	37,87 (64/169)	69,23 (9/13)	62,50 (5/8)
BP	65,79 (125/190)	63,31 (107/169)	84,61 (11/13)	87,50(7/8)
SDA	32,10 (61/190)	28,40 (48/169)	61,54 (8/13)	62,50 (5/8)
RSDA	46,32 (88/190)	40,83 (69/169)	92,31(12/13)	87,50 (7/8)
DTM	42,10 (80/190)	47,34 (80/169)	0,00 (0/13)	0,00 (0/8)
KOH i SDA*	56,84 (108/190)	53,85 (91/169)	84,61 (11/13)	75,00 (6/8)
KOH i RSDA*	66,32 (126/190)	63,31 (107/169)	92,31 (12/13)	87,50 (7/8)
KOH i DTM*	62,10 (118/190)	61,54 (104/169)	69,23 (9/13)	62,50 (5/8)
BP i SDA*	72,10 (137/190)	69,82 (118/169)	92,31 (12/13)	87,50 (7/8)
BP i RSDA*	75,79 (144/190)	72,78 (123/169)	100,00 (13/13)	100,00 (8/8)
BP i DTM*	75,26 (143/190)	73,96 (125/169)	84,61 (11/13)	87,50 (7/8)
PCR	88,42 (168/190)	99,41 (168/169)	0,00 (0/13)	0,00 (0/8)

OM – onihomikoza; KOH – 10% Kalijum hidroksid; BP – Blankophor; SDA – Sabouraud dekstrozni agar; RSDA – razblaženi Sabouraud dekstrozni agar; DTM – dermatofit test medijum; PCR – reakcija lančanog umnožavanja; *u kombinacijama testova pacijent je smatran pozitivnim ukoliko je barem jedan od testova imao pozitivnu vrednost

U dijagnozi onihomikoze izazvane kvasnicama i nedermatofitnim plesnima najveći stepen pozitivnosti pokazala je kombinacija BP i RSDA (100%), dok nijedan uzorak nije bio pozitivan na DTM ili na PCR (0%). Kod 99,41% gljiva iz grupe dermatofita PCR je bio

pozitivan, dok je najmanji stepen pozitivnosti dobijen kultivisanjem ovih gljiva na SDA podlozi (Tabela 8).

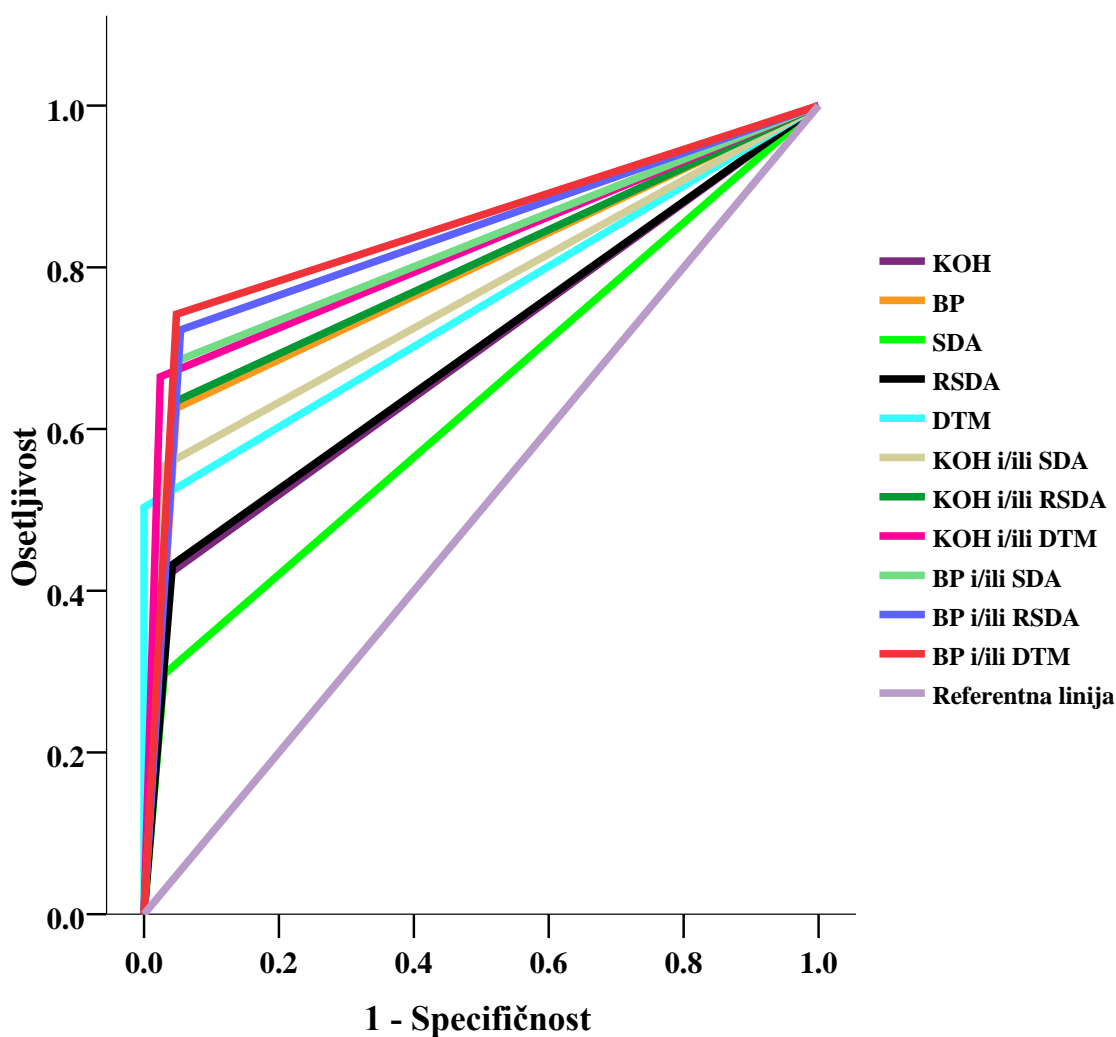
4.3.1. Validnost korišćenih laboratorijskih metoda kod pacijenata sa sumnjom na onihomikozu na noktima na nogama

Ispitivanje dijagnostičkih parametara korišćenih laboratorijskih metoda, kod pacijenata sa sumnjom na onihomikozu na noktima na nogama, vršeno je u odnosu na PCR kao zlatni standard (Tabela 9). Najmanja osetljivost ispitivanih laboratorijskih testova dobijena je za SDA (29,68%), dok je najveća dobijena za kombinaciju BP i/ili DTM (74,19%). Specifičnost je bila veoma visoka kod svih ispitivanih testova (opseg 94-100%). Najnižu specifičnost pokazala je kombinacija BP i/ili RSDA (94,58%), a najvišu DTM (99,40%). Kada je u pitanju PPV najniža vrednost dobijena je za SDA (90,20%), a najviša za DTM (98,72%). Najnižu NPV imao je SDA (59,63%), a najvišu kombinacija testova BP i/ili DTM (79,80%). Najniža LR+ vrednost dobijena je za SDA (9,85), a najviša za DTM (83,50). Kombinacija BP i/ili DTM imala je najnižu vrednost za LR- (0,27), dok je najviša dobijena za SDA (0,73). Takođe, SDA je imao i najniži DUO (13,59), dok je najviši bio kod DTM (166,00).

Tabela 9. Dijagnostički parametri korišćenih laboratorijskih metoda u dijagnozi onihomikoze lokalizovane na noktima na nogama u odnosu na PCR kao zlatni standard.

Lab.metod	Sn % (95% IP)	Sp % (95% IP)	PPV % (95% IP)	NPV % (95% IP)	LR+ (95% IP)	LR- (95% IP)	DUO (95% IP)
KOH	41,29 (33,45-49,47)	97,59 (93,94-99,32)	94,12 (85,61-98,34)	64,03 (57,78-69,95)	17,14 (6,39-45,94)	0,60 (0,53-0,69)	28,48 (10,04-80,77)
BP	62,58 (54,46-70,21)	95,18 (90,72-97,89)	92,38 (85,53-96,64)	73,15 (66,71-78,93)	12,99 (6,53-25,81)	0,39 (0,32-0,48)	33,03 (15,12-72,14)
SDA	29,68 (22,62-37,53)	96,99 (93,11-99,00)	90,20 (78,57-96,70)	59,63 (53,51-65,53)	9,85 (4,02-24,15)	0,73 (0,65-0,81)	13,59 (5,23-35,29)
RSDA	43,23 (35,30-51,41)	95,78 (91,50-98,28)	90,54 (81,47-96,09)	64,37 (58,05-70,34)	10,25 (4,86-21,64)	0,59 (0,51-0,68)	17,29 (7,61-39,30)
DTM	50,00 (41,85-58,15)	99,40 (96,70-99,90)	98,72 (93,04-99,79)	68,31 (62,06-74,11)	83,50 (11,76-593,09)	0,50 (0,43-0,59)	166,00 (22,67-1215,68)
KOH i SDA*	55,48 (47,30-63,46)	96,99 (93,11-99,00)	94,51 (87,63-98,17)	70,00 (63,63-75,85)	18,42 (7,68-44,17)	0,46 (0,38-0,55)	40,13 (15,60-103,23)
KOH i RSDA*	63,23 (55,12-70,82)	95,78 (91,50-98,28)	93,33 (86,74-97,27)	73,61 (67,20-79,36)	14,99 (7,19-31,27)	0,38 (0,31-0,47)	39,05 (17,13-89,05)
KOH i DTM*	66,45 (58,43-73,83)	97,59 (93,94-99,32)	96,26 (90,70-98,95)	75,70 (69,39-81,29)	27,58 (10,4-73,08)	0,3 (0,3-0,4)	80,22 (28,17-228,45)
BP i SDA*	68,39 (60,44-75,61)	95,18 (90,72-97,89)	92,98 (86,64-96,91)	76,33 (69,94-81,94)	14,19 (7,16-28,14)	0,33 (0,26-0,42)	42,72 (19,45-93,84)
BP i RSDA*	72,26 (64,50-79,14)	94,58 (89,95-97,49)	92,56 (86,35-96,53)	78,50 (72,15-83,98)	13,33 (7,01-25,35)	0,29 (0,23-0,38)	45,44 (21,29-96,99)
BP i DTM*	74,19 (66,56-80,88)	95,18 (90,72-97,89)	93,50 (87,58-97,14)	79,80 (73,52-85,16)	15,40 (7,78-30,46)	0,27 (0,21-0,35)	56,78 (25,61-125,89)

Sn – osetljivost; Sp – specifičnost; PPV – pozitivna prediktivna vrednost; NPV – negativna prediktivna vrednost; LR+ – pozitivni faktor verovatnoće; LR- – negativni faktor verovatnoće; IP – interval poverenja; DUO – dijagnostički unakrsni odnos; KOH – 10% Kalijum hidroksid; BP – Blankophor; SDA – Sabouraud dekstrozni agar; RSDA – razblaženi Sabouraud dekstrozni agar; DTM – dermatofit test medijum; PCR – reakcija lančanog umnožavanja; *u kombinacijama testova pacijent je smatran pozitivnim ukoliko je barem jedan od testova bio pozitivan



Grafikon 8. ROC kriva na kojoj je uporedno prikazana osetljivost i specifičnost korišćenih laboratorijskih metoda za dijagnozu onihomikoza na noktima na nogama u odnosu na PCR.

Odnos između osetljivosti i specifičnosti ispitivanih metoda predstavljen je uz pomoć ROC krive (Grafikon 8). Kombinacija BP i/ili DTM je najbliža gornjem levom uglu, tj. PCR metodi koja je uzeta za zlatni standard i predstavlja najoptimalniji metod. Odmah ispod nje nalazi se kombinacija BP i/ili RSDA. Najviše udaljena od gornjeg levog ugla je kriva koja predstavlja kultivisanje na SDA.

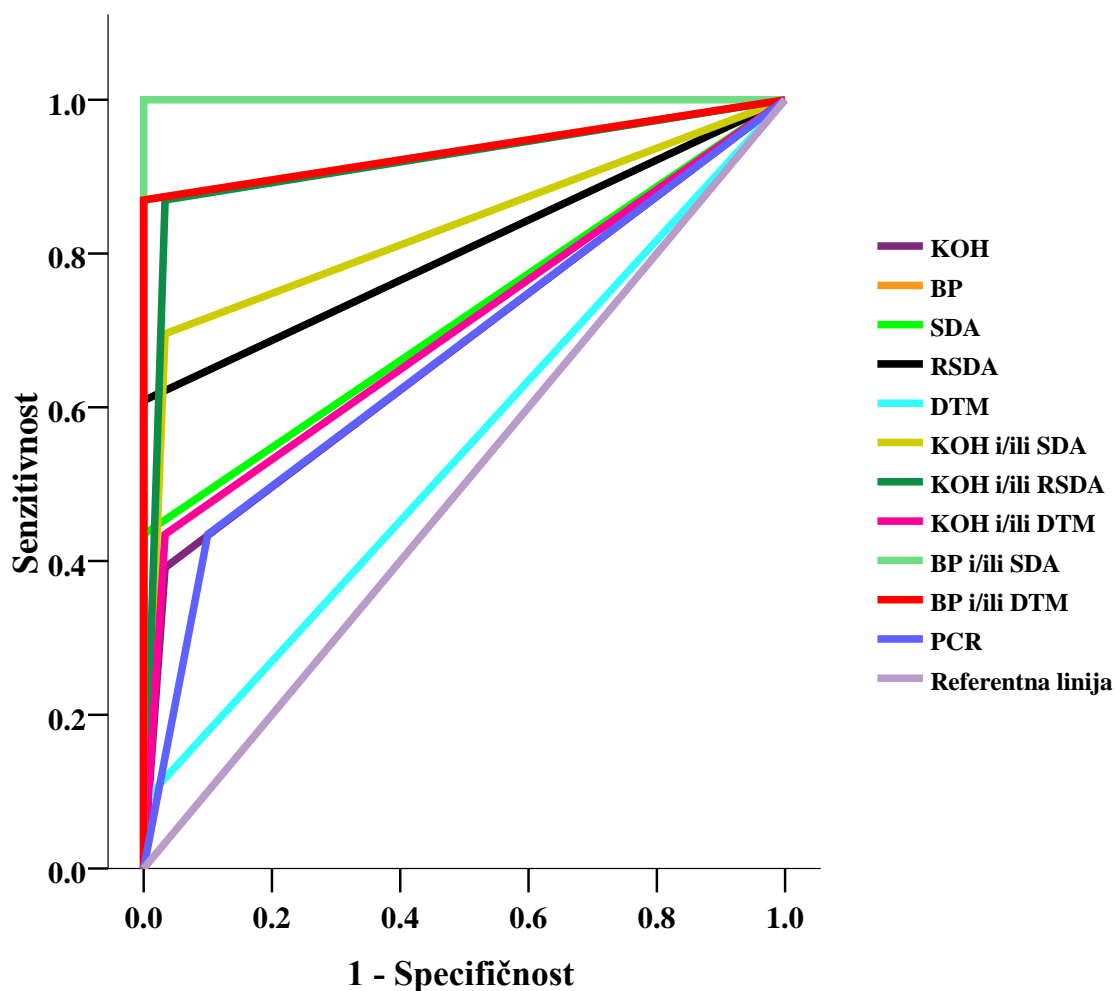
4.3.2. Validnost korišćenih laboratorijskih metoda kod pacijenata sa sumnjom na onihomikozu na noktima na rukama

Ispitivanje dijagnostičkih parametara korišćenih laboratorijskih metoda, kod pacijenata sa promenama na noktima na rukama, vršeno je u odnosu na BP i/ili RSDA kao zlatni standard (Tabela 10). Najmanja osetljivost ispitivanih laboratorijskih testova dobijena je za DTM (8,70%), dok je najveća dobijena za BP (96,67%). Specifičnost je bila veoma visoka kod svih ispitivanih testova (opseg 90-100%). Najnižu specifičnost pokazao je PCR (90,00%), zatim BP (90,91%), dok su svi preostali individualni testovi i njihove kombinacije imali podjednaku vrednost (96,67%). Kada je u pitanju PPV najniža vrednost dobijena je za DTM (66,67%), a najviša za kombinaciju testova BP i/ili SDA (95,65%). Najnižu NPV imao je KOH (67,44%), a najvišu BP (96,77%). Najniža LR+ vrednost dobijena je za DTM (2,61), a najviša za kombinaciju BP i/ili SDA (28,70). Kombinacija BP i/ili SDA kao i individualno primenjen BP imali su najnižu vrednost za LR- (0,04), dok je najviša dobijena za DTM (0,94). Takođe, DTM je imao i najniži DUO (2,76), dok je najviši bio kod kombinacije BP i/ili SDA (638,00).

Tabela 10. Dijagnostički parametri korišćenih laboratorijskih metoda u dijagnozi onihomikoze lokalizovane na noktima na rukama u odnosu na Blankophor i/ili RSDA kao zlatni standard.

Lab.metod	Sn % (95% IP)	Sp % (95% IP)	PPV % (95% IP)	NPV % (95% IP)	LR+ (95% IP)	LR- (95% IP)	DUO (95% IP)
KOH	39,13 (19,74-61,45)	96,67 (82,72-99,44)	90,00 (55,46-98,34)	67,44 (51,46-80,91)	11,74 (1,60-86,16)	0,63 (0,45-0,88)	18,64 (2,14-162,01)
BP	96,67 (82,72-99,44)	90,91 (75,64-97,98)	90,62 (74,95-97,91)	96,77 (83,24-99,46)	10,63 (3,61-31,34)	0,04 (0,01-0,25)	290,00 (28,50-2950,98)
SDA	43,48 (23,22-65,49)	96,67 (82,72-99,44)	90,91 (58,67-98,49)	69,05 (52,91-82,36)	13,04 (1,80-94,72)	0,58 (0,41-0,84)	22,31 (2,58-192,89)
RSDA	60,87 (38,55-80,26)	96,67 (82,72-99,44)	93,33 (67,98-98,89)	76,32 (59,75-88,53)	18,26 (2,59-128,96)	0,40 (0,24-0,68)	45,11 (5,19-392,03)
DTM	8,70 (1,32-28,08)	96,67 (82,72-99,44)	66,67 (11,55-94,53)	58,00 (43,21-71,81)	2,61 (0,25-27,039)	0,94 (0,82-1,09)	2,76 (0,23-32,50)
KOH i SDA*	69,57 (47,08-86,74)	96,67 (82,72-99,44)	94,12 (71,24-99,02)	80,56 (63,97-91,77)	20,87 (2,98-146,09)	0,31 (0,17-0,59)	66,29 (7,48-587,78)
KOH i RSDA*	86,96 (66,38-97,07)	96,67 (82,72-99,44)	95,24 (76,11-99,21)	90,62 (74,95-97,91)	26,09 (3,77-180,36)	0,13 (0,05-0,39)	193,33 (18,74-1994,57)
KOH i DTM*	43,48 (23,22-65,49)	96,67 (82,72-99,44)	90,91 (58,67-98,49)	69,05 (52,91-82,36)	13,04 (1,80-94,72)	0,58 (0,41-0,84)	22,31 (2,58-192,89)
BP i SDA*	95,65 (77,98-99,27)	96,67 (82,72-99,44)	95,65 (77,98-99,27)	96,67 (82,72-99,44)	28,70 (4,17-197,51)	0,04 (0,01-0,31)	638,00 (37,78-10775,13)
BP i DTM*	86,96 (66,38-97,07)	96,67 (82,72-99,44)	95,24 (76,11-99,21)	90,62 (74,95-97,91)	26,09 (3,77-180,36)	0,13 (0,05-0,39)	193,33 (18,74-1994,57)
PCR	43,48 (23,22-65,49)	90,00 (73,44-97,77)	76,92 (46,20-94,69)	67,50 (50,87-81,41)	4,35 (1,35-14,01)	0,63 (0,43-0,92)	6,92 (1,62-29,51)

Sn – osetljivost; Sp – specifičnost; PPV – pozitivna prediktivna vrednost; NPV – negativna prediktivna vrednost; LR+ –pozitivni faktor verovatnoće; LR- – negativni faktor verovatnoće; IP – interval poverenja; DUO – dijagnostički unakrsni odnos; KOH – 10% Kalijum hidroksid; BP – Blankophor; SDA – Sabouraud dekstrozni agar; RSDA – razblaženi Sabouraud dekstrozni agar; DTM – dermatofit test medijum; PCR – rekacija lančanog umnožavanja; *u kombinacijama testova pacijent je smatran pozitivnim ukoliko je barem jedan od testova bio pozitivan



Grafikon 9. ROC kriva na kojoj je uporedno prikazana osetljivost i specifičnost korišćenih laboratorijskih metoda za dijagnozu onihomikoza na noktima na rukama u odnosu na kombinaciju BP i/ili RSDA.

Odnos između osetljivosti i specifičnosti ispitivanih metoda predstavljen je uz pomoć ROC krive (Grafikon 9). Kombinacija BP i/ili SDA je najbliža gornjem levom uglu, tj. kombinaciji BP i/ili RSDA koja je uzeta za zlatni standard i predstavlja najoptimalniji metod. Sledeća ispod nje nalazi se kombinacija BP i/ili DTM. Najviše udaljena od gornjeg levog ugla je kriva koja predstavlja kultivisanje na DTM.

4.4. Poređenje tripsinizacije metodom po Xess-u sa konvencionalnim metodama za dijagnozu onihomikoze

Tabela 11. Prikaz statističke analize primenjenih testova sa i bez tretiranja uzoraka tripsinom.

Metoda	BEZ TRIPSINA		SA TRIPSINOM		p vrednost*
	Br. pozitivnih uzoraka	Učestalost (%)	Br. pozitivnih uzoraka	Učestalost (%)	
KOH	78/374	20,86	138/374	36,90	p<0,001
SDA	61/374	16,31	116/374	31,02	p<0,001
RSDA	88/374	23,53	126/374	33,70	p<0,001
DTM	80/374	21,39	101/374	27,00	p<0,001

KOH – 10% Kalijum hidroksid; SDA – Sabouraud dekstrozni agar; RSDA – razblaženi Sabouraud dekstrozni agar; DTM – Dermatofit test medijum

*u odnosu na χ^2 test

Tripsinizacijom metodom po Xess-u (Tabela 11) značajno je povećan stepen pozitivnosti kako direktnog mikroskopskog preparata (p<0,001), tako i kultivisanja na svim ispitivanim mikološkim podlogama (SDA, RSDA, DTM) (p<0,001).

Ispitivanjem vijabilnosti gljivičnih elemenata u DMP (Tabela 12), nevijabilni gljivični elementi su značajno češće bili prisutni u KOH pozitivnim preparatima (p=0,016).

Tabela 12. Prikaz vijabilnosti gljivičnih elemenata preparata sa tripsinom u poređenju sa rezultatima preparata sa KOH.

	Tripsin + <i>Neutral red</i>		p vrednost*
	vijabilni (127/138)	nevijabilni (11/138)	
KOH pozitivan	68	10	0,016
KOH negativan	59	1	

KOH – 10% Kalijum hidroksid;

*u odnosu na χ^2 test

4.5. Faktori koji doprinose nastanku onihomikoza

Pregled osnovnih demografskih karakteristika obolelih od onihomikoza i osoba bez dijagnoze prikazan je na Tabeli 13. Pacijenti sa laboratorijski potvrđenom dijagnozom onihomikoze su značajno češće bili starijeg uzrasta ($p < 0,001$) u poređenju sa osobama bez oboljenja. Između ispitivanih grupa nije bilo značajne razlike u odnosu na pol i mesto stalnog boravka. Pacijenti sa onihomikozom su značajno češće obavljali manuelne poslove u odnosu na osobe bez onihomikoze ($p = 0,037$).

Tabela 13. Demografske karakteristike 374 pacijenata sa sumnjom na onihomikozu u zavisnosti od toga da li imaju laboratorijski potvrđenu dijagnozu oboljenja

Demografske karakteristike pacijenata sa sumnjom na OM	Ukupno n=374 broj (%)	Ima OM n=190 broj (%)	Nema OM n=184 broj (%)	p vrednost**
Uzrasne grupe:				
≤ 20	32 (8,5)	6 (3,1)	26 (14,2)	<0,001
21–40	96 (25,7)	38 (20,0)	58 (31,5)	
41–60	148 (39,6)	78 (41,1)	70 (38,0)	
> 60	98 (26,2)	68 (35,8)	30 (16,3)	
Pol:				
Muški	147 (39,3)	80 (42,1)	67 (36,4)	0,260
Ženski	227 (60,7)	110 (57,9)	117 (63,6)	
Mesto stalnog boravka:				
Urbano	318 (85,0)	163 (85,8)	155 (84,2)	0,675
Ruralno	56 (15,0)	27 (14,2)	29 (15,8)	
Zanimanje:				
Poljoprivrednici, domaćice i drugi radnici*	159 (42,5)	92 (48,4)	67 (36,4)	0,037
Stručnjaci, umetnici i administrativni službenici	129 (34,5)	59 (31,1)	70 (38,1)	
Učenici i studenti	86 (23,0)	39 (20,5)	47 (25,5)	

OM - onihomikoza

*rudari, industrijski, građevinski i zanatski radnici, trgovci i radnici u uslužnim delatnostima,

**na osnovu univarijantne logističke regresione analize

Tabela 14. Povezanost oboljenja u ličnoj i porodičnoj anamnezi sa laboratorijski potvrđenom dijagnozom onihomikoze.

Lična i porodična anamneza	Ukupno n=374 broj (%)	Ima OM n=190 broj (%)	Nema OM n=184 broj (%)	p vrednost**
Šećerna bolest:				
da	31 (8,3)	16 (8,4)	15 (8,2)	0,925
ne	343 (91,7)	174 (91,6)	169 (91,8)	
ITM:				
Pothranjenost (<18,5 kg/m ²)	14 (3,8)	5 (2,6)	9 (4,9)	0,443
Normalna uhranjenost (18,5–24,99 kg/m ²)	205 (54,8)	105 (55,3)	100 (54,4)	
Predgojaznost (25 – 29,99 kg/m ²)	112 (29,9)	56 (29,5)	56 (30,4)	
Gojaznost I, II i III stepena (≥ 30 kg/m ²)	43 (11,5)	24 (12,6)	19 (10,3)	
Kompromitovana periferna cirkulacija:				
da	62 (16,6)	43 (22,6)	19 (10,3)	0,002
ne	312 (83,4)	147 (77,4)	165 (89,7)	
Psorijaza:				
da	12 (3,2)	8 (4,2)	4 (2,2)	0,272
ne	362 (96,8)	182 (95,8)	180 (97,8)	
Imunosupresivna terapija:				
da	5 (1,3)	4 (2,1)	1 (0,5)	0,222
ne	369 (98,7)	186 (97,9)	183 (99,5)	
Dugotrajna terapija antibioticima*:				
da	19 (5,1)	8 (4,2)	11 (6,0)	0,439
ne	355 (94,9)	182 (95,8)	173 (94,0)	
Ranije prisustvo OM:				
da	162 (43,4)	93 (48,9)	69 (37,7)	0,029
ne	211 (56,6)	97 (51,1)	114 (62,3)	
Trauma nokta:				
da	104 (27,8)	52 (27,4)	52 (28,3)	0,847
ne	270 (72,2)	138 (72,6)	132 (71,7)	
OM u porodičnoj anamnezi:				
da	70 (19,3)	47 (24,7)	23 (13,3)	0,006

ne	293 (80,7)	143 (75,3)	150 (86,7)
----	------------	------------	------------

OM – onihomikoza; ITM – indeks telesne mase

*duže od 6 meseci

**na osnovu univarijantne logističke regresione analize

Prisustvo oboljenja u ličnoj i porodičnoj anamnezi ispitanika prikazano je na Tabeli 14. Pacijenti sa laboratorijski potvrđenom dijagnozom onihomikoze, su u poređenju sa oobama bez onihomikoze značajno češće imali kompromitovanu perifernu cirkulaciju ($p=0,002$), ranije prisustvo onihomikoze u ličnoj anamnezi ($p=0,029$), kao i prisustvo onihomikoze u porodičnoj anamnezi ($p=0,006$). Između ispitivanih grupa nije bilo značajne razlike u odnosu na prisustvo šećerne bolesti, psorijaze i traume nokta u ličnoj anamnezi, kao i u odnosu na stepen uhranjenosti, primeni imunosupresivne terapije i dugotrajne terapije antibioticima (duže od 6 meseci).

Tabela 15. Povezanost pojedinih životnih navika sa laboratorijski potvrđenom dijagnozom onihomikoze.

Životne navike	Ukupno n=374 broj (%)	Ima OM n=190 broj (%)	Nema OM n=184 broj (%)	p vrednost*
Putovanje u poslednjih godinu dana:				
da	138 (36,9)	62 (32,6)	76 (41,3)	0,083
ne	236 (63,1)	128 (67,4)	108 (58,7)	
Bavljenje sportom:				
da	93 (24,9)	40 (21,1)	53 (28,8)	0,084
ne	281 (75,1)	150 (78,9)	131 (71,2)	
Kontakt sa zemljom:				
da	110 (29,4)	64 (33,7)	46 (25,0)	0,066
ne	264 (70,6)	126 (66,3)	138 (75,0)	
Nošenje zatvorene tesne obuće:				
da	152 (40,6)	83 (43,7)	69 (37,5)	0,224
ne	222 (59,4)	107 (56,3)	115 (62,5)	
Kontakt sa životinjama:				
kućni ljubimci	103 (27,5)	59 (31,1)	44 (23,9)	0,405
domaće životinje	31 (8,3)	15 (7,8)	16 (8,7)	
ne	240 (64,2)	116 (61,1)	124 (67,4)	

OM – onihomikoza

**na osnovu univarijantne logističke regresione analize

Kada je u pitanju putovanje u poslednjih godinu dana, upražnjavanje sportskih aktivnosti, kontakt sa zemljom, nošenje zatvorene tesne obuće, kao i kontakt sa životinjama nije postojala značajna razlika između ispitanika (Tabela 15).

Tabela 16. Klinički znaci i simptomi osoba sa sumnjom na onihomikozu.

Klinički znaci i simptomi osoba sa sumnjom na OM	Ukupno n=374 broj (%)	Ima OM n=13 broj (%)	Nema OM n=122 broj (%)	p vrednost**
Zahvaćenost nokta:				
< 1/3	86 (23,0)	18 (9,5)	68 (37,0)	<0,001
1/3 – 2/3	169 (45,2)	103 (54,2)	66 (35,9)	
> 2/3	119 (31,8)	69 (36,3)	50 (27,1)	
Stepen zadebljanja nokta:				
nema ili < 1 mm	110 (29,4)	25 (13,2)	85 (46,2)	<0,001
1 – 2 mm	167 (44,7)	108 (56,8)	59 (32,1)	
> 2 mm	97 (25,9)	57 (30,0)	40 (21,7)	
Broj noktiju zahvaćenih OM:				
1-2	206 (55,1)	83 (43,7)	123 (66,8)	<0,001
3-4	74 (19,8)	45 (23,6)	29 (15,8)	
5-6	41 (11,0)	28 (14,7)	13 (7,1)	
7-8	20 (5,3)	14 (7,4)	6 (3,3)	
9-10	30 (8,0)	18 (9,5)	12 (6,5)	
10+	3 (0,8)	2 (1,1)	1 (0,5)	
Lokalizacija OM:				
2-4 nokat na ruci	15 (4,0)	3 (1,6)	12 (6,5)	0,002
palac na ruci i/ili 2-5 nokat na nozi	48 (12,8)	18 (9,5)	30 (16,3)	
palac na nozi	311 (83,2)	169 (88,9)	142 (77,2)	
SCIO indeks:				
1,00 – 6,99	99 (26,5)	23 (12,1)	76 (41,3)	<0,001
7,00 – 16,99	178 (47,6)	108 (56,8)	70 (38,0)	
17,00 – 30,00	97 (25,9)	59 (31,3)	38 (20,7)	
Paronihija:				
da	56 (15,0)	22 (11,6)	34 (18,5)	0,064
ne	318 (85,0)	168 (88,4)	150 (81,5)	
Krti i/ili lako lomljivi nokti:				
da	99 (26,5)	49 (25,8)	50 (27,2)	0,762
ne	275 (73,5)	141 (74,2)	134 (72,8)	

Promena boje nokta:				
bela	48 (12,8)	22 (11,6)	26 (14,2)	0,285
žuta	195 (52,2)	96 (50,5)	99 (53,8)	
žuto – braon	110 (29,4)	61 (32,1)	49 (26,6)	
tamno zelena	17 (4,5)	9 (4,7)	8 (4,3)	
crna	4 (1,1)	2 (1,1)	2 (1,1)	
Estetski problem:				
da	286 (76,5)	142 (74,7)	144 (78,3)	0,422
ne	88 (23,5)	48 (25,3)	40 (21,7)	
Bol:				
da	115 (30,7)	64 (33,7)	51 (27,7)	0,212
ne	259 (69,3)	126 (66,3)	133 (72,3)	
Deformacija nokta:				
da	226 (60,4)	127 (66,8)	99 (53,8)	0,010
ne	148 (39,6)	63 (33,2)	85 (46,2)	
Oniholiza:				
da	145 (38,8)	76 (40,0)	69 (37,5)	0,620
ne	229 (61,2)	114 (60,0)	115 (62,5)	
Pojačano znojenje nogu:				
da	155 (41,4)	92 (48,4)	63 (34,2)	0,006
ne	219 (58,6)	98 (51,6)	121 (65,8)	

OM – onihomikoza

**na osnovu univarijantne logističke regresione analize

Na Tabeli 16 prikazani su klinički znaci i simptomi ispitanika sa sumnjomna onihomikozu. Pacijenti sa laboratorijski potvrđenom dijagnozom onihomikoze su značajno češće imali veću zahvaćenost nokatne ploče patološkim procesom ($>1/3$) ($p<0,001$), viši stepen zadebljanja ($p<0,001$) i prisustvo deformacije nokatne ploče ($p=0,010$), kao i pojačano znojenje nogu ($p=0,006$) u poređenju sa osobama bez onihomikoze. Takođe, pacijenti sa laboratorijski potvrđenom dijagnozom onihomikoze su značajno češće imali zahvaćeno više od 2 prsta onihomikozom ($p<0,001$), kod njih je onihomikoza bila značajno češće lokalizovana na palcu na nozi ($p=0,002$) i imali su značajno više vrednosti SCIO indeksa

($p < 0,001$). Između ispitivanih grupa nije bilo značajnih razlika u pogledu prisustva paronihije, krtih i/ili lako lomljivih noktiju, promene boje nokta, oniholize, bola i estetskog aspekta.

U cilju utvrđivanja nezavisne povezanosti ispitivanih faktora sa pojavom onihomikoza urađena je multivarijantna logistička regresiona analiza (MLRA). U multivarijantnu logističku regresionu analizu bile su uključene sve one varijable koje su bile prema rezultatima univarijantne logističke regresione analize (ULRA) povezane sa nastankom onihomikoze na nivou verovatnoće $\leq 0,10$.

U konačni model MLRA bilo je uključeno šesnaest varijabli: uzrast, zanimanje, kompromitovana periferna cirkulacija, ranije prisustvo onihomikoze, pozitivna porodična anamneza za onihomikozu, putovanje u poslednjih godinu dana, bavljenje sportom, kontakt sa zemljom, pojačano znojenje nogu, stepen zahvaćenosti nokta, stepen zadebljanja nokta, broj zahvaćenih noktiju, lokalizacija onihomikoze, SCIO indeks, paronihija i deformacija nokta. Nezavisni faktori rizika, koji su bili značajno bili povezani sa nastankom onihomikoze su (Tabela 17): stariji uzrast (UO=2,33; $p < 0,001$), pozitivna porodična anamneza za onihomikozu (UO=2,71; $p = 0,001$), pojačano znojenje nogu (UO=2,28; $p = 0,001$) i veći stepen zadebljanja nokta (UO=2,04; $p < 0,001$).

Tabela 17. Nezavisni faktori rizika značajno povezani sa nastankom onihomikoze – rezultati multivarijantne logističke regresione analize.

Varijabla	UO	95% IP	p vrednost
Uzrast	2,33	1,75-3,09	<0,001
Pozitivna porodična anamneza za OM	2,71	1,47-4,96	0,001
Pojačano znojenje nogu	2,28	1,41-3,69	0,001
Stepen zadebljanja nokta	2,04	1,48-2,81	<0,001

UO - unakrsni odnos; IP - interval poverenja; OM - onihomikoza

Diskusija

5. Diskusija

Epidemiološki podaci iz najvećeg broja zemalja severne i centralne Evrope pokazuju da su dermatofiti vodeći uzročnici onihomikoze (Svejgaard et Nilsson, 2004). U našem istraživanju dermatofiti su potvrđeni u 88,95% pacijenata sa laboratorijski dijagnostikovanom onihomikozom. U studiji sprovedenoj u Švedskoj dermatofiti su potvrđeni kod 83,2% pacijenata sa sumnjom na onihomikozu (Drakensjö et Chryssanthou, 2011). U severnim delovima Grčke kao i Turske dermatofiti takođe predstavljaju vodeći uzročni faktor onihomikoze ispitivanih pacijenata (Koussidou et al, 2002; Yenisehirli et al, 2009). Slična epidemiološka situacija sa predominacijom dermatofita primećena je i u zemljama iz našeg okruženja (Tchernev et al, 2013). Ovakva epidemiološka situacija uglavnom je prisutna u zemljama gde je lokalizacija onihomikoze češće detektovana na noktima na nogama nego na rukama (Gupta et al, 2000c). U našoj studiji nokti na nogama su 6 puta češće bili zahvaćeni infektivnim procesom od noktiju na rukama (163:27). U studiji rađenoj na Kritu tokom perioda od sedam godina 15 puta češće je onihomikoza potvrđena na noktima na nogama u odnosu na nokte na rukama (Maraki et al, 2007).

U velikom broju studija koje su se bavile definisanjem izolata dermatofita kao uzročnika onihomikoze noktiju na nogama, najčešći uzročnik je bio *T. rubrum*, koji je izolovan kod 60-90% slučajeva onihomikoze (Sigurgeirsson et al, 2002a; Gupta et al, 2007a). Trend sa predominacijom *T. rubrum* primećen je u većini evropskih zemalja u poslednjih pedeset godina (Romano et al, 2005; Dolenc-Voljč 2005). Ovi rezultati su u skladu sa našim istraživanjem, gde je primećena visoka učestalost onihomikoze izazvane ovom gljivom (89,35%). Drugi po učestalosti dermatofit u našoj studiji je bio *T. interdigitale* (8,28%). S druge strane, u Hrvatskoj *T. interdigitale* se pokazao kao vodeći izazivač onihomikoze noktiju na nogama sa učestalošću od 85% (Miklič et al, 2010).

Kada su u pitanju nokti na rukama dermatofiti takođe predstavljaju vodeće uzročnike, mada je broj studija iz ove oblasti znatno manji. U velikoj kanadskoj studiji rađenoj na 15000 ispitanika, dermatofiti su bili vodeći uzročnici onihomikoze na noktima na rukama potvrđeni kod 70,8% ispitanika (Gupta et al, 2000). U studiji iz Argentine dermatofiti su bili uzročnici onihomikoze kod 12% pacijenata (Nazar et al, 2012). U našoj studiji dermatofiti su potvrđeni kao uzročnici kod 52% pacijenata sa onihomikozom na noktima na rukama.

U manjem procentu kod naših pacijenata sa laboratorijski potvrđenom dijagnozom onihomikoze izolovali smo kvasnice (6,84%). Kod 12/13 pacijenata kvasnice su izolovane sa noktiju na rukama, dok su samo kod jednog pacijenata dokazane kao uzročnik onihomikoze na noktima na nogama. Vodeća kvasnica u našoj populaciji pacijenata je bila *C. albicans* (9/13), zatim *C. krusei* (2/13) i *C. parapsilosis* (2/13). One mogu biti prisutne na okolnoj koži oko noktiju i najčešće sa napredovanjem patološkog procesa sekundarno se mogu preneti i na tkivo nokta. Prema većini studija, gljive roda *Candida* najčešće se izoluju kao izazivači onihomikoza, a među njima i dalje *C. albicans* dominira u odnosu na ostale vrste iz ovog roda (Pontes et al, 2002; Maraki et al 2007). U pretežno azijskim i afričkim zemljama, kao što su Indonezija, Iran, Gabon i Pakistan u kojima se onihomikoza češće javlja na noktima na rukama, *Candida* spp. su prepoznati kao najčešći izazivači onihomikoza (Bramono et Budimulja, 2005; Hashemi et al, 2009; Nzenze Afene et al, 2011; Asadi et al, 2009; Bokhari et al, 1999). U našem istraživanju na noktima na rukama kvasnice su bile izolovane u skoro oko polovine ispitanika (44%) što je u skladu sa epidemiološkom situacijom u zemljama centralne i severne Evrope (Drakensjö et Chryssanthou, 2011; Svejgaard et Nilsson, 2004).

S druge strane, u Saudijskoj Arabiji dermatofiti se izoluju u niskom procentu (22,9%), dok su nedermatofitne plesni (45,8%) glavni izazivači onihomikoze u ovoj zemlji (Abanmi et al, 2008). U studiji Hajoui i saradnici su pokazali da u Maroku upravo gljive rodova *Aspergillus* i *Fusarium* predstavljaju vodeće izazivače iz grupe nedermatofitnih plesni i nađene su kod 65,3% pacijenata sa onihomikozom izazvanom nedermatofitnim plesnima (Hajoui et al, 2012). U našem istraživanju nedermatofitne plesni izlovene su kod manjeg broja pacijenata (4,21%). Najčešći je bio nalaz *S. brevicaulis* (2/8) i *S. dimidiatum* (2/8) i *S. hyalinum* (1/8). Kod preostalih 4/8 (50%) pacijenata sa nalazom nedermatofitnih plesni izolovane su gljive iz rodova *Aspergillus* i *Fusarium*. Ovakva epidemiološka situacija, kada su u pitanju nedermatofitne plesni u našem istraživanju, u skladu je sa rezultatima iz Severne Amerike i većine evropskih zemalja (Drakensjö et Chryssanthou, 2011; Romano et al, 2005; Dolenc-Voljč 2005; Ghannoum et al, 2000).

Nalaz kvasnica i nedermatofitnih plesni uvek treba pažljivo protumačiti u skladu sa kliničkom slikom pacijenata (Shemer et al, 2009). Za razliku od dermatofita koji pripadaju striktno patogenim gljivama, kvasnice i nedermatofitne plesni su uslovno patogene gljive, koje često mogu biti prisutne na ljudskim tkivima kao i u okolini čoveka bez izazivanja oboljenja, te je od izuzetnog značaja pravilno protumačiti nalaze ovih gljiva (Dionque et al,

2015). Međutim, s obzirom da je i u direktni mikroskopskim preparatima kod naših pacijenata uočeno postojanje gljivičnih elemenata smatramo da nije došlo do slučajne kontaminacije uzoraka ili kontaminacije u toku izvođenja laboratorijskih dijagnostičkih procedura. Naravno, teoretski postoji mogućnost da su kvasnice i nedermatofitne plesni, koje inače brže rastu od dermatofita, prerasle eventualno prisutne dermatofite u uzorku nokta, s obzirom da na osnovu direktnog mikroskopskog preparata ne možemo tvrditi o kojoj se vrsti gljiva radi.

Klinička slika suspektne onihomikoze često nije dovoljno specifična za pojedine vrste gljiva, pa čak i mnoga druga oboljenja mogu izazvati promene na noktima koje liče na onihomikozu. Zbog toga, laboratorijska potvrda kliničke sumnje na onihomikozu predstavlja neophodan korak u dijagnozi ovog oboljenja jer omogućava određivanje uzročnog faktora oboljenja. Pravilna i pouzdana laboratorijska dijagnostika oboljenja predstavlja preduslov ciljane i racionalne upotrebe antimikotika čime se smanjuje broj neželjenih efekata antimikotika kao i troškovi lečenja (Piaraccini et al, 2010). Identifikacija dermatofita do nivoa vrste je veoma bitna za pravilan izbor antimikotične terapije, s obzirom da pojedine vrste kao što je *T. verrucosum* pokazuju smanjenu osetljivost na flukonazol, lek koji se u praksi najčešće koristi u lečenju infekcija izazvanih dermatofitima (Graser et al, 2008). Takođe, u izboru adekvatnog antimikotika veoma je bitno razlikovanje dermatofita od nedermatofitnih vrsta, kao što je *Neoscytalidium dimidiatum*, koja daju gotovo identičnu kliničku sliku, ali ne reaguju na terapiju za dermatofite pa je pravilna identifikacija uzročnog faktora od presudnog značaja (Graser et al, 2008).

Najčešći klinički oblik onihomikoze u našoj populaciji pacijenata je bila distalna i lateralna subungvalna onihomikoza, uočena kod 92,51% pacijenata, što je u skladu sa podacima iz literature (Effendy et al, 2005). Garcia-Doval i saradnici su kod više od 90% pacijenata sa onihomikozom ustanovili da se radi o DLSO i TDO (Garcia-Doval et al, 2010). U našoj studiji SBO je nađena kod 17 pacijenata (4,55%), a PSO kod samo 11 (2,94%). Druge studije su takođe pokazale nisku učestalost ova dva klinička tipa onihomikoze s obzirom da se oni češće javljaju kod osoba sa imunodeficijencijama, često udruženi sa AIDS-om (Degreef, 2008).

Kriterijum za postavljanje dijagnoze onihomikoze u većini studija, a koji smo i mi koristili je postojanje bar jednog kliničkog znaka onihomikoze, kao što je promena boje nokta, postojanje zadebljanja, pojava oniholize, promena kvaliteta nokta i/ili potpuna

distrofija nokatne ploče, uz pozitivnost barem jednog od primenjenih laboratorijskih testova (Lawry et al, 2000). U rutinskom laboratorijskom radu, dijagnoza onihomikoze se najčešće postavlja i dalje na osnovu DMP sa KOH i zasejavanjem na SDA (Weinberg et al, 2003). Ovi testovi međutim, pokazuju nisku osetljivost kada se koriste pojedinačno pa se najčešće kombinuju (Lawry et al, 2000). U našem istraživanju kod 37,37% pacijenata dijagnoza onihomikoze bi bila potvrđena primenom samo jednog od bilo kog primenjenog laboratorijskog testa, s obzirom da je barem po jedan test iz svake grupe (DMP, kultura, PCR) bio pozitivan. Kod oko 10% pacijenata bili su pozitivni samo konvencionalni mikološki testovi (DMP i/ili kultura), dok je PCR bio negativan. Daljom analizom ustanovljeno je da su zapravo to pacijenti sa nalazom kvasnica odnosno nedermatofitnih plesni. PCR je bio pozitivan kod 21,05% pacijenata kod kojih su sve ispitivane metode kultivisanja dale negativan rezultat. Od 169 pacijenata kod kojih su kao izazivači onihomikoze dokazani dermatofiti, PCR je bio negativan samo kod jednog pacijenta kod koga je dijagnoza bila postavljena na osnovu porasta dermatofita na DTM podlozi. S obzirom da PCR metodom mogu da se detektuju samo dermatofiti (panderm marker) ili specifično *T. rubrum* odnosno *T. interdigitale* koji i predstavljaju najčešće izazivače onihomikoze na noktima na nogama mi smo ga koristili kao zlatni standard za izračunavanje dijagnostičkih performansi ispitivanih testova.

Kod pacijenata sa pozitivnim DMP, a negativnom kulturom, u rutinskom radu uglavnom se ponovo uzima uzorak nokta, ali ishod ponovljenih testova u velikom broju slučajeva potvrdi prvobitni nalaz. U našoj studiji je kod 24,73% pacijenata ustanovljeno prisustvo gljivičnih elemenata na osnovu mikroskopskog pregleda DMP, dok su kulture kod ovih pacijenata ostale negativne. Kod ovih pacijenata primenom konvencionalne mikološke dijagnostike nije moguće identifikovati uzročnog faktora do nivoa roda/vrste, već je preporučljivo takve uzorke testirati PCR metodom za detekciju dermatofita.

Kod 20% pacijenata iz naše studije kod kojih nijedan od konvencionalnih mikoloških testova nije bio pozitivan, PCR je jedina metoda koja je dokazala prisustvo dermatofita u ispitivanim uzorcima. Procenat lažno negativnih pacijenata primenom konvencionalne dijagnostike prema većini studija se kreće do 30% (Hamer et al, 2006). Pravilno uzorkovanje noktiju je ključno za adekvatnu dijagnozu onihomikoze. Lažno negativni rezultati kultivisanja mogu biti posledica neadekvatnog uzorkovanja, ako uzorak nokta nije uzet sa pravog mesta u zavisnosti od kliničkog tipa onihomikoze. S obzirom da gljive, a posebno dermatofiti produkuju enzim cistein dioksidazu kao ključni faktor virulencije koji im

omogućava da izvrše razgradnju keratina i da prodru u dublje strukture noktiju, neophodno je prilikom uzorkovanja doći što bliže matriksu nokta gde su gljivični elementi najbrojniji (Robert and Pihet, 2008). Prilikom pravilnog uzorkovanja neophodno je uzeti dovoljnu količinu materijala što bliže matriksu nokta zato što to povećava verovatnoću da se uzorkuju vijabilni gljivični elementi (Wisselink et al, 2011). Različite studije pokazuju da uzorkovanje samo površine promena na noktima gde su najčešće prisutni nevijabilni gljivični elementi, rezultiraju odsustvom porasta gljiva na kulturama, s obzirom da kultivisanje predpostavlja prisustvo živih mikroorganizama (Grumbt et al, 2013). Razlog za lažno negativan rezultat kultivisanja može biti i neadekvatna priprema uzorka nokta prekultivisanja. Naime, veliki delovi uzorka nokta nisu adekvatni za zasejavanje, jer gljivični elementi iako prisutni u njima, nemaju adekvatan kontak sa hranljivim podlogama na kojima su zasejani. S toga je neophodno svaki uzorak pre zasejavanja adekvatno usitniti sterilnim instrumentima (Weinberg et al, 2003).

S obzirom da smo u našem istraživanju veliku pažnju posvetili pravilnom uzorkovanju i nokte pažljivo usitnjavali pre zasejavanja, postoji mogućnost da su lažno negativni rezultati posledica deljenja uzorka nokta s obzirom da smo u dijagnostičke svrhe koristili veći broj testova, te da se za kultivisanje koristio baš onaj deo bez gljivičnih elemenata ili gde gljivični elementi nisu bili vijabilni. Međutim, s obzirom da smo za kultivisanje svakog uzorka noktiju koristili 5 podloga (uzorci su paralelno zasejavani i na 28°C i na 37°C) mala je verovatnoća da je svih pet puta uzet deo uzorka nokta koji nije sadržao gljivične elemente.

DMP sa KOH predstavlja brzu, tehnički jednostavnu i najjeftiniju metodu u laboratorijskoj potvrdi onihomikoza, ali koja zahteva veliku stručnost osobe koja posmatra preparate kako se ne bi različiti artefakti koji mogu biti prisutni u direktnim preparatima proglasili gljivičnim elementima. Naime, KOH razgrađuje keratinske elemente u uzorku, čime omogućava da se prisutni gljivični elementi lakše uoče. U našem istraživanju smo preparate sa KOH inkubirali na sobnoj temperaturi oko 20 minuta, što je i generalna preporuka za rutinski rad. Međutim pojedini autori su pokazali da što duže preparat stoji u KOH dolazi do bolje razgradnje keratinskih struktura u noktima, pa je lakše uočiti prisutne gljivične elemente (Singal and Khanna, 2011). Ova metoda u rutinskoj laboratorijskoj praksi uglavnom predstavlja prvi korak, tzv. “*screening*” metoda, a glavni nedostaci metode su nemogućnost identifikacije uzročnika onihomikoze do novoa roda/vrste, kao i procene vijabilnosti uočenih gljivičnih elemenata (Shenoy et al, 2008). Osetljivost metode varira i

prema većini studija se kreće od 40-80% (Grover et al, 2012). U našem istraživanju osetljivost KOH u uzorcima noktiju na nogama je iznosila 41,29%, a na rukama 39,13%.

U cilju povećanja osetljivosti DMP koristili smo dodatni test sa nespecifičnom fluorescentnom bojom Blankophor koja ima sposobnost vezivanja za hitin i celulozu u ćelijskom zidu gljiva. Kada se ovako pripremljen preparat posmatra pod fluorescentnim mikroskopom uočava se fluorescencija usled prisustva gljivičnih elemenata. Istraživanja su pokazala da kada se koristi BP dijagnoza je brža i preciznija jer je mnogo lakše uočiti gljivične elemente nego u standardnim preparatima sa KOH (Vennewald et al, 2008). U našoj studiju korišćenjem BP senzitivnost DMP je povećana na 62,58% kada su u pitanju nokti na nogama, odnosno na čak 96,67% na noktima na rukama. Podaci iz literature takođe ukazuju na znatno poboljšanje senzitivnosti upotrebom BP koja može dostići i do 100% (Vennewald et al, 2008; Degreef, 2008). Test sa BP je jednostavan za izvođenje i omogućava brzu laboratorijsku potvrdu dijagnoze onihomikoze. Za interpretaciju rezultata međutim, neophodna je upotreba fluorescentnog mikroskopa, a osnovni nedostatak ove metode je nemogućnost identifikacije uzročnika do nivoa roda/vrste što je neophodan preduslov za primenu specifične antimikotične terapije. BP predstavlja dobru inicijalnu dijagnostiku, ali zahteva primenu dodatnih laboratorijskih testova (najčešće u kombinaciji sa kultivisanjem na standardnim i/ili selektivnim mikološkim podlogama) za pravilnu interpretaciju rezultata.

U istraživanju smo koristili nekoliko različitih mikoloških podloga za zasejavanje svakog uzorka noktiju pacijenata sa sumnjom na onihomikozu. Uzorke noktiju zasejavali smo na standardnu mikološku podlogu (SDA) koja omogućava porast gotovo svih gljiva koje mogu da se kultiviraju u laboratorijskim uslovima. Korišćenjem ove podloge, uz upotrebu temperature od 28° i 37°, data je podjednaka šansa i dermatofitima, ali i kvasnicama i nedermatofitnim plesnima (Robert and Pihet, 2008). Razblaženi SDA predstavlja modifikaciju standardnog SDA i ima veoma slične karakteristike. Sadržaj glukoze je niži, tako da omogućava znatno bolju sporulaciju gljiva i olakšava njihovu identifikaciju do nivoa roda/vrste. Osnovni nedostatak ovih podloga je neselektivnost, što u rutinskom radu i ciljanom traganju za pojedinim uzročnicima mogu otežati posao.

DTM podloga je selektivna za dermatofite. Rast dermatofita na ovoj podlozi se uočava promenom žute boje podloge u crvenu usled prisustva alkalnih metabolita koji su posledica rasta dermatofita. Međutim, svaki porast gljiva koji dovodi do prethodno pomenute promene boje podloge ne znači da se uvek radi o dermatofitima. Primećeno je da lažnu

pozitivnost na DTM daju *T. terrestre* i *Chrysosporium*-like organizmi (Graser et al, 2008). Takođe, nepatogene vrste kao što su *Trichophyton terrestre*, *Aphanoascus fulvescens* i *Myriodontium keratinophilum* veoma često porastu na kulturama zasejanih uzoraka noktiju, kako na neselektivnim tako i na selektivnim mikološkim podlogama. Ove nepatogene vrste po kulturnim karakteristikama veoma liče na patogene dermatofite, a takođe mogu dovesti do promene boje DTM podloge prilikom rasta. Zbog toga je neophodno svaki izolat pregledati i mikroskopski, pravljenjem preparata iz kulture, kako bi se izvršila pravilna identifikacija izolata i izbegla nepotrebna antimikotična terapija (Graser et al, 2008). Takođe, uvid o antropofilnoj, geofilnoj ili zoofilnoj prirodi dermatofita bitan je i sa aspekta prevencije. Pojedine vrste dermatofita, pored *Pneumocystis* spp., su jedine gljive koje prvenstveno postoje kao zarazne bolesti sisara i ptica. Pravilnom identifikacijom, poznavanjem prirodnog staništa infektivnog agensa i preduzimanjem adekvatnih preventivnih mera smanjuje se broj recidiva infekcije kao i širenja oboljenja na osobe u neposrednom kontaktu sa obolelom osobom (Fahri et al, 2012; Grasser et al, 2008).

S obzirom, da su dermatofiti najčešći izazivači onihomikoze, u većini naročito evropskih zemalja kao i u našoj sredini, preporuke su da se uzorci noktiju zasejavaju na DTM, ali uz kombinaciju sa nekom neselektivnom podlogom kako se ne bi propustili slučajevi drugih gljiva (kvasnica i nedermatofitnih plesni) izazivača onihomikoze (Rich et al, 2003).

Kultivisanje i dalje predstavlja "zlatni standard" u laboratorijskoj potvrdi dijagnoze onihomikoza uprkos nedovoljnoj osetljivosti ove metode (30-50%) jer je jedini metod koji u rutinskom radu omogućava identifikaciju uzročnika do nivoa roda/vrste (Robert and Pihet, 2008). U našem istraživanju osetljivost korištenih mikoloških podloga u uzorcima noktiju na nogama bila je najviša za DTM (50%), dok je za SDA bila svega 29,68%. Kada su u pitanju nokti na rukama konvencionalna mikološka dijagnoza je bila superiornija u odnosu na PCR, što je bilo i očekivano, s obzirom na procentualno veću zastupljenost kvasnica i nedermatofitnih plesni. U ovim uzorcima osetljivost je bila najviša za RSDA (60,87%), dok je za DTM bila svega 8,70%. Specifičnost svih ispitivanih podloga i u uzorcima noktiju na nogama kao i na rukama je bila izuzetno visoka (>95%). S obzirom na performanse dijagnostičkih testova u našem istraživanju, a vodeći računa o uzročnicima onihomikoze na noktima na rukama i nogama naši rezultati su u skladu sa preporukama Evropskog udruženja medicinskih mikologa od 2012. godine (European Confederation of Medical Mycology) da se u dijagnozi onihomikoze na noktima na rukama svi uzorci obavezno zasejavaju na mikološke

podloge. Kada su u pitanju uzorci noktiju na nogama preporuke su da PCR predstavlja prvi korak u laboratorijskoj potvrdi dijagnoze onihomikoze, a da se kultivisanje po potrebi radi samo na PCR negativnim uzorcima.

Naime, gljivični elementi iako prisutni u uzorku, čak i uočeni u direktnim mikroskopskim preparatima, često ne dovode do porasta gljiva na kulturi. Brojne studije navode da je to posledica “zarobljenosti” gljivičnih elemenata u keratinu koji je prisutan u noktima (Wisselink et al, 2011). S druge strane primećeno je da u slučajevima hronične onihomikoze, kada oboljenje može trajati i više godina čak i decenija, veoma često usled smanjene vijabilnosti gljiva povećava se verovatnoća lažno negativnih rezultata kultivisanja gljiva (Nazar et al, 2012).

Definitivna dijagnoza onihomikoze može predstavljati problem kada postoji razlika između mikroskopskog nalaza i kulture. Uzorci pozitivni na direktnim mikroskopskim preparatima veoma često ne daju porast na kulturi ukoliko su gljivični elementi u njima nevijabilni (Wisselink et al, 2011). U rutinskom laboratorijskom radu najčešće se prilikom pravljenja direktnih mikroskopskih preparata koristi 10% KOH (Weinberg et al, 2003). Zbog navedenih nedostataka standardnog DMP sa 10% KOH pokušalo se da se različitim modifikacijama unapredi ovaj vid dijagnostike, ali rezultati nisu bili i dalje zadovoljavajući (Monod et al, 1989). Denning i saradnici su u cilju boljeg čišćenja preparata od keratinskih elemenata predložili modifikaciju standardne metode upotrebom 36% dimetil sulfoksida (DMSO) sa 20% KOH (Denning et al, 1995).

U našem istraživanju osetljivost KOH je bila 20,86%, dok su uzorci noktiju koje smo prethodno tretirali tripsinom pokazali znatno veću osetljivost (36,90%). Tripsin je enzim koji vrši digestiju keratina i omogućava prodiranje do dubljih struktura gde se vijabilni gljivični elementi nalaze. Veća osetljivost ovog preparata u odnosu na standardni preparat sa KOH ukazuje da se primenom tripsina ostvaruje bolja digestiju keratina pa su i gljivični elementi dostupniji. Takođe, s obzirom da samo vitalne ćelije poseduju mogućnost deponovanja boje u lizozomima može se proceniti i njihova vijabilnost ukoliko se prilikom pravljenja preparata doda neka vitalna boja kao što je npr. Neutral red. Vitalna boja Neutral red ima sposobnost prolaska kroz intaktnu citoplazmatsku membranu i deponuje se u lizozomima živih ćelija što dovodi do crvene prebojenosti živih ćelija. Ukoliko dođe do oštećenja ćelijske membrane i lizozoma boja se neće deponovati, pa takve ćelije ostaju nebojene (Naka et al, 1994).

Upotrebom tripsina osetljivost DMP je povećana za 16% što je visoko statistički značajno ($p < 0,001$). Tripsin vrši "čišćenje" preparata od keratinskih elementa znatno bolje od KOH (Tchernev et al, 2013; Grumbt et al, 2013). Ali činjenica je da prilikom samog postupka pravljenja ovih preparata uzorak nokta skoro 3 puta duže u kontaktu sa tripsinom nego sa KOH, tako da i vreme doprinosi boljoj senzitivnosti. S druge strane, s obzirom da je svaki uzorak deljen na tri dela, postoji teoretska mogućnost da se baš deo uzorka gde su gljivični elementi najbrojniji koristio za preparat sa tripsinom.

Naši podaci ukazuju da su kod 127/138 pozitivnih DMP preparata prethodno tretiranih tripsinom uočeni vijabilni gljivični elementi. Međutim, samo je 68 ovih uzoraka bilo istovremeno pozitivno i na KOH. Kod preostalih 59 nalaz KOH je bio negativan što je verovatno posledica činjenice da su gljivični elementi bili duboko u keratinu i da standardni preparat sa KOH nije bio dovoljan za razgradnju. Ovi uzorci bi na osnovu standardne mikološke dijagnostike bili proglašeni negativnim, s obzirom da je i većina ovih kultura bilo negativno usled niske osetljivosti, uprkos postojanja vijabilnih gljivičnih elemenata u ovim uzorcima noktiju. Nevijabilni gljivični elementi nađeni su u 11 uzoraka noktiju koji su prethodni bili tretirani tripsinom od kojih je 10 bilo pozitivno na KOH. S obzirom da su u ovim uzorcima uočeni gljivični elementi, a kulture ostale negativne, novi uzorak bi se morao uzeti od pacijenta i ponoviti čitava procedura. Međutim, i pored ponovljenih pokušaja rezultati uglavnom nisu zadovoljavajući pa je jedini izbor takve pacijente empirijski lečiti ukoliko se radi samo konvencionalna mikološka laboratorijska potvrda onihomikoze. Kod jednog pacijenta DMP sa KOH je bio negativan dok su u preparatu sa tripsinom uočeni prisutni nevijabilni gljivični elementi, samim tim i kulture ostaju negativne usled postojanja nevijabilnih gljiva. Ovakvi pacijenti bi primenom samo konvencionalne dijagnostike bili označeni kao negativni.

Svi ispitivani uzorci koji su prethodno tretirani tripsinom, su nakon primene pomenutih metoda mikroskopiranja zasejavani na sve ispitivane mikološke podloge. Statističkom analizom uočena je visoka značajnost u odnosu na zasejavanje uzoraka noktiju bez prethodnog tretiranja tripsinom i to kod svih korišćenih mikoloških podloga. Upotrebom tripsina stepen pozitivnosti R-SDA je povećana za 10%, DTM za 6%, a SDA za čak 15%. Na ovaj način uzorke noktiju smo "očistili" od keratina i gljivični elementi su sada mogli nesmetano da porastu na podlogama. Xess i sradnici su takođe primetili veći procenat pozitivnih nalaza kultura u kojima su uzorci noktiju prethodno bili tretirani tripsinom (Xess et al, 2004). S druge strane, iako tripsin vrši odličnu razgradnju keratina i znatno povećava

osetljivost kultivisanja, metoda je prilično zahtevna za rutinski rad što je i razlog njenog nedovoljnog korišćenja (Shemer et al, 2009).

Tinea incognito je medicinski termin kojim se označava infekcija dermatofitima koja nije prepoznata kao takva i pogrešno je lečena lokalnim ili sistemskim kortikosteroidima. Veoma često i sami pacijenti utiču na nastanak ovog stanja s obzirom da samoinicijativno započinju lečenje. Usled neadekvatne terapije gube se karakteristični znaci i simptomi gljivične infekcije, što dodatno otežava pravilno dijagnostikovanje oboljenja. Pogrešna dijagnoza produžava trajanje bolesti kod pacijenata usled čega može doći do širenja infekcije na druge nokte kao i na druga tkiva. Osim toga povećavaju se i troškovi lečenja onihomikoze, povezani sa ponovnim dolaskom pacijenata na pregled i zbog korišćenja neadekvatnih lekova (Markus et al, 2001).

U ovoj studiji je po prvi put u Srbiji korišćena molekularna metodologija u cilju laboratorijske potvrde dijagnoze onihomikoza. Tradicionalno, onihomikoza se u našoj zemlji dijagnostikuje konvencionalnim laboratorijskim metodama. U većini laboratorija u Srbiji rutinska dijagnoza onihomikoze se najčešće postavlja kombinacijom DMP sa KOH i zasejavanjem na SDA. Usled niske osetljivostivih metoda kod velikog broja pacijenata klinička dijagnoza nije mogla biti potvrđena laboratorijskim testovima. Uprkos jasnog prisustva gljivičnih elemenata u DMP, kulture su kod skoro polovine ovih uzoraka (56,48%) ostale negativne. U takvim situacijama najčešće se uzima novi uzorak od pacijenata i potrebno je još minimum 3-4 nedelje odvojiti za dodatne laboratorijske analize. Međutim, i pored toga ishod laboratorijskih analiza u većini slučajeva nije bio na zadovoljavajućem nivou. Većina ovih pacijenata je lečena empirijski usled nemogućnosti da se jasno dokaže postojanje infekcije.

Nekoliko skorašnjih studija, koje su koristile komercijalne multipleks kitove za dijagnozu onihomikoza, pokazale su dobru osetljivost u kliničkim uslovima (Kondori et al, 2010; Mehlig et al, 2014). U našoj studiji koristili smo komercijalni PCR kit za detekciju dermatofita uopšteno (pan-derm marker) kao i za specifičnu detekciju *T. rubrum*. S obzirom da, koliko je nama poznato, ne postoje epidemiološki podaci o onihomikozi u Srbiji, ali uzimajući u obzir zemlje iz našeg okruženja (Tchernev et al, 2013) kao i na osnovu našeg iskustva baziranog na pilot studijama koje su nedavno rađene u našoj zemlji, primetili smo visoku prevalenciju dermatofita sa predominacijom *T. rubrum*. Ovakva situacija je primećena i u zemljama severne Evrope u kojima je dermatofit PCR kit uspešno uveden u rutinsku

laboratorijsku dijagnozu onihomikoze (Drakensjo et Chryssanthou, 2011; Brillowska-Dabrowska et al, 2010).

U našoj studiji klinička evaluacija dermatofit PCR kita potvrdila je višu dijagnostičku osetljivost u poređenju sa konvencionalnim metodama dijagnostike. Proces ekstrakcije DNK u okviru komercijalnog kita je veoma jednostavan i brz, svega 15 minuta. PCR je pokazao višu stopu pozitivnosti u poređenju sa bilo kojom konvencionalnom metodom, čak i u odnosu na kombinaciju BP+RSDA, koja se pokazala kao najbolja kombinacija konvencionalnih testova (44,92% vs. 38,50%). Osim toga, većina uzoraka koji su bili PCR pozitivni, a na kulturama nije ništa poraslo, takođe su bili DMP pozitivni što ukazuje da ova razlika nije nastala usled kontaminacije. Potencijalan rizik prilikom izvođenja konvencionalnog PCR upravo predstavlja mogućnost kontaminacije uzoraka i dobijanja lažno pozitivnih rezultata. Međutim, izvođenje pojedinih koraka PCR testa u različitim laboratorijama (postavljanje PCR reakcije u jednoj, a analiza PCR produkata u drugoj laboratoriji) i poštovanje osnovnih načela dobre laboratorijske prakse prilikom izvođenja PCR reakcije smanjuje se mogućnost kontaminacije.

Pojedine studije su pokazale da je cena analize, računata po uzorku, prilikom izvođenja konvencionalnog PCR skoro istovetna kao i prilikom tradicionalne laboratorijske dijagnostike onihomikoza (Kardjeva et al, 2006). Korišćenjem PCR smanjuju se dodatni troškovi kao i neophodnost pacijenata da ponovo dolaze na pregled. Osim toga, smanjuje se i potreba za dodatnim laboratorijskim testovima kao i obimnost posla. S obzirom da ne zahteva dodatnu aparaturu, laboratorije koje se već bave molekularnom dijagnostikom mogu veoma jednostavno uvrstiti ovakav vid dijagnostike u rutinski rad. Vreme potrebno za izdavanje rezultata smanjuje se sa 21 dan na svega 5 časova, što znatno unapređuje dosadašnju dijagnostiku. Identifikacija do nivoa vrste je znatno unapređena upotrebom PCR (80,42% vs. 55,26%) omogućavajući rano započinjanje specifične antimikotične terapije. Na ovaj način smanjuje se broj nepotrebno lečenih pacijenata kao i neželjenih efekata primene antimikotika. Imajući u vidu sve gore navedeno, smanjuju se i ukupni troškovi laboratorijske dijagnoze i lečenja po pacijentu. Uvođenjem molekularne dijagnostike onihomikoza u rutinsku laboratorijsku praksu u Srbiji omogućava se brza, ali prevashodno pouzdana laboratorijska dijagnostika koja je prilagođena našoj lokalnoj epidemiološkoj situaciji kao i ekonomskim prilikama. Na taj način je moguća primena ciljane antimikotične terapije na identifikovane vrste dermatofita, što omogućava kontrolu i epidemiološki nadzor nad gljivičnim

infekcijama, kao i smanjenje neželjenih efekata primene antimikotika i troškova lečenja (Farhi et al, 2011).

Onihomikoza je oboljenje koje je široko rasprostranjeno u opštoj populaciji. Procene su da oko 3-5% opšte populacije boluje od ovog oboljenja, a čak 5-15% osoba starijih od 65 godina (Pierard, 2001). Prema pojedinim studijama učestalost onihomikoze se kod osoba starijih od 60 godina kreće do čak 20-30% (Gupta et al, 2000; Faergemann et Baran, 2003; Sigurgeirsson et Steingrimsson, 2004). Prema rezultatima naše studije uzrast pacijenata je bio značajno povezan sa nastankom onihomikoze, nezavisno od ostalih faktora rizika. Mnoge studije su ukazale da uzrast predstavlja značajan faktor rizika za nastanak ovog oboljenja (Perea et al, 2000; Sais et al, 1995; Heikkila et Stuff, 1995). Saunte i saradnici su pokazali da učestalost javljanja onihomikoze raste sa godinama i da je najveća ušestalost kod osoba starijih od 60 godina, što je u skladu i sa rezultatima naše studije (Saunte et al, 2008). Stariji pacijenti su skloniji nastanku onihomikoze usled postojanja strukturalnih promena na noktima, promenama u imunskom odgovoru na infekcije kao i usled dužeg kontakta noktiju sa gljivama koje su neminovno prisutne u životnom okruženju. Usled mehaničkih i strukturalnih promena, kao i usled smanjenog imenskog kapaciteta kože, starije osobe su sklonije nastanku oboljenja kože i njenih adneksa, uključujući i onihomikozu (Pierard, 2001). Osim toga produžavanjem životnog veka veća je verovatnoća da osoba ima druga udružena stanja, često hronična oboljenja, kao što je dijabetes i kompromitovana periferna cirkulacija koja dovode do sporijeg rasta noktiju pa je veća verovatnoća da nastane infekcija ukoliko osoba dođe u kontakt sa gljivama (Kaur et al, 2008). S druge strane, osobe mlađe od 55 godina češće se javljaju lekaru u ranim fazama oboljenja. Takođe, mlađe osobe mnogo više polažu na izgled noktiju pa je estetski aspekt verovatno presudan za rano javljanje lekaru na pregled (Ghannoum et al, 2000).

Prema rezultatima naše studije postojanje onihomikoze kod još nekog člana porodice je bilo značajno povezano sa nastankom ovog oboljenja, nezavisno od ostalih faktora rizika. Pojedini autori smatraju da genetska predispozicija igra veoma značajnu ulogu za nastanak onihomikoze i da se oboljenje nasleđuje po autozomno dominantnom tipu nasleđivanja (Zaias et al, 1998). Sigurgeirsson i saradnici takođe smatraju da u Islandskoj populaciji genetika igra značajnu ulogu za nastanak onihomikoza s obzirom na dugotrajnu izolovanost tokom vekova za koju se pretpostavlja da je doprinela visokoj genetskoj homogenosti stanovništva (Sigurgeirsson et al, 2002a). S druge strane, u Turskoj je veoma česta pojava da dve ili više generacija žive zajedno, pa postoji mogućnost prenosa onihomikoze među članovima

zajedničkog domaćinstva putem direktnog i indirektnog kontakta. U takvim uslovima stanovanja prenos antropofilnih dermatofita među članovima istog domaćinstva je posebno olakšana korišćenjem zajedničkih peškira, papuča, čarapa kao i upotrebom zajedničkog pribora za održavanje higijene noktiju (Yenisehirli et al, 2009). Slična je situacija i u našoj zemlji, posebno u ruralnim delovima. Pozitivna porodična anamneza na onihomikozu je prepoznata i kao faktor rizika za ponovno javljanje oboljenja kod osoba koje su već ranije imale onihomikozu. Ponovno javljanje oboljenja može nastati usled relapsa infekcije, kada prethodna infekcija nije bila u potpunosti izlečena ili da se javi kao reinfekcija, kao potpuno nova infekcija posle postizanja kompletnog izlečenja (Scher et Baran, 2003).

Na osnovu rezultata naše studije pojačano znojenje je bilo značajno povezano sa nastankom onihomikoze, nezavisno od ostalih faktora rizika. Brojne studije su pokazale da pojačano znojenje nogu utiče na veću verovatnoću nastanka onihomikoze (Ghannoum et al, 2012; Kaur et al, 2008, Gupta et al, 2007). Pojačano znojenje često se javlja kod osoba koje nose zatvorenu obuću. Pichardo-Geisinger i saradnici su pokazali da fizički radnici koje nose zatvorenu obuću najveći deo dana češće oboljevaju od onihomikoze (Pichardo-Geisinger et al, 2014). Takođe, pojačano znojenje je primećeno i kod osoba koje se bave sportom usled nošenja sportske obuće (Ghannoum et al, 2000). Prilikom nošenja zatvorene obuće pojačava se znojenje nogu, a maceracija i mikrotraume noktiju koje nastaju usled rada ili sportskih aktivnosti dodatno olakšavaju gljivama da uspostave infekciju (Gupta et al, 2007). Na izbor obuće utiče i geografsko područje, odnosno klimatski uslovi. Primećeno je da u severnijim zemljama, sa dugim i hladnim zimama populacija češće oboleva od onihomikoze (Sigurgeirsson et al, 2002a). S druge strane pojačano znojenje stopala je stanje koje imaju osobe sa plantarnom odnosno palmoplantarnom hiperhidrozom kod kojih takođe postoji veća verovatnoća nastanka onihomikoze (Walling, 2009).

U našoj studiji vrednosti SCIO indeksa su bile značajno više kod pacijenata sa onihomikozom. Takođe i kada smo posmatrali pojedinačne komponente koje ulaze u sastav SCIO indeksa pacijenti sa laboratorijski potvrđenom dijagnozom onihomikoze su značajno češće imali veću zahvaćenost nokatne ploče patološkim procesom, viši stepen zadebljanja nokta, značajno češće su imali zahvaćeno više od 2 prsta onihomikozom i kod njih je onihomikoza bila značajno češće lokalizovana na palcu na nozi. Međutim, na osnovu rezultata MLRA samo viši stepen zadebljanja nokatne ploče je bio nezavisno povezan sa nastankom onihomikoze. Ghannoum i saradnici su pokazali da je čak 4 puta veća verovatnoća da osobe sa zadebljanjem nokatne ploče obole od onihomikoze (Ghannoum et al,

2000). Zadebljanje nokatne ploče veoma često se javlja posle traume nokta. Kod muškaraca se uglavnom javlja kao posledica upražnjavanja sportskih aktivnosti (česte trauma nokta i onihomikoza kod fudbalera), dok je kod žena češće povezana sa nošenjem tesnih cipela usled praćenja modnih trendova (Tchernev et al, 2013). U našoj studiji najčešća lokalizacija onihomikoze je bila na palcu na nogama što je u skladu i sa rezultatima većine studija (Nazar et al, 2012). Naime, palac je prst koji ima najveću površinu i koji trpi najveći pritisak prilikom nošenja obuće (Kaur et Puri, 2012). Zadebljanje nokatne ploče češće se javlja kod starijih osoba kao posledica promena na noktima koje nastaju usled starenja kao i usled ponavljanih trauma nokatne ploče koje se neminovno javljaju tokom života (Kaur et al, 2008).

Zaključci

6. Zaključci

Na osnovu rezultata dobijenih u ovoj studiji, izvedeni su sledeći zaključci:

1. Najzastupljeniji klinički oblik onihomikoze kod naših pacijenata je bila distalna i lateralna subungvalna onihomikoza (92,51%).
2. Na osnovu vrednosti SCIO indeksa 178 (47,59%) pacijenata je indikovano za sistemsku antimikotičnu terapiju.
3. Kod 190/374 (50,8%) pacijena sa kliničkom sumnjom na onihomikozu dijagnoza je potvrđena laboratorijskim testovima, dok je kod čak 20% bio pozitivan samo PCR.
4. Najčešći izazivači onihomikoze su bili dermatofiti (88,95%), a u manjem procentu kvasnice (6,84%) i nedermatofitne plesni (4,21%).
5. Onihomikoza je bila 6 puta češće lokalizovana na noštima na nogama u odnosu na nošte na rukama (163:27).
6. Najčešći izazivači onihomikoze na noštima na nogama su dermatofiti 95,1% sa dominacijom *T. rubrum*.
7. Na noštima na rukama su dermatofiti su bili potvrđeni u 52%, a kvasnice u 44% slučajeva.

8. PCR je pokazao najbolje dijagnostičke performanse u laboratorijskoj potvrdi dijagnoze onihomikoze na noktima na nogama.

9. Kombinacija Blankophor i RSDA je pokazala najbolje dijagnostičke performanse u laboratorijskoj potvrdi dijagnoze onihomikoze na noktima na rukama.

10. Tretiranjem uzoraka noktiju tripsinom povećana je osetljivost svih ispitivanih metoda konvencionalne mikološke laboratorijske dijagnostike, kako direktnog mikroskopskog preparata ($p < 0,001$), tako i kultivisanja na svim ispitivanim mikološkim podlogama (SDA, RSDA, DTM) ($p < 0,001$).

11. Nezavisni faktori rizika, na osnovu rezultata multivarijantne ločističke regresione analize, koji su značajno povezani sa nastankom onihomikoze su:

- stariji uzrast (UO=2,33; $p < 0,001$)
- pozitivna porodična anamneza za onihomikozu (UO=2,71; $p = 0,001$)
- pojačano znojenje nogu (UO=2,28; $p = 0,001$)
- viši stepen zadebljanja nokta (UO=2,04; $p < 0,001$).

Literatura

7. Literatura

Abanmi A, Bakheshwain S, El Khizzi N, Zouman AR, Hantirah S, Al Harthi F, Al Jamal M, Rizvi SS, Ahmad M, Tariq M. (2008). Characteristics of superficial fungal infections in the Riyadh region of Saudi Arabia. *Int J Dermatol* 47:229-35.

Abdelrahman T, Letscher Bru V, Waller J, Noacco G, Candolfi E. (2006). Dermatomycosis: comparison of the performance of calcofluor and potassium hydroxide 30% for the direct examination of skin scrapings and nails. *J Mycol Med* 16:87-91.

Alexander CL, Shankland GS, Carman W, Williams C. (2011). Introduction of a dermatophyte polymerase chain reaction assay to the diagnostic mycology service in Scotland. *Br J Dermatol* 164:966-72.

Almeida SR. (2008). Immunology of dermatophytosis. *Micopathologia* 166:277–83.

Ameen M, Lear JT, Madan V, Mohd Mustapa MF, Richardson M. (2014). British association of dermatologists guidelines for the management of onychomycosis 2014. *Br J Dermatol* 171:937-58.

Arenas R, Bonifaz A, Padilla MC, Arce M, Atoche C, Barba J, Campos P, Fernández R, Mayorga J, Nazar D, Ocampo J. (2010). Onychomycosis. A Mexican survey. *Eur J Dermatol* 20:611-4.

Arrese JE, Pierard-Franchimont C, Pierard GE. (1996). Fatal hyalohyphomycosis following *Fusarium* onychomycosis in an immunocompromised patient. *Am J Dermatopathol* 18:196-8.

Asadi MA, Dehghani R, Sharif MR. (2009). Epidemiologic study of onychomycosis and tinea pedis in Kashan, Iran. *Jundishapur J Microbiol* 2:61-4.

Aspiroz C, Fortuño Cebamanos B, Rezusta A, Paz-Cristóbal P, Domínguez-Luzón F, Gené Díaz J, Gilaberte Y. (2011). Photodynamic therapy for onychomycosis. Case report and review of the literature. *Rev Iberoam Micol* 28:191-3.

Baker SJ, Zhang YK, Akama T, Lau A, Zhou H, Hernandez V, Mao W, Alley MR, Sanders V, Plattner JJ. (2006). Discovery of a new boroncontaining antifungal agent, 5-fluoro-1,3-dihydro-1-hydroxy-2,1- benzoxaborole (AN2690), for the potential treatment of onychomycosis. *J Med Chem* 49:4447-50.

Barak O, Loo, DS. (2007). AN-2690, a novel antifungal for the topical treatment of onychomycosis. *Curr Opin Investig Drugs* 8:662-8.

Baran R, Hay R, Haneke E, Tosti A, editors (2006). Onychomycosis: The current approach to diagnosis and therapy. London: *Informa Healthcare*.

Baran R, Kaoukhov A. (2005). Topical antifungal drugs for the treatment of onychomycosis: an overview of current strategies for monotherapy and combination therapy. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 19:21–9.

Baran R, Hay RJ. (1985). Partial surgical avulsion of the nail in onychomycosis. *Clin Exp Dermatol* 10:413-8.

Beifuss B, Bezold G, Gottlober P, Borelli C, Wagener J, Schaller M, Korting HC. (2011). 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* 54:137–45.

Bergmans AM, van der Ent M, Klaassen A, Böhm N, Andriessse GI, Wintermans RG. (2010). Evaluation of a single-tube real-time PCR for detection and identification of 11 dermatophyte species in clinical material. *Clin Microbiol Infect* 16:704–10.

Bohn M, Kraemer KT. (2000). Dermatopharmacology of ciprolox nail laquer topical solution 8% in the treatment of onychomycosis. *J Am Acad Dermatol* 43:S57-69.

Bokhari MA, Hussain I, Jahangir M, Haroon TS, Aman S, Khurshid K. (1999). Onychomycosis in Lahore, Pakistan. *Int J Dermatol* 38:591-5.

Borovoy M, Tracy M. (1992). Noninvasive CO₂ laser fenestration improves treatment of onychomycosis. *Clin Laser Mon* 10:123-4.

Bramono K, Budimulja U. (2005). Epidemiology of onychomycosis in Indonesia: data obtained from three individual studies. *Jpn J Med Mycol* 46:171-6.

Brasch J, Beck-Jendroschek V, Glaser R. (2011). Fast and sensitive detection of *Trichophyton rubrum* in superficial tinea and onychomycosis by use of a direct polymerase chain reaction assay. *Mycoses* 54:e313–e317.

Brillowska-Dabrowska A, Nielsen SS, Nielsen HV, Arendrup MC. (2010). Optimized 5-h multiplex PCR test for the detection of tinea unguium: performance in a routine PCR laboratory. *Med Mycol* 48:828–31.

Brillowska-Dabrowska A, Saunte DM, Arendrup MC. (2007). Five-hour diagnosis of dermatophyte nail infections with specific detection of *Trichophyton rubrum*. *J Clin Microbiol* 45:1200-4.

Brown GD, Herre J, Williams DL, Willment JA, Marshall ASJ, Gordon S. (2003). Dectin-1 mediates the biological effects of β -glucans. *J Exp Med* 197:1119–24.

Campos MRM, Russo M, Gomes E, Almeida SR. (2006). Stimulation, inhibition and death of macrophages infected with *Trichophyton rubrum*. *Microbes Infect* 8:372–9.

Caputo R, De Boule K, Del Rosso J, Nowicki R. (2001). Prevalence of superficial fungal infections among sports-active individuals: results from the Achilles survey, a review of the literature. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 15:312-6.

Chaitra P, Bala NK. (2014). Onychomycosis: insights in disease development. *Muller J Med Sci Res* 5:101-5.

Clemons KV, Schär G, Stover EP, Feldman D, Stevens DA. (1998). Dermatophyte-hormone relationships: Characterization of progesterone-binding specificity and growth inhibition in the genera *Trichophyton* and *Microsporum*. *J Clin Microbiol* 26:2110-5.

Cribier B, Mena ML, Rey D, Partisani M, Fabien V, Lang JM, Grosshans E. (1998). Nail changes in patients infected with human immunodeficiency virus. A prospective controlled study. *Arch Dermatol* 134:1216-20.

Dawson CO, Gentles JC. (1961). The perfect states of *Keratinomyces ajelloi* Vanbreuseghem, *Trichophyton terrestre* Durie and Frey and *Microsporum nanum* Fuentes. *Sabouradia* 1:49-57.

De Bernardis F, Liu H, O'Mahony R, La Valle R, Bartollino S, Sandini S, Grant S, Brewis N, Tomlinson I, Bassett RC, Holton J, Roitt IM, Cassone A. (2007). Human domain

antibodies against virulence traits of *Candida albicans* inhibit fungus adherence to vaginal epithelium and protect against experimental vaginal candidiasis. *J Infect Dis* 195:149–57.

Degreef H. (2008). Clinical Forms of Dermatophytosis (Ringworm Infection) *Mycopathologia* 166:257–65.

Denning DW, Evans EG, Kibbler CC, Richardson MD, Roberts MM, Rogers TR, Warnock DW, Warren RE. (1995). Fungal nail disease: a guide to good practice (Report of a Working Group of the British Society for Medical Mycology). *Br Med J* 311:1277-81.

Diongue K, Diallo MA, Badiane AS, Seck MC, Ndiaye M, Ndoye NW, Ndiaye YD, Dieye B, Déme A, Ndiaye IM, Ndir O, Ndiaye D. (2015). Nondermatophytic and noncandidal fungi isolated in Le Dantec University hospital of Dakar in 2014: Epidemiological, clinical and mycological study. *J Mycol Med* 25:181-90.

Dolenc-Voljč M. Dermatophyte infections in the Ljubljana region, Slovenia, 1995-2002. (2005). *Mycoses* 48:181-6.

Drakensjö IT, Chryssanthou E. (2011). Epidemiology of dermatophyte infections in Stockholm, Sweden: a retrospective study from 2005-2009. *Med Mycol* 49:484–8.

Ebihara M, Makimura K, Sato K, Abe S, Tsuboi R. (2009). Molecular detection of dermatophytes and nondermatophytes in onychomycosis by nested polymerase chain reaction based on 28S ribosomal RNA gene sequences. *Br J Dermatol* 161:1038-44.

Effendy I, Lecha M, Feuilhade de Chauvin M, Di Chiacchio N, Baran R. (2005). Epidemiology and clinical classification of onychomycosis. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 19:8-12.

Elewski BE, Leyden J, Rinaldi MG, Atillasoy E. (2002). Office practice-based confirmation of onychomycosis: a US nationwide prospective survey. *Arch Intern Med* 162:2133-8.

Emmons CW. (1934). Dermatophytes. Natural grouping based on the form of the spores and accessory organs. *Arch Dermatol Syphilol* 30:337-62.

Esquenazi D, Alviano CS, de Souza W, Rozental S. (2004). The influence of surface carbohydrates during in vitro infection of mammalian cells by the dermatophyte *Trichophyton rubrum*. *Res Microbiol* 155:144–53.

Evans EGV. (2003). Drug synergies and the potential for combination therapy in onychomycosis. *Br J Dermatol* 149:11-3.

Faergemann J, Baran R. (2003). Epidemiology, clinical presentation and diagnosis of onychomycosis. *Br J Dermatol* 149:1-4.

Faergemann J, Correia O, Nowicki R, Ro BI. (2005). Genetic predisposition – understanding underlying mechanisms of onychomycosis. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 19:17-19.

Farhi D, Savary J, Pansart S, Hesse S. (2011). Etude prospective des onychomycoses des pieds en France: prevalence, aspect clinique, impact et prise en charge en medecine generale. *J Mycol Med* 21:266-72.

Frankum LE, Nightengale B, Russo M, Sarnes M. (2005). Pharmacoeconomic analysis of sequential treatment pathways in the treatment of onychomycosis. *Manage Care Interface* 18:55-63.

Garcia-Doval I, Cabo F, Monteagudo B, Alvarez J, Ginarte M, Rodríguez-Alvarez MX, Abalde MT, Fernández ML, Allegue F, Pérez-Pérez L, Flórez A, Cabanillas M, Peón G, Zulaica A, Del Pozo J, Gomez-Centeno P. (2010). Clinical diagnosis of toenail onychomycosis is possible in some patients: cross-sectional diagnostic study and development of a diagnostic rule. *Br J Dermatol* 163,743-51.

Garg J, Tilak R, Garg A, Prakash P, Gulati AK, Nath G. (2009). Rapid detection of dermatophytes from skin and hair. *BMC Res Notes* 2:60.

Garg A, Venkatesh V, Singh M, Pathak KP, Kaushal GP, Agrawal SK. (2004). Onychomycosis in central India: A clinicoetiologic correlation. *Int J Dermatol* 43:498-502.

Ghannoum MA, Hajjeh RA, Scher R, Konnikov N, Gupta AK, Summerbell R, Sullivan S, Daniel R, Krusinski P, Fleckman P, Rich P, Odom R, Aly R, Pariser D, Zaiac M, Rebell G, Leshner J, Gerlach B, Ponce-De-Leon GF, Ghannoum A, Warner J, Isham N, Elewski B. (2000). A large-scale North American study of fungal isolates from nails: the frequency of onychomycosis, fungal distribution, and antifungal susceptibility patterns. *J Am Acad Dermatol* 2000 43:641-8.

Ginter-Hanselmayer G, Weger W, Smolle J. (2008). Onychomycosis: a new emerging infectious disease in childhood population and adolescents. Report on treatment experience with terbinafine and itraconazole in 36 patients. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 22:470-5.

Girmenia C, Arcese W, Micozzi A. (1992). Onychomycosis as a possible origin of disseminated *Fusarium* spp. infection in a patient with severe aplastic anemia. *Clin Infect Dis* 14:1167.

Gong JQ, Liu XQ, Xu HB, Zeng XS, Chen W, Li XF. (2007). Deep dermatophytosis caused by *Trichophyton rubrum*: report of two cases. *Mycoses* 50:102–8.

Grappell SF, Blank F. (1972). Role of keratinases in dermatophytosis. Immune responses of guinea pigs infected with *Trichophyton mentagrophytes* and guinea pigs immunized with keratinases. *Dermatologica* 145:245–55.

Graser Y, Scott J, Summerbell R. (2008). The new species concept in dermatophytes – a polyphasic approach. *Mycopathologia* 166:239–56.

Graser Y, De Hoog S, Summerbell RC. (2006). Dermatophytes: recognizing species of clonal fungi. *Med Mycol* 44:199–209.

Graser Y, Kuijpers AF, Presber W, de Hoog GS. (2000). Molecular taxonomy of the *Trichophyton rubrum* complex. *J Clin Microbiol* 38:3329–36.

Grover C, Khurana A. (2012). Onychomycosis: newer insights in pathogenesis and diagnosis. *Indian J Dermatol Venereol Leprol* 2012;78:263-70.

Gruby M. (1843). Recherches sur la nature, le siège et le développement du Porrigo decalvans ou Phytoalopécie. *C R Acad Sci, Paris* 17:301-3.

Grumbt M, Monod M, Yamada T, Hertweck C, Kunert J, Staib P. (2013). Keratin degradation by dermatophytes relies on cysteine dioxygenase and a sulfite efflux pump. *J Invest Dermatol* 133:1550-5.

Gunasekera HKTA, Nagahawatta A, De Silva N. (2011). An alternative technique for collecting nail specimens for mycological investigations. *Sri Lankan J Infect Dis* 1:24-6.

Gupta AK, Cooper EA. (2008). Update in Antifungal Therapy of Dermatophytosis. *Mycopathologia* 166:353–67.

Gupta M, Sharma NL, Kanga AK, Mahajan VK, Tegta GR. (2007a). Onychomycosis: clinic-mycologic study of 130 patients from Himachal Pradesh, India. *Indian J Dermatol Venereol Leprol* 73:389-92.

Gupta AK, Zaman M, Singh J. (2007b). Fast and sensitive detection of *Trichophyton rubrum* DNA from the nail samples of patients with onychomycosis by a double-round polymerase chain reaction-based assay. *Br J Dermatol* 157:698–703.

Gupta AK, Ryder JE, Chow M, Cooper EA. (2005). Dermatophytosis: the management of fungal infections. *Skinmed* 4:305–10.

Gupta AK, Ryder JE, Skinner AR. (2004). Treatment of onychomycosis: pros and cons of antifungal agents. *J Cutan Med Surg* 8:25–30.

Gupta AK, Ryder J, Bluhm R. (2003). Onychomycosis. In: Williams H, Bigby M, Diepgen T, Herxheimer A, Naldi L, Rzany B, editors. Evidence based dermatology. London: *BMJ Books*; p. 441–68.

Gupta AK, Gupta MA, Summerbell RC, Cooper EA, Konnikov N, Albreski D, MacDonald P, Harris KA. (2000a). The epidemiology of onychomycosis: possible role of smoking and peripheral arterial disease. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 14:466-9.

Gupta AK, Tabora P, Tabora V, Gilmour J, Rachlis A, Salit I, Gupta MA, MacDonald P, Cooper EA, Summerbell RC. (2000b). Epidemiology and prevalence of onychomycosis in HIV-positive individuals. *Int J Dermatol* 39:746-53.

Gupta AK, Jain HC, Lynde CW, Macdonald P, Cooper EA, Summerbell RC. (2000c). Prevalence and epidemiology of onychomycosis in patients visiting physician offices: a multicenter Canadian survey of 15000 patients. *J Am Acad Dermatol* 43:244-8.

Gupta AK, Konnikov N, MacDonald P, Rich P, Rodger NW, Edmonds MW, McManus R, Summerbell RC. (1998). Prevalence and epidemiology of toenail onychomycosis in diabetic subjects: a multicentre survey. *Br J Dermatol* 139:665-71.

Hajoui FZM, Zeroual Z, Ghfir B, Moustachi A, Lyagoubi M, Aoufi S. (2012). Les onychomycoses a moisissure au Maroc: a propos de 150 cas isoles en 20 ans. *J Micol Med* 22:221-4.

Hamer EC, Moore CB Denning DW. (2006). Comparison of two fluorescent whiteners, Calcofluor and Blankophor, for the detection of fungal elements in clinical specimens in the diagnostic laboratory *Clin Microbiol Infect*12:181-4.

Hashemi SJ, Gerami M, Zibafar E, Daei M, Moazeni M, Nasrollahi A. (2009). Onychomycosis in Teheran: mycological study of 504 patients. *Mycoses* 53:251-5.

Hay RJ, Baran R, Haneke E (2001). Fungal (onychomycosis) and other infections involving the nail apparatus. In: Baran R, Dawber RPR, de Berker DAR, Haneke E, Tosti A, editors. Baran and Dawber's diseases of the nails and their management. *Osney Mead, Oxford: Blackwell Science Ltd*: 129–71.

Heikkila H, Stuff S. (1995). The prevalence of onychomycosis in Finland. *Br J Dermatol* 133:699-703.

Hochman LG. (2011). Laser treatment of onychomycosis using a novel 0.65-millisecond pulsed Nd:YAG 1064-nm laser. *J Cosmet Las Ther* 13:2-5.

Hohenleutner U. (2010). Innovations in dermatologic laser therapy. *Hautarzt* 61:410-5.

Hoog GS, Guarro J, Gene J, Figueras MJ. (2000). Atlas of clinical fungi. *Centraalbureau voor Schimmelcultures, Universitat Rovira i Virgili*.

Hui X, Baker SJ, Wester RC, Barbadillo S, Cashmore AK, Sanders V, Hold KM, Akama T, Zhang YK, Plattner JJ, Maibach HI. (2007). In vitro penetration of a novel oxaborole antifungal (AN2690) into the human nail plate. *J Pharm Sci* 96:2622-31.

Jayatilake JA, Tilakaratne WM, Panagoda GJ. (2009). *Candida* onychomycosis: A mini-review. *Mycopathologia* 168:165-73.

Jensen RH, Arendrup MC. (2012). Molecular diagnosis of dermatophyte infections. *Curr Opin Infect Dis* 25:126-34.

Jesudanam TM, Rao GR, Lakshmi DJ, Kumari GR (2002). Onychomycosis: a significant medical problem. *Indian J Dermatol Venereol Leprol* 68:326-9.

Kac G. (2000). Molecular approaches to the study of dermatophytes. *Med Mycol* 38:329–36.

Kalinin AE, Kajava AV, Steinert PM. (2000). Epithelial barrier function: assembly and structural features of the cornified cell envelope. *BioEssays* 24:789–800.

Kamp H, Tietz HJ, Lutz M, Piazena H, Sowyrda P, Lademann J, Blume-Peytavi U. (2005). Antifungal effect of 5-aminolevulinic acid PDT in *Trichophyton rubrum*. *Mycoses* 48:101-7.

Kanbe T. (2008). Molecular approaches in the diagnosis of dermatophytosis. *Mycopathologia* 166:307–17.

Kane J, Summerbell R, Sigler L, Krajden S, Land G. (1997). Laboratory handbook of dermatophytes. *Belmont, USA: Star Publ.*

Kane J, Krajden S, Summerbell RC, Sibbald RG. (1990). Infections caused by *Trichophyton raubitschekii*: clinical and epidemiological features. *Mycoses* 33:499–506.

Kano R, Hirai A, Muramatsu M, Watari T, Hasegawa A. (2003). Direct detection of dermatophytes in skin samples based on sequences of the chitin. *J Vet Med Sci* 1:2–5.

Kardjeva V, Summerbell R, Kantardjiev T, Devliotou-Panagiotidou D, Sotiriou E, Gräser Y.(2006). Forty-eight-hour diagnosis of onychomycosis with subtyping of *Trichophyton rubrum* strains. *J Clin Microbiol* 44:1419–27.

Kaufman G, Horwitz BA, Duek L, Ullman Y, Berdicevsky I. (2007). Infection stages of the dermatophyte pathogen *Trichophyton*: microscopic characterization and proteolytic enzymes. *Med Mycol* 45:149–55.

Kaur T, Puri N. (2012). Onychomycosis – a clinical and mycological study of 75 cases. *Our Dermatol Online* 3:172-7.

Kaur R, Kashyap B, Bhalla P. (2008). Onychomycosis - epidemiology, diagnosis and management. *Indian J Med Microbiol* 26:108-16.

Kim JY, Choe YB, Ahn KJ, Lee YW.(2011). Identification of dermatophytes using multiplex polymerase chain reaction. *Ann Dermatol* 23:304–12.

Kondori N, Abrahamsson AL, Ataollahy N, Wenneras C. (2010). 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* 48:1005–8.

Kopp E, Medzhitov R. (2003). Recognition of microbial infection by Toll-like receptors. *Curr Opin Immunol* 15:396–401.

Koussidou T, Devliotou-Panagiotidou D, Karakatsanis G, Minas A, Mourellou O. (2002). Onychomycosis in Northern Greece during 1994-1998. *Mycoses* 45:29-37.

Kunert J. (1972). Keratin decomposition by dermatophytes: evidence of the sulphitolysis of the protein. *Experientia* 28:1025–6.

Kwon-Chung KJ, Bennett JE. (1992). Medical mycology. *Philadelphia USA: Lea & Febiger.*

Lai WY, Tang WY, Loo SK, Chan Y. (2011). Clinical characteristics and treatment outcomes of patients undergoing nail avulsion surgery for dystrophic nails. *Hong Kong Med J* 17:127-31.

Landsman AS, Robbins AH, Angelini PF, Wu CC, Cook J, Oster M, Bornstein ES. (2010). Treatment of mild, moderate, and severe onychomycosis using 870- and 930 nm light exposure. *J Am Podiatr Med Assoc* 100:166-77.

Larone DH. (1995). Medically important fungi. *ASM Press* Washington DC.

Larsen GK, Haedersdal M, Svejgaard EL. (2003). The prevalence of onychomycosis in patients with psoriasis and other skin disease. *Acta Derm Venereol* 83:206-9.

Lawry M, Haneke E, Strobeck K, Martin S, Zimmer B, Romano P. (2000). Methods for diagnosis onychomycosis. *Arch Dermatol* 136:1112-6.

Lecha M, Effendy I, Feuilhade de Chauvin M, Di Chiacchio N, Baran R. (2005). Treatment options—development of consensus guidelines. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 19:25–33.

Li XF, Tian W, Wang H, Chen H, Shen YN, G, Liu WD. (2011). Direct detection and differentiation of causative fungi of onychomycosis by multiplex polymerase chain reaction based assay. *Eur J Dermatol* 21:37–42.

Litz CE, Cavagnolo RZ. (2010). Polymerase chain reaction in the diagnosis of onychomycosis: a large, single-institute study. *Br J Dermatol* 163:511–514.

Malmsten PH. (1845). Trichophyton tonsurans, harskarande mogel. Bidrag till utredande af de sjukdomar, som valla harets affall. *Stocholm: L.J. Hjerta*.

Manevitch Z, Lev D, Hochberg M, Palhan M, Lewis A, Enk CD. (2010). Direct antifungal effect of femtosecond laser on Trichophyton rubrum onychomycosis. *Photochem Photobiol* 86:476-9.

Maraki S, Nioti E, Mantadakis E, Tselentis Y. (2007). A 7-year survey of dermatophytosis in Crete, Greece. *Mycoses* 50:481-4.

Markus R, Huzaira M, Anderson RR, González S. (2001). A better potassium hydroxide preparation? In vivo diagnosis of tinea with confocal microscopy. *Arch Dermatol* 137:1076-8.

Mehlig L, Garve C, Ritschel A, Zeiler A, Brabetz W, Weber C, Bauer A.(2014). Clinical evaluation of a novel commercial multiplex-based PCR diagnostic test for differential diagnosis of dermatomycoses. *Mycoses* 57:27-34.

Miklić P, Skerlev M, Budimčić D, Lipozenčić J. (2010). The frequency of superficial mycoses according to agents isolated during ten-year period (1999-2008) in Zagreb area, Croatia. *Acta Dermatovenerol Croat* 18:92-8.

Monod M. (2008). Secreted Proteases from Dermatophytes. *Mycopathologia* 166:285–294.

Monod M, Lechenne B, Jousson O, Grand D, Zaugg C, Stocklin R, Grouzmann E. (2005). Aminopeptidases and dipeptidyl-peptidases secreted by the dermatophyte Trichophyton rubrum. *Microbiology* 15:145–55.

Monod M, Baudrez-rosselet F, Ramelet AA, Frenk E. (1989). Direct mycological examination in dermatology: a comparison of different methods. *Dermatologica* 179:183-6.

Murray P, Rosenthal K, Pfaller M. (2013). Medical microbiology. *Elsevier Saunders Philadelphia*.

Naka W, Hanyaku H, Tajima S, Harada T, Nishikawa T. (1994). Application of neutral red staining for evaluation of the viability of dermatophytes and *Candida* in human skin scales. *J Med Vet Mycol* 32:31-5.

Nazar JR, Gerosa P, Diaz OA. (2012). Onychomycosis: epidemiologia, agentes causales y evaluacion de metodos diagnosticos de laboratorio. *Rev Argent Microbiol* 44:21-5.

Nayak S, Kavitha B, Sriram G, Saraswathi TR, Sivapathasundharam B, Dorothy AL. (2012). Comparative study of *Candida* by conventional and CHROM agar method in non-denture and denture wearers by oral rinse technique. *Indian J Dent Res* 23:490-7.

Noble SL, Forbes RC, Stamm PL. (1998). Diagnosis and management of common tinea infections. *Am Fam Physician* 58:163–8.

Nzenze Afene S, Ngoungou EB, Mabika Mamfoumbi M, Bouyou Akotet MK, Avome Mba IM, Kombila M. (2011). Les onychomycoses au Gabon: aspects cliniques et mycologiques. *J Mycol Med* 21:248-55.

Oakley A. (2009). Management of fungal nail infections. *BPJ* 19:18-23.

Ohst T, de Hoog GS, Presber W, Grasser Y. (2004). Origins of microsatellite diversity in the *Trichophyton rubrum*–*T. violaceum* clade (dermatophytes). *J Clin Microbiol* 42:4444–48.

Olafsson JH, Sigurgeirsson B, Baran R. (2003). Combination therapy for onychomycosis. *Br J Dermatol* 149:15-8.

Panasiti V, Borroni RG, Devirgiliis V, Rossi M, Fabbrizio L, Masciangelo R, Bottoni U, Calvieri S. (2006). Comparison of diagnostic methods in the diagnosis of dermatomycoses and onychomycoses. *Mycoses* 49:26–9.

Papini M, Piraccini BM, Difonzo E, Brunoro A (2013). Epidemiology of onychomycosis in Italy: prevalence data and risk factor identification. *Mycoses* 58:659-64.

Paugam A, L'Ollivier C, Viguie C, Anaya L, Mary C, de Ponfilly G, Ranque S. (2013). Comparison of real-time PCR with conventional methods to detect dermatophytes in samples from patients with suspected dermatophytosis. *J Microbiol Methods* 95:218-22.

Perea S, Ramos MJ, Garau M, Gonzalez A, Noriega AR, del Palacio A. (2000). Prevalence and Risk Factors of Tinea Unguium and Tinea Pedis in the General Population in Spain. *J Clin Microbiol* 38:3226–30.

Piraccini BM, Alessandrini A. (2015). Onychomycosis: a review. *J Fungi* 1:30-43.

Piraccini BM, Sisti A, Tosti A. (2010). Long-term follow-up of toenail onychomycosis caused by dermatophytes after successful treatment with systemic antifungal agents. *J Am Acad Dermatol* 23:411-4.

Pichardo-Geisinger R, Mora DC, Newman JC, Arcury TA, Feldman SR, Quandt SA. (2014). Comorbidity of tinea pedis and onychomycosis and evaluation of risk factors in Latino immigrant poultry processing and other manual laborers. *South Med J* 107:374-9.

Pierard G. (2001). Onychomycosis and other superficial fungal infections of the foot in the elderly: a pan-European survey. *Dermatology* 202:220-4.

Potter LP, Mathias SD, Raut M, Kianifard F, Landsman A, Tavakkol A. (2007). The impact of aggressive debridement used as an adjunct therapy with terbinafine on perceptions of patients undergoing treatment for toenail onychomycosis. *J Dermatolog Treat* 18:46–52.

Qureshi HS, Ormsby HA, Kapadia N. (2004). Effects of modified sample collection technique on fungal culture yield: nail clipping/scraping versus microdrill. *J Pak Med Assoc* 54:301-5.

Reloso S, Arechavala A, Guelfand L, Maldonado I, Walker L, Agorio I, Reyes S, Giusiano G, rojas F, Flores V, Capece P, Posse G, Nicola F, Tutzer S, Bianchi M. (2012). Onicomycosis: estudio multicentrico, epidemiologico y micologico. *Rev Iberoam Micol* 29:157-63.

Ribeiro CS, Zaitz C, Framil VM, Ottoboni TS, Tonoli MS, Ribeiro RP (2015). Descriptive study of onychomycosis in a hospital in São Paulo. *Braz J Microbiol* 46:485-92.

Rich P, Harkless L, Atillasoy E. (2003). Dermatophyte test medium culture for evaluating toenail infections in patients with diabetes. *Diabetes Care* 26:1480-4.

Robert R, Pihet M. (2008). Conventional methods for the diagnosis of dermatophytosis. *Mycopathologia* 166:295-306.

Roberts DT, Taylor WD, Boyle J. (2003). Guidelines for treatment of onychomycosis. *Br J Dermatol* 148:402-10.

Romano C, Gianni C, Difonzo EM. (2005). Retrospective study of onychomycosis in Italy: 1985-2000. *Mycoses* 48:42-4.

Ryder Ns, Favre B. (1997). Antifungal activity and mechanism of action of terbinafine. *Rev Contemp Pharmcother* 8:275-88.

Sabouraud R. (1910). Maladies du cuir chevelu. III. Les cryptogamiques. Les teignes. *Masson et Cie*, Paris, France.

Sabouraud R. (1896). La question des teignes. *Ann Dermatol* 3: 87–135.

Sabouraud R. (1896). Recherche des milieux de culture propres a la différenciation des espèces trichophytiques a grosse spore, p. 49–55. *In* Les trichophyties humaines.

Saez de Ocariz MM, Arenas R, Ranero-Juarez GA, Farrere-Esponda F, Monroy-Ramos E. (2001). Frequency of toenail onychomycosis in patients with cutaneous manifestations of chronic venous insufficiency. *Int J Dermatol* 40:18-25.

Sais G, Juggla A, Peyri J. (1995). Prevalence of dermatophyte onychomycosis in Spain: a cross-sectional study. *Br J Dermatol* 132:758-61.

Sato T, Takayanagi A, Nagao K, Tomatsu N, Fukui T, Kawaguchi M, Kudoh J, Amagai M, Yamamoto N, Shimizu N. (2010). Simple PCR-based DNA microarray system to identify human pathogenic fungi in skin. *J Clin Microbiol* 48:2357–2364.

Sato K, Yang XL, Yudate T, Chung JS, Wu J, Luby-Phelps K, Kimberly RP, Underhill D, Cruz PD Jr, Ariizumi K. (2006). Dectin-2 is a pattern recognition receptor for fungi that couples with the Fc receptor c chain to induce innate immune responses. *J Biol Chem* 28:38854–66.

Seebacher C, Brasch D, Abeck O, Cornely O, Effendy I, Ginter-Hanselmayer G, Haake N, Hamm G, Hipler UC, Hof H, Korting HC, Mayser P, Ruhnke M, Schlacke KH, Tietz HJ; German Society of Dermatology; German-speaking Mycological Society. (2007). Onychomycosis. *Mycoses* 50:321–7.

Sergeev AY, Gupta AK, Sergeev YV. (2002). The Scoring Clinical Index for Onychomycosis (SCIO index). *Skin Therapy Lett* 1:6-7.

Shemer A, Davidovici B, Grunwald MH, Trau H, Amichai B.(2009). New criteria for the laboratory diagnosis of nondematophyte moulds in onychomycosis. *Br J Dermatol* 160:37–9.

Shenoy MM, Teerthanath S, Karnaker VK, Girisha BS, Krishna Prasad MS, Pinto J. (2008). Comparison of potassium hydroxide mount and mycological culture with histopathologic examination using periodic acid-Schiff staining of the nail clippings in the diagnosis of onychomycosis. *Indian J Dermatol Venereol Leprol* 74:226-9.

Sigurgeirsson B, Steingrímsson O, Sveinsdóttir S (2002a). Prevalence of onychomycosis in Iceland: a population-based study. *Acta Derm Venereol* 82:467-9.

Sigurgeirsson B, Olafsson JH, Steinsson JB, Paul C, Billstein S, Evans EG. (2002b). Long-term effectiveness of treatment with terbinafine vs itraconazole in onychomycosis: a 5-year blinded prospective follow-up study. *Arch Dermatol* 138:353-7.

Sigurgeirsson B, Steingrímsson O (2004). Risk factors associated with onychomycosis. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 18:48-51.

Singal A, Khanna D (2011). Onychomycosis: diagnosis and management. *Indian J Dermatol Venereol Leprol* 77:659-72.

Smith JMB, Jolly RD, Georg LK, Connole MD. (1968). *Trichophyton equinum* var. *autotrophicum*; its characteristics and geographical distribution. *Sabouraudia* 6:296-304.

Sotiriou E, Koussidou-Eremonti T, Chaidemenos G, Apalla Z, Ioannides D. (2010). Photodynamic therapy for distal and lateral subungual toenail onychomycosis caused by *Trichophyton rubrum*: Preliminary results of a single-centre open trial. *Acta Derm Venereol* 90:216-7.

Stockdale PM. (1968). Sexual stimulation between *Arthroderma simii* Stock., *Mackenzie and austwick* and related species. *Sabouradia* 6:176-81.

Suarez SM, Silvers DN, Scher RK, Pearlstein HH, Auerbach R (1991). Histologic evaluation of nail clippings for diagnosing onychomycosis. *Arch Dermatol* 127:1517–9.

Svejgaard EL, Nilsson J (2004). Onychomycosis in Denmark: prevalence of fungal nail infection in general practice. *Mycoses* 47:131-5.

Szepietowski JC, Reich A, Garlowska E, Kulig M, Baran E. (2006). Factors influencing coexistence of toenail onychomycosis with tinea pedis and other dermatomycoses: a survey of 2761 patients. *Arch Dermatol* 142:1279-84.

Takashio M. (1972). Sexual reproduction of some *Arthroderma* and *Nannizzia* on diluted Sabouraud agar with or without salts. *Mycoses* 1972;15:11–17.

Taplin D, Zaias N, Rebell G, Blank H. (1969). Isolation and recognition of dermatophytes on a new medium (DTM). *Arch Dermatol* 99:203-9.

Tavakkol A, Fellman S, Kianifard F. (2006). Safety and efficacy of oral terbinafine in the treatment of onychomycosis: analysis of the elderly subgroup in Improving Results in Onychomycosis-Concomitant Lamisil and Debridement (IRONCLAD), an open-label, randomized trial. *Am J Geriatr Pharmacother* 4:1–13.

Taylor JW. (2011). One Fungus = One Name: DNA and fungal nomenclature twenty years after PCR. *IMA Fungus* 2:113–20.

Tchernev G, Penev PK, Nenoff P, Zisova LG, Cardoso JC, Taneva T, Ginter-Hanselmayer G, Ananiev J, Gulubova M, Hristova R, Nocheva D, Guarneri C, Martino G, Kanazawa N. (2013). Onychomycosis: modern diagnostic and treatment approaches. *Wien Med Wochenschr* 163:1–12.

Thappa DM. (2007). Current treatment of onychomycosis. *Indian J Dermatol Venereol Leprol* 73:373-6.

Tosti A, Hay R, Arenas-Guzman R. (2005). Patients at risk of onychomycosis – risk factor identification and active prevention. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 19:13-6.

Tosti A, Piraccini BM, Lorenzi S. (2000). Onychomycosis caused by nondermatophytic molds: Clinical features and response to treatment of 59 cases. *J Am Acad Dermatol* 42:217-24.

Tosti A, Baran R, Piraccini MB, Fanti PA. (1999). “Endonyx” onychomycosis: a new modality of nail invasion by dermatophytes. *Acta Derm Venereol* 79:52–3.

Uchida T, Makimura K, Ishihara K, Goto H, Tajiri Y, Okuma M, Fujisaki R, Uchida K, Abe S, Iijima M. (2009). 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. *JDermatol* 36:202–208.

Van Minnebruggen G, Francois IEJA, Cammue BPA, Thevissen K, Vroome V, Borgers M, Shroot B (2010). A general overview on past, present and future antimycotics. *Open Mycol J* 4:22-32.

Vennwald I, Fischer R, Koch A, Wollina U. (2008). Topography of dermatophyte infection in onychomycosis – fluorescent and electron microscopic investigations. *Mikologia Lekarska* 15, 7-12.

Vermout S, Tabart J, Baldo A, Mathy A, Losson B, Mignon B. (2008). Pathogenesis of dermatophytosis. *Mycopathologia* 166:267–75.

Walling HW. (2009). Primary hyperhidrosis increases the risk of cutaneous infection: a casecontrol study of 387 patients. *J Am Acad Dermatol* 61:242-6.

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. *BMC Genomics* 7:255.

Warshaw EM, St Clair KR. (2005). Prevention of onychomycosis reinfection for patients with complete cure of all 10 toenails: results of a double-blind, placebo-controlled, pilot study of prophylactic miconazole powder 2%. *J Am Acad Dermatol* 53:717–20.

Watanabe D, Kawamura C, Masuda Y, Akita Y, Tamada Y, Matsumoto Y. (2008). Successful treatment of toenail onychomycosis with photodynamic therapy. *Arch Dermatol* 2008 144:19-21.

Weinberg JM, Koestenblatt EK, Tutrone WD, Tishler HR, Najarian L. (2003). Comparison of diagnostic methods in the evaluation of onychomycosis. *J Am Acad Dermatol* 49:193-7.

Wisselink GJ, van Zanten E, Kooistra-Smid AM. (2011). 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.

Xess I, Mathur P, Sirka CS, Banerjee U.(2004). Comparison of trypsin treatment method and standard laboratory technique for diagnosis of dermatomycosis. *Southeast J Trop Med Public Health* 35:396-8.

Yenisehirli G, Bulut Y, Sezer E, Gunday E. (2009). Onychomycosis infections in the Middle Black Sea Region, Turkey. *Int J Dermatol* 48:956-9.

Zaias N, Tosti A, Rebell G, Morelli R, Bardazzi F, Bielely H, Zaiac M, Glick B, Paley B, Allevato M, Baran R.(1996). Autosomal dominant pattern of distal subungual onychomycosis caused by *Trichophyton rubrum*. *J Am Acad Dermatol* 34:302-4.

Zaitz C, Campbell I, Moraes JR, Moraes ME, Gouvea C, Romero M, Gouvea N, Sadahiro A, Chamone D, Dorlhiac P.(1996). HLA-associated susceptibility to chronic onychomycosis in Brazilian Ashkenazic Jews. *Int J Dermatol* 35:681-2.

Spisak skraćenica

AIDS	Sindrom stečene imunodeficijencije (engl. Acquired Immune Deficiency Syndrome)
ALK	5-aminolevulinska kiselina
bp	bazni par
BCP	Bromkrezol-ljubičasto kazein agar (eng. Bromcresole Purple casein agar)
CBE	Chlorazol black E
CBS	Centraalbureau voor Schimmelcultures
CIC	Klinički indeks onihomikoze (engl. Clinical Index Component)
CHROM agar	Hromogena podloga (engl. Chromogenic Media)
CHS	Hitin sintetaza (engl. chitin synthase)
CSA	Adhezini specifični za ugljenehidrate (engl. Carbohydrate Specific Adhezins)
DIM	Dermatofit identifikacioni medijum (engl. Dermatophyte Identification Medium)
DLSO	Distalna i lateralna subungvalna onihomikoza
DMP	Direktan mikroskopski preparat
DMSO	Dimetil sulfoksid
DNK	Dezoksiribonukleinska kiselina
DppIV	Dipeptidil-peptidaza IV
DppV	Dipeptidil-peptidaza V
DTM	Dermatofit test medijum

DUO	Dijagnostički unakrsni odnos
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
FDT	Fotodinamska terapija
HIV	Virus humane imunodeficijencije (engl. Human Immunodeficiency Virus)
HLA	Humani leukocitni antigen
IP	Interval poverenja
ITM	Indeks telesne mase
ITS	Internal transcribed spacer
KOH	Kalijum hidroksid
Lap 1	Leucin aminopeptidaza 1
Lap 2	Leucin aminopeptidaza
LR+	Pozitivan faktor verovatnoće(engl. Positive Likelihood Ratio)
LR-	Negativan faktor verovatnoće (engl. Negative Likelihood Ratio)
MALDI-TOF MS	Matricom potpomognuta laserska desorpcija/ionizacija masena spektrometrija (engl. Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Timeof FlightMass Spectrometry)
McpA	Metalokarboksipeptidaza A
MEP	Gen za endometaloproteinaze
MFK	Minimalna fungicidna koncentracija
MHC II	Glavni kompleks tkivne popudarnosti (engl. Major Histocompatibility Complex)
MIK	Minimalna inhibitorna koncentracija
MLRA	Multivarijantna logistička regresiona analiza

NPV	Negativna prediktivna vrednost
OM	Onihomikoza
PAS	Periodic acid-Schiff
PCR	Reakcija lančanog umnožavanja (engl. Polymerase Chain Reaction)
PDA	Potato dextrose agar
PMNL	Polimorfonuklearni leukociti
PPV	Pozitivna prediktivna vrednost
PSO	Proksimalna subungvalna onihomikoza
RLFP	Polimorfizam dužine restrikcionih fragmenata (engl. Restriction Fragment Length Polymorphism)
RNK	Ribonukleinska kiselina
SBO	Superficialna bela onihomikoza
SCIO	Zbirni klinički indeks onihomikoze (engl. The Scoring Clinical Index of Onychomycosis)
ScpA	Serin karboksipeptidaza A
ScpB	Serin karboksipeptidaza B
SDA	Sabouraud dextrose agar
Sn	Osetljivost (engl. Sensitivity)
Sp	Specifičnost (engl. Specificity)
SUB	Gen za serin proteaze
ROC kriva	Receiver Operating Characteristics Curve
RSDA	Razblaženi Sabouraud dekstrozni agar
TDO	Totalna distrofična onihomikoza

TLR	Receptori slični Toll-u (engl. Toll-like Receptors)
ULRA	Univarijantna logistička regresiona analiza
UO	Unakrsni odnos

Prilog 1. Upitnik za prikupljanje podataka od pacijenata sa sumnjom na onihomikozu.

UPITNIK ZA PRIKUPLJANJE PODATAKA KOD PACIJENATA SA SUMJNOM NA ONIHOMIKOZU								
OSNOVNI DEMOGRAFSKI PODACI								
Ime i prezime						pol	M	Ž
Godina rođenja		Br. protokola	Br. protokola (lab)					
Kontakt(adresa/telefon)								
Mesto stanovanja	a) grad _____		b) selo _____					
Zanimanje								
LIČNA ANAMNEZA								
Osnovno oboljenje								
Dijabetes	a) DA	b) NE	od kada _____					
Gojaznost	visina _____	težina _____	BMI _____					
Kompromitovana periferna cirkulacija	a) DA	b) NE	od kada _____					
Psorijaza	a) DA	b) NE	od kada _____					
Imunosupresivna terapija	a) DA	b) NE	od kada _____					
FAKTORI RIZIKA								
Putovanje u poslednjih godinu dana	a) DA	b) NE	gde _____					
Bavljenje sportom	a) DA	b) NE	koji _____					
Kontakt sa zemljom	a) DA	b) NE	Trauma nokatne ploče		a) DA	b) NE		
Zatvorena, tesna obuća	a) DA	b) NE	Pojačano znojenje nogu		DA	NE		
Posedovanje životinja	a) kućni ljubimci (pas, mačka)		b) domaće životinje		c) ne			
Dugotrajna terapija antibioticima	a) DA	b) NE	od kada _____					
Još neko u porodici	a) DA	b) NE	navesti _____					
KLINIČKA SLIKA								
Tip onihomikoze:	1. Distalna i lateralna subungvalna onihomikoza 2. Proksimalna subungvalna onihomikoza 3. Superfijelna bela onihomikoza							
Koji prsti zahvaćeni	Desna noga	1	2	3	4	5		
	Leva noga	1	2	3	4	5		
	Desna ruka	1	2	3	4	5		
	Leva ruka	1	2	3	4	5		
Zahvaćenost nokta (kod najviše zahvaćenog)	a) < 1/3		b) 1/3 - 2/3		c) > 2/3			
Zadebljanje nokatne ploče	a) nema ili < 1mm		b) 1-2 mm		c) > 2 mm			
Da li je imao i ranije	a) DA	b) NE	kada _____					
Da li se već lečio	a) DA	b) NE						
Čime _____	_____		lokalna th		sistemska th			
Koliko dugo se lečio _____	Kada je prestao sa th _____							
Postojanje paronihije	a) DA	b) NE						
Krti lako lomljivi nokti	a) DA	b) NE						
Promena boje	a) bela	b) žuta	c) žuto-braon	d) tamno-zelena	e) crna	f) drugo _____		
Estetski problem	a) DA	b) NE						
Bol	a) DA	b) NE						
Deformacija nokatne ploče	a) DA	b) NE						
Oniholiza (uzdignuti nokat)	a) DA	b) NE						
Identifikacija (Popunjava Institut za mikrobiologiju i imunologiju, Medicinski fakultet, Beograd)								

Biografija

Dr Eleonora Dubljanin je rođena 27.03.1981. godine u Zrenjaninu, gde je završila Osnovnu školu, a zatim i Gimnaziju 2000. godine. Iste godine upisala je Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu, a diplomirala je 2007. godine sa prosečnom ocenom 9,20.

Specijalističke akademske studije iz oblasti Kliničke i eksperimentalne bakteriologije upisala je 2007/2008. godine, a završni akademski specijalistički rad pod nazivom: “Značaj određivanja antigena i antitela u dijagnostici invazivne aspergiloze”, odbranila je na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu 07.07.2010. godine, pred Komisijom u sastavu: prof. dr Sandra Šipetić Grujičić, prof. dr Dragana Janić i prof. dr Valentina Arsić Aresnijić (mentor).

Doktorske studije iz epidemiologije upisala je na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu školske 2008/2009. godine. Specijalizaciju iz Medicinske mikrobiologije upisala je aprila meseca 2011. godine.

Od decembra 2010. godine zaposlena je na Institutu za mikrobiologiju i imunologiju, Medicinskog fakulteta Univerziteta u Bogradu u zvanju saradnik u nastavi na predmetu Mikrobiologija, a reizabrana u isto zvanje decembra 2011. godine Za asistenta na istom predmetu je izabrana maja 2013. godine.

Dr Eleonora Dubljanin je do sada objavila 9 naučnih radova u celini, od toga 3 kao prvi autor.

Dr Eleonora Dubljanin je 2009. godine dobila nagradu za poster prezentaciju ECMM Young Investigators Travel Award na 13th Congress of ECMM & 4th Trends in Medical Mycology, Atina, Grčka.

Dr Eleonora Dubljanin je 2012. godine bila na usavršavanju u Laboratoriji za mikologiju i parazitologiju, Karolinska univerzitet, Stokholm, Švedska kod prof. dr Lena Klingspor, kao i u Laboratoriji za mikologiju i parazitologiju, Univerzitetska bolnica u Luvenu, Luven, Belgija kod prof. pharm. Katrien Lagrou. U laboratoriji za mikologiju i parazitologiju Statens Serum Institut, Kopenhagen, Danska boravila je 2013. godine kod prof. dr Maiken Cavling Arendrup.

Dr Eleonora Dubljanin govori engleski i francuski jezik.

Prilog 2.

Izjava o autorstvu

Potpisani-a Eleonora Dubljanin

brojupisa 08-DS-EP-28

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom

“Validnost različitih laboratorijskih metoda za dijagnozu onihomikoza i identifikacija faktora rizika”

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio/la autorska prava i koristio intelektualnu svojinu drugih lica.

Potpis doktoranda

UBeogradu, 30.03.2016.

Eleonora Dubljanin

Prilog 3.

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora Eleonora Dubljanin

Broj upisa 08-DS-EP-28

Studijski program Epidemiologija

Naslov rada "Validnost različitih laboratorijskih metoda za dijagnozu onihomikoza i identifikacija faktora rizika"

Mentor Doc. dr Ivana Čolović Čalovski

Komentor Prof. dr Sandra Šipetić-Grujičić

Potpisani Eleonora Dubljanin

izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

Potpis doktoranda

U Beogradu, 30.03.2016.

Eleonora Dubljanin

Prilog 4.

Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

„Validnost različitih laboratorijskih metoda za dijagnozu onihomikoza i identifikacija faktora rizika“

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim prilogima predao/la sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo
2. Autorstvo - nekomercijalno
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima
5. Autorstvo – bez prerade
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci, kratak opis licenci dat je na poledini lista).

Potpis doktoranda

UBeogradu, 30.03.2016.

Еленаора Рудоланки