Медицински университет – Пловдив
Медицински факултет
Катедра по дерматология и венерология

Д-р Гергана Запринова Въжева

Приложение на PCR методиката в съвременната диагностика на гъбични инфекции, причинени от дерматофити

Автореферат

на дисертационен труд за присъждане на образователна и научна степен „Доктор“

Докторска програма:
„Дерматология и венерология“
Професионално направление 7.1. Медицина
Област на висше образование 7. Здравеопазване и спорт

Научен ръководител: Доц. д-р Лилия Зисова, дм

Пловдив, 2023

Дисертационният труд е написан на 142 стандартни машинописни страници и е онагледен с 28 таблици и 46 фигури.

Библиографията включва 172 заглавия, от които 162 на латиница и 10 на кирилица.

Номерата на таблиците и фигурите в автореферата не съответстват на тези в дисертационния труд.

Дисертационният труд е обсъден на разширен Катедрен съвет на катедра по Дерматология и венерология към Медицински факултет, Медицински университет – Пловдив. Единодушно е одобрен и е даден ход за публична официална защита.

Част от проучването беше извършено в рамките на вътреуниверситетски междукатедрен научноизследователски проект № ДПДП.07/20 на тема „Приложение на класически и real-time PCR методи в проучване на онихомикозите при пациенти болни от диабет” с финансиране от МУ-Пловдив.

Защитата на дисертационния труд ще се състои на 27.04.2023 г. от 11:00 ч. във II-ра аудитория на Аудиторния комплекс на Медицински университет –Пловдив.

Материалите по защитата са на разположение в Научния отдел на МУ-Пловдив, бул. „Васил Априлов“ 15А, гр. Пловдив и са публикувани на интернет страницата на университета.

Медицински университет – Пловдив
Медицински факултет
Катедра по дерматология и венерология

Д-р Гергана Запринова Въжева

Приложение на PCR методиката в съвременната диагностика на гъбични инфекции, причинени от дерматофити

Автореферат

на дисертационен труд за присъждане на образователна и научна степен „Доктор“
Докторска програма:
„Дерматология и венерология“
Професионално направление 7.1. Медицина

Научен ръководител:
Доц. д-р Лилия Зисова, дм

Официални рецензенти:
Проф. д-р Снежина Василева, дм
Доц. д-р Гриша Матеев, дм

Пловдив, 2023

Съдържание:

Използвани съкращения

Използвани съкращения на латиница:

PCR – Polymerase chain reaction (Полимеразна верижна реакция)

Real-time PCR – Real-time polymerase chain reaction (Полимеразна верижна реакция в реално време)

T. – Trichophyton

M. – Microsporum

E. – Epidermophyton

C. – Candida

SDA – Sabouraud Dextrose Agar

PAS – Periodic Acid-Schiff

Sol. A – Solution A

Sol. B – Solution B

DB – Dilution buffer

IC – Internal control

PC1 – Positive control 1

PC2 – Positive control 2

NC – Negative control

MCA – Melting curve analysis

ITS – Internal transcribed spacer

HI – Hyphal Index

Spp – Species

DG – DermaGenius

Използвани съкращения на кирилица:

ДНК – дезоксирибонуклеинова киселина

КОН – калиева основа

ОМ – онихомикоза

ДЛСОМ – дистална-латерална субунгвална онихомикоза

ПБОМ – повърхностна бяла онихомикоза

ПСОМ – проксимална субунгвална онихомикоза

ТДОМ – тотална дистрофична онихомикоза

НДП – недерматофитни плесени

ЗД – захарен диабет

I. Въведение

Дерматофитите са група кератинофилни гъби със способност да инфектират човешката кожа, нокти и косми. Познати са три анаморфни рода – *Trichophyton*, *Microsporum* и *Epidermophyton*. Инфекциите, които предизвикват са основно в роговия слой на епидермиса и кожните придатъци, но тяхната поява и развитие далеч не са само козметичен проблем. Лечението им е обвързано с продължителна употреба на локални и/или системни антимикотици, което е скъпоструващо и има странични ефекти. При някои рискови групи, гъбичните инфекции могат да са началото на сериозни усложнения, ако терапията не започне навреме. Такива например са имунокомпрометирани пациенти, болни от захарен диабет, пациенти със злокачествени заболявания.

Затова диагностиката на дерматофитозите е от изключително значение, както за започване на подходяща терапия възможно най-бързо, така и за предотвратяване на бъдещи усложнения.

В настоящия научен труд се сравняват конвенционалните методи за диагностика на дерматомикози с иновативната за микологията в България техника на полимеразната верижна реакция в реално време (real-time PCR). Конвенционалните методи включват директно микроскопско изследване с калиева основа (KOH), последвано от културелно изследване на селективна среда. Въпреки че те са утвърдени в клиничната практика от десетилетия, все пак имат недостатъци – липса на специфичност на директното изследване, продължително време (3-4 седмици) на растеж при културелното изследване, нужен е голям опит при идентифицирането на гъбичната морфология и др. Тези недостатъци могат да бъдат компенсирани с използването на по-нови изследвания с по-голяма чувствителност, специфичност и отнемащи много по-малко време до получаване на резултат – молекулярно биологичните техники. Такъв метод в проучването ни е мултиплексния PCR в реално време.

В този дисертационен труд с изброените методи се изследват и сравняват материали от пациенти със съмнения за микоза в окосмената част на главата (tinea capitis), микоза на брадата (tinea barbae), микоза на кожата (tinea corporis, tinea pedis, tinea manuum, tinea cruris) и онихомикоза (tinea unguium или onychomycosis).

Сравняват се също така етиологичните причинители и честотата на онихомикоза при пациенти с и без захарен диабет, използвайки директно микроскопско изследване, културелно изследване, хистология и PCR в реално време. По този начин се доказват предимствата от използването на PCR в реално време в клиничната практика.

Прогресът на микологичните изследвания и статистическите данни, получени от молекулярно биологичните техники окуражават изготвянето на нови алгоритми в диагностиката на гъбичните инфекции.

Оценката на изследванията, които се правят с PCR в реално време за откриването на дерматофити, е важен компонент за крайната цел – по-широко използване на този метод за диагностика на гъбичните инфекции. През последните години са публикувани многообещаващи проучвания в тази сфера.

През 2017 година Sharma и колектив (2017), публикуват пилотно проучване, с което сравняват използването на директно микроскопско и културелно изследвания с PCR техниката. В проучването им участват 40 пациенти (25 със съмнения за гъбична инфекция на кожа и нокти и 15 контроли). Докладваните от тях резултати за културелното изследване и PCR са както следва: чувствителност 24% и 48%, специфичност 100% и 93,3%, респективно.

Marie-Pierre Hayette и колектив (2019) публикуват в сп. Medical Mycology техния труд, сравняващ PCR методиката в реално време (DermaGenius® Nail multiplex real-time PCR) с конвекционалните методи (културелно и хистологично изследване) за изследване на гъбични

инфекции по ноктите. Тестовете са извършени на 138 броя материали от нокти, с използването на DermaGenius® Nail real-time PCR кит, който има възможност за детекция на *T. rubrum*, *T. interdigitale* и *C. albicans* директно от материали от нокти. Анализът на техните резултати показва следните стойности за чувствителност и специфичност – хистология 81,1% и 100%, културелно изследване 71,6% и 100%, PCR в реално време 80% и 74,4%. Като трябва да се подчертае, че за стандарт за позитивно изследване в това проучване са използвали само позитивна хистология и/или позитивна култура, тъй като целта е да се оцени метода на real-time PCR. Най-добри резултати са докладвани от комбинация на real-time PCR и хистология с 94,7% чувствителност.

Sherin M. Emam и колектив (2016) публикуват труд в Alexandria Journal of Medicine, където правят проучване на чувствителността и специфичността на директната микроскопия, конвекционалния PCR и PCR в реално време, сравнени спрямо културелното изследване, отново на нокти. Те провеждат изследванията на 80 пациенти на възраст между 22 и 77 години. Културелното изследване е било с положителни резултати за изолирани дерматофити при 30 (37,5%) пациенти – *T. mentagrophytes* (14 случая), *T. rubrum* (8 случая), *T. verrucosum* (4 случая), *T. schoenleinii* (4 случая), а плесени са изолирани в 8 случая (10%) – *Aspergillus niger*. Резултатите, които получават спрямо културелното изследване са както следва – за директна микроскопия - 80% чувствителност, 16% специфичност, конвенционалната PCR методика - 73,3% и 40%, а при real-time PCR - 93,3% и 40%, респективно.

В проучването си Wisselink и колектив (2011) в сп. Journal of Microbiological Methods сравняват резултатите от културелно изследване и PCR в реално време в материали от нокти, косми и кожа. Проведените изследвания са на 1437 пациенти. Резултатите от това обемно проучване показват значително повишено ниво на детекция на дерматофити от PCR в

реално време (48,5%), спрямо културелното изследване (26,9%). Изчислената чувствителност на real-time PCR е 97%.

Българският опит с PCR методиката е проучването на В. Ставракиева (2005), в което се сравняват директното микроскопско и културелното изследвания с няколко различни техники за конвенционален PCR (включително готови китове за изпълнение на методиката). Проучването се прави на 191 пациенти със съмнения за онихомикоза и 25 здрави индивиди. Стойностите на директно изследване, културата и PCR за чувствителност, специфичност са както следва: 96,8% и 73,3%, 27% и 100%, 95,6% и 100%, респективно.

Gong и колектив (2016) публикуват в сп. Mycopathologia техните резултати, сравняващи 165 нокътни материали чрез директна микроскопия, култура, конвенционален PCR и PCR в реално време. Получените резултати за чувствителност и специфичност на всеки тест са: директна микроскопия – 85% и 99.7%, култура - 57.1% и 99.8%, конвенционален PCR - 83.7% и 99.6% и real-time PCR - 92.4% и 97.3%, съответно. От тези 165 пациенти, 70 са били със съмнения за микоза. При тях положителните резултати за четирите изследвания са: 68 (97,1%) за директно изследване, 49 (67,1%) за посявка, 54 (77,1%) за конвенционалния PCR и 61 (87,1%) за real-time PCR.

Bergman и колектив (2013) публикуват своето проучване в сп. Mycology, в което развиват и валидират real-time PCR метод за детекция на всички видове дерматофити (pan-dermatophyte PCR), включително идентификация на двата най-чести причинители на дерматофитни инфекции – *T. rubrum* и *T. interdigitale* с дуоплексен PCR (duplex PCR) и го сравняват с резултатите от конвенционално културелно изследване на 202 материали от нокти, кожа и коса. Получените резултати са както следва: 103 (51%) от пробите били положителни за гъбична ДНК, отчетена от PCR, докато само 79 (39%) от пробите били положително на културелното

изследване. Чувствителността и специфичността при култура са 77% и 97%, а при PCR - 92% и 99%, респективно.

В проучването си от 2021 година, Cuchí-Burgos и колектив докладват резултатите си при сравнението на 152 материали с директно микроскопско изследване, културелно изследване и real-time PCR, изпълнен със същия кит, с който работим и в настоящото проучване - DermaGenius® 2.0 Complete kit. Резултатите им отчитат чувствителност от 93,3% за real-time PCR, докато при културата само 64,4%.

В друго проучване, проведено отново с DermaGenius® 2.0 Complete kit, Ndiaye и колектив (2021) сравняват резултатите между real-time PCR и конвенционалните методи (директно и културелно изследване) при изследване на 129 материали от коса на пациенти със съмнения за tinea capitis. Чувствителността и специфичността на real-time PCR са 89,3% и 75,3%, което ги прави значително по-чувствителни от културелните изследвания ($p<0,001$).

Диагностицирането на повърхностните гъбичните инфекции е обект на усилена изследователска дейност в много страни по света. Методите на диагностика, които се използват са разнообразни, включвайки конвенционалните и по-иновативните техники, но общата цел е да се намери най-добрият подход за диагностика на микозите. Това включва главно точна идентификация на причинителите, както и максимално бързо получаване на резултатите. При някои групи пациенти, като например имуносупресирани или болни от захарен диабет, започването на навременна терапия е от голямо значение за избягване на възможни усложнения, свързани с микотичните инфекции.

Използването на real-time PCR в диагностиката на дерматофитни инфекции е сравнително нов подход в микологията и като такъв е подложен на проверката на времето и опита от използването му. Във все повече проучвания се представят резултати от сравняване на

конвенционалните методи с real-time PCR или съответно конвенционалния PCR с този в реално време. Резултатите са обещаващи, но метода все още не се е наложил като нов златен стандарт в диагностиката на повърхностни гъбични инфекции, причинени от дерматофити. До този момент, в България не е провеждано задълбочено проучване за оценка на real-time PCR методиката спрямо конвенционалните методи за диагностика – директно микроскопско, културелно и хистологично изследвания при дерматофитни инфекции на косми, кожа и нокти.

Също така, за момента данните от проучванията върху честотата и етиологичните причинители при пациенти с онихомикоза със захарен диабет (ЗД), спрямо пациенти с онихомикоза без ЗД, са ограничени. А такива, които да оценяват тези показатели, използвайки едновременно real-time PCR, хистология, културелно изследване и директна микроскопия и сравнявайки ги, липсват.

Всичко това ни мотивира да извършим тези проучвания в настоящия научен труд. Като за целта използвахме един от малкото признати и вече доста използвани тестове за real-time PCR - DermaGenius® Complete real-time PCR kit, със способност да детектира 11 дерматофита и *Candida albicans*.

II. Цел и задачи

1. Цел

Целта на настоящия дисертационен труд е да се докаже ползата и значението на PCR в реално време за диагностиката на дерматофитни инфекции.

2. Задачи

За изпълнението на поставената цел, се формулираха следните задачи:

2.1 Да се сравнят резултатите при real-time PCR с директното, културелното и хистологичното изследвания при всички пациенти, участващи в проучването.

2.2 Да се сравнят резултатите при real-time PCR с директното и културелното изследвания при пациентите със съмнения за микотични инфекции на скалп и брада.

2.3 Да се сравнят резултатите при real-time PCR с директното и културелното изследвания при пациентите със съмнения за микотични инфекции на кожа.

2.4 Да се сравнят резултатите при real-time PCR с директното, културелното и хистологичното изследвания при пациенти със съмнения за онихомикози.

2.5 Да се сравнят етиологичните причинители и честотата на онихомикоза при пациенти с и без захарен диабет чрез директно микроскопско, културелно, хистологично и real-time PCR изследвания.

Нулевата хипотеза (H0) гласи, че няма разлика в чувствителността, специфичността и ефикасността на конвенционални методи сравнени с real-time PCR.

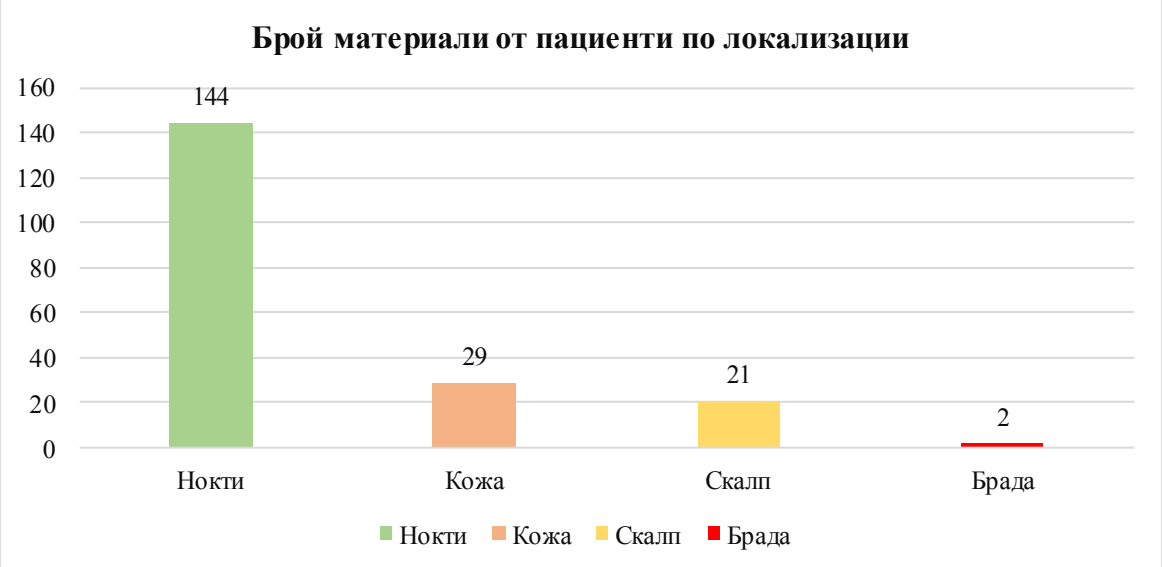
III. Материали и методи

1. Клинични материали

Текущото проспективно и сравнително проучване беше извършено в Катедра по дерматология и венерология, Медицински университет – Пловдив, България за периода от месец март 2019 година до месец януари 2022 година. Включени бяха общо 196 пациенти (жени - 103, мъже - 93) на възраст от 2 до 90 години с клинични симптоми, предполагащи гъбична инфекция, засягаща скалп, брада, кожа или нокти.

Единица на наблюдение: Пациенти със съмнения за онихомикоза, микоза на кожата, микоза на скалпа или микоза на брадата.

От общо 196 пациенти, 144 бяха със съмнения за онихомикоза (tinea unguium), 29 с клинични симптоми, предполагащи гъбична инфекция, засягаща кожата (tinea corporis, tinea cruris, tinea pedis, tinea manuum), 21 със съмнения за микоза на скалпа (tinea capitis) и 2 за микоза на брадата (tinea barbae) (Фигура 1).



Фигура 1 – Разпределение на материалите от пациенти, спрямо тяхната локализация.

За изпълнението на **задачи 1, 2, 3 и 4** бяха събрани материали от пациенти от косми, кожа и нокти, съответно. Пациентите имаха клинични признаци, предполагащи микоза както следва:

1.1 За микоза на скалпа и брадата (n=23) – сърбящи петна по скалп или брада със загуба на косми, с или без наличие на еритем и десквамация. При tinea barbae възможно наличие на папули и пустули (Фигура 2, 3 и 4).

Фигура 2 – Tinea capitis.

Фигура 3 – Tinea capitis.

Фигура 4 – Tinea barbae.

1.2 За микоза на кожата (n=29) – за tinea corporis и tinea cruris - еритемен обрив с ануларна или кръгла форма, с периферия, която е леко надигната, с наличие на активен ръб, по-блед център, с наличие или липса на сърбеж, дребни везикули или пустули; за tinea pedis - дребни, плътни везикули, изпълнени с бистро съдържимо; зачервени, залющени петна, най-често по свода на стъпалото или латерално; наличие на еритем, мацерации и/или ерозии в междупръстията и кожата под пръстите на краката; за tinea manuum – наличие на десквамация, хиперкератоза и понякога наличие на везикули, при по-стари форми, ръцете могат да изглеждат като „набрашнени“ (Фигура 5, 6, 7 и 8).

Фигура 5 – Tinea corporis

Фигура 6 – Tinea corporis

Фигура 7 – Tinea pedis

Фигура 8 – Tinea pedis

1.3 За онихомикоза (n=144) – задебеляване на нокътната плочка, промяна в цвета, субунгвална хиперкератоза, онихолиза, дистрофични нокти, надлъжни и напречни линии (Фигура 9, 10, 11, 12, 13 и 14).

Фигура 9 – ДЛОМ

Фигура 10 – ДЛОМ

Фигура 11 – ДЛОМ

Фигура 12 – ТДОМ

Фигура 13 – ДЛОМ

Фигура 14 - ТДОМ

Пациентите със съмнения за онихомикоза бяха класифицирани според следните най-често срещани клинични изяви на ОМ – дистална-латерална субунгвална онихомикоза (ДЛСОМ), повърхностна бяла онихомикоза (ПБОМ), проксимална онихомикоза (ПСОМ) и тотална дистрофична онихомикоза (ТДОМ). Броят на ноктите, които бяха засегнати се означи както следва: лека степен (≤4 засегнати нокти), средно тежка степен (5-8 засегнати нокти) и тежка степен на засягане (≥9 засегнати нокти).

Пациентите със съмнения за онихомикоза нямаха диагностицирани клинически или хистологично заболявания, за които се знае, че увреждат нокътната плочка (напр. псориазис, плосък лишей и др).

За изпълнението на **задача 5** бяха изследвани пациенти със съмнения за онихомикоза с и без диабет.

1.4 За онихомикоза с и без диабет – разделени в 2 групи както следва:

1.4.1 I група – на диабетици със съмнения за онихомикоза (n=51). Група I включваше пациенти с диабет тип 1 и 2, над 18 години. Пациентите с диабет бяха изпратени от Клиника по ендокринология, УМБАЛ „Св. Георги“ със съдействието на Проф. д-р М. Орбецова и д-р Е. Бечева в рамките на вътреуниверситетски междукатедрен научноизследователски проект № ДПДП.07/20 на тема “Приложение на

класически и real-time PCR методи в проучване на онихомикозите при пациенти болни от диабет".

1.4.2 II група – пациенти без диабет и съмнения за онихомикоза (n=93). Група II включваше пациенти от Клиника по кожни и венерически болести, УМБАЛ „Св. Георги" – от стационар и амбулаторни пациенти.

1.5 Събиране на клиничен материал и подготовка за изследвания

Преди вземане на материал от засегнатите области, те се почистваха с 70% етилов спирт, за да се премахнат възможни замърсители от повърхността.

Вземаше се максимално голямо количество материал, тъй като се той се разделяше и използваше за изпълнението на 3 или съответно 4 изследвания. Всички събрани проби от пациенти (n=196) се разделиха на 3 части – за провеждане на директно микроскопско изследване, културелно изследване и real-time PCR. При пациентите със съмнения за онихомикоза, където беше възможно вземане на достатъчен и подходящ материал, той се раздели на 4 части (n=86). На четвъртата порция от пробата се извърши и хистологично изследване с PAS оцветяване.

Събирането на материалите се извърши в микологичната лаборатория на Клиника по кожни и венерически болести, УМБАЛ „Св. Георги" – Пловдив със съдействието на ст. лаб. Антонина Иванова.

2. Методи

2.1 Клинични методи

2.1.1 Анамнеза и клиничен преглед

На всеки пациент беше снета анамнеза относно настоящите оплаквания, начало, развитие и продължителност на промените, наличие на гъбична инфекция в миналото, травма, контакт с домашни и/или улични животни, наличие на гъбична инфекция в семейството и предходно лечение. За пациентите със съмнения за онихомикоза и наличие на захарен

диабет – възможни усложнения (като периферна невропатия, ретинопатия, нефропатия и др).

2.2 Лабораторни методи

2.2.1 Директно микроскопско изследване

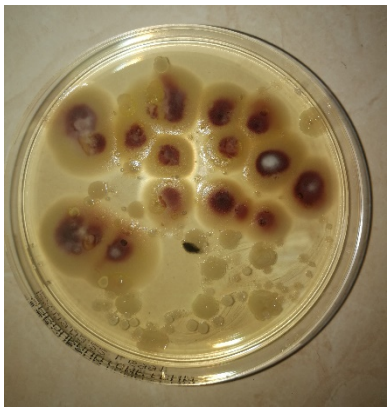
Изследването се извърши на всички проби (n=196), като материалите се поставяха върху химически чисто предметно стъкло, след което се накапваха 1-2 капки 10% калиева основа (КОН), смесваха се с пробата и така подготвените препарати се поставяха за инкубация за 30 минути – 1 час с цел лизиране на клетъчните елементи от роговия слой на епидермиса. След това пробата се разглеждаше под микроскоп на по-малко (x10) и по-голямо увеличение (x40) за наличието на гъбични елементи – хифи, спори, псевдохифи.

2.2.2 Културелно изследване (посявка)

Посявки се направиха отново на всички пациенти (n=196), без значение от получените резултати от директното микроскопско изследване. Пробите се поставяха на 2 хранителни среди - Sabouraud Dextrose Agar (SDA) с Ceftriaxone и Sabouraud Dextrose Agar (SDA) с Chloramphenicol и Cycloheximide. След което се инкубираха на температура между 28^0C - 36^0C и се проверяваха редовно в продължение на 4 седмици за наличие на растеж. Ако след 4 седмици не беше отчетен растеж, изследването се приемаше за негативно. Идентификацията на получения растеж се осъществи макроскопски и микроскопски.

2.2.3 Макроскопската идентификация на културата се осъществи чрез наблюдения на морфологичните характеристики на колонията – размер, форма, консистенция, ръбове, цвят на културата (на повърхността и на дъното), време за растеж, вид на растежа – дали е мъхообразен, памукообразен, гладък и т.н., както и наличието или липсата на пигменти (Фигура 15 и 16).

Фиг. 15 – Растеж на T. interdigitale.



Фиг. 16 – Растеж на T. rubrum.

2.2.4 Микроскопската идентификация на културите се извърши с обследване на микроскопските характеристики на дерматофити, дрожди и плесени на нативен препарат и определяне на видовата принадлежност, въз основа на морфологичната структура на спорите, макро- и микроконидиите.

2.2.5 Видова идентификация на дрожди от род *Candida*

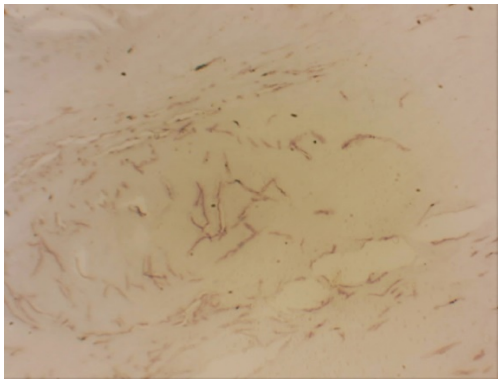
В случаите, когато резултатът от културата беше *Candida spp*, се проведе допълнителен тест на Chrom agar (HiCrome™ Candida Differential Agar, Ridacom), за диференциране на най-често срещаните видове *Candida* – *C. albicans, C. glabrata, C. krusei* и *C. tropicalis*. Останалите видове *Candida* се индикираха като *C. non-albicans*.

Изпълнението и идентификацията на директните микроскопски и културелните изследвания се извърши в микологичната лаборатория на Клиника по кожни и венерически болести, УМБАЛ „Св. Георги“ – Пловдив със съдействието на доц. д-р Лилия Зисова, дм и ст. лаб. Антонина Иванова.

2.2.6 Хистологично изследване

Хистология се изпълни само на част от материалите от нокти, където това беше възможно (n=86). Изрезки от нокти се изпращаха за хистопатологично изследване в контейнери с 10% буфериран формалин.

Използва се Periodic Acid-Schiff (PAS) оцветяване. След това всеки материал се наблюдаваше под микроскоп на по-малко (x10) и по-голямо (x40) увеличение за наличие на гъбични елементи в пурпурно червен цвят – хифи, спори, псевдохифи (Фигура 17 и 18).



Фиг. 17 – Хифи на хист. препарат (x10).

Фиг. 18 – Хифи на хист. препарат (x40).

Хистологичните препарати бяха изпълнени в хистологичната лаборатория на Катедра по обща и клинична патология, МУ-Пловдив със съдействието на проф. д-р Веселин Беловеждов, дм и д-р Веселин Чонов в рамките на вътреуниверситетски междукатедрен научноизследователски проект № ДПДП.07/20 на тема „Приложение на класически и real-time PCR методи в проучване на онихомикозите при пациенти болни от диабет”.

2.2.7 Real-time PCR

Полимеразната верижна реакция в реално време се изпълни на всички проби (n=196), включени в проучването. Тя се извърши с DermaGenius® 2.0 Complete multiplex real-time PCR kit (PN-401, PathoNostics, The Netherlands), който има възможност за детекция на 12 патогена – *Trichophyton rubrum, (T. rubrum), Trichophyton interdigitale (T. interdigitale), Trichophyton tonsurans (T. tonsurans), Trichophyton mentagrophytes (T. mentagrophytes), Trichophyton soudanense (T. soudanense), Trichophyton violaceum (T. violaceum), Trichophyton benhamiae (T. benhamiae),*

Trichophyton verrucosum (T. verrucosum), Microsporum canis (M. canis), Microsporum audouinii (M. audouinii), Epidermophyton floccosum (E. floccosum) и *Candida albicans (C. albicans)* в материали от нокти, кожа и косми. Китът съдържа следните реактиви – PCR микс 1, PCR микс 2, Taq полимераза, буфер за разреждане (DB), вътрешна контрола (IC), PCR позитивна контрола 1 (PC1), PCR позитивна контрола 2 (PC2). Изследването се извърши спрямо инструкциите на производителя.

2.2.7.1 Подготовка

Материалите, взети от инфектирани части на нокти, кожа или косми, се поставяха в стерилни епруветки от 1,5 ml (Eppendorf епруветки) с капаче в количество, обхващащо само дъното на епруветката.

2.2.7.2 Екстракция на ДНК

За екстракцията на ДНК се използваше китът за екстракция PathoNostics (PN-502), съдържащ разтвор A (solution A) и разтвор B (solution B).

Получената супернатанта се премества в нова стерилна епруветка от 1,5 ml, като се избягва трансфера на твърди частици останали отноктите, космите или сквамите. Температурата, на която се държи получената проба е 4^0C, когато се изпълняват следващите стъпки в същия ден, или на -20^0C за по-продължително съхранение.

2.2.7.3 Приготвяне на real-time PCR микс

PCR микс 1 и 2 се приготвят в обем от 20 µl всеки, съдържащи за 1 проба – 10 µl PCR микс 1 или съответно PCR микс 2, 1,5 µl Taq полимераза и 8,5 µl буфер за разреждане, след което внимателно се смесват. Работи се с PCR епруветки от 0,2 ml и изцяло върху лед или охлаждащи блокове.

2.2.7.4 Прибавяне на изолирана ДНК към PCR миксовете

Прибавят се по 5 µl ДНК от всяка проба към PCR микс 1 и PCR микс 2, като общото количество за всяка проба става 25 µl. За негативната контрола (NC) се прибавя 5 µl буфер за разреждане, а за позитивната

контрола (PC) се прибавят 5 µl от PC1 и PC2 за PCR микс 1 и PCR микс 2, респективно.

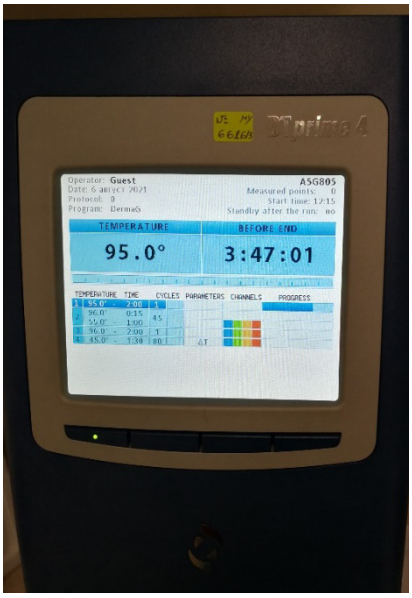
2.2.7.5 Стартиране на real-time PCR програмата

След като всяка PCR епруветка се постави на плаката на real-time PCR инструмента, се избира програмата на PCR циклиране, определена за работа с този кит и се стартира процеса.

Общото време на работа от стартиране на процеса до анализа на резултатите е 3 ч. и 50 минути.

За амплификацията и анализа на кривата на топене се използваше DTprime Real-time Detection Thermal Cycler (Фигура 19 и 20).

Фиг. 19 – DTprime 4.

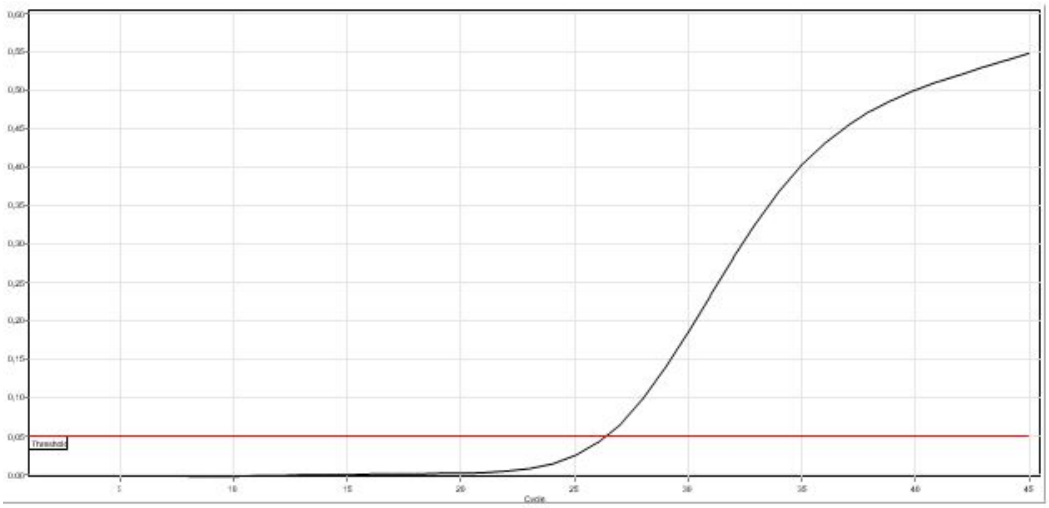


Фиг. 20 – DTprime 4 (току-що стартиран).

2.2.7.6 Анализ на данни и интерпретация на резултати

Анализирането на данните се започва с проверяване на Ct стойностите, определяни с използването на праговата функция и проверка на амплификационните криви (Фигура 21). Интерпретацията на резултатите се извършваше с помощта на предоставените от

производителя таблици, на които се съдържа информация за всеки канал на кои патогени отговаря, съответно за PCR микс 1 и PCR микс 2.



Фигура 21 – Пример за амплификационна крива.

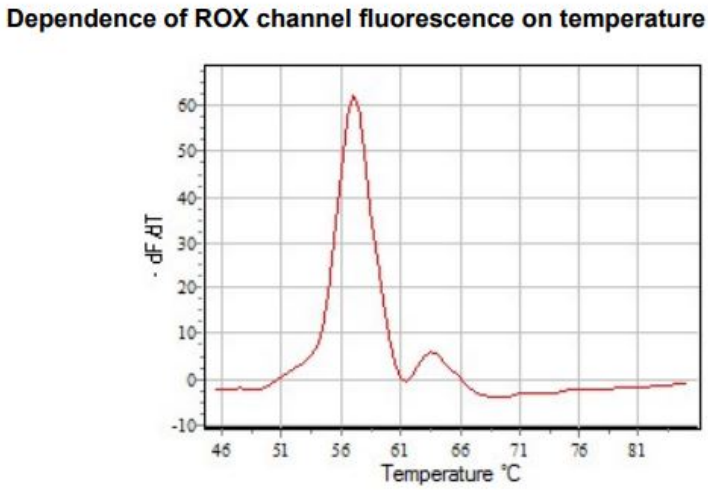
За отчитането на кривата на топене (melting curve analysis) също са предоставени таблици, с които се извършва точното диференциране на единадесетте дерматофита и *Candida albicans*, спрямо температурата им на топене (Фиг. 22, 23 и 24).

DermaGenius® 2.0 Complete T_m-values (°C): PCR mix 1					
Channel	**Target**	**RGQ**	**LC480**	**CFX**	**MIC**
Green 465-510 FAM	*C.albicans*	63.0-66.0	62.5-65.5	61.5-64.5	63.0-66.0
Yellow 533-580 HEX	*T. interdigitale*	69.5-72.5	70.0-73.0	68.0-71.0	70.5-73.5
	T. tonsurans	74.5-77.5	75.0-78.0	73.0-76.0	75.5-78.5
	T. mentagrophytes	77.0-79.5	77.5-80.5	75.5-78.0	77.5-80.0
Orange 533-610 ROX	*T. rubrum / T. soudanense*	56.5-59.5	57.5-60.5	55.0-58.0	57.5-60.5
	T. violaceum	66.5-69.5	68.0-71.0	65.5-68.5	67.5-70.5
Red 618-660 Cy5	Internal Control	No melting peak	No melting peak	No melting peak	No melting peak

Фигура 22 – Стойности на температурата на топене: PCR микс 1 (релевантна за отчитане на точния причинител е колоната под CFX канала).

DermaGenius® 2.0 Complete T_m-values (°C): PCR mix 2					
Channel	**Target**	**RGQ**	**LC480**	**CFX**	**MIC**
Green 465-510 FAM	*T. benhamiae*	69.0-72.0	69.0-72.0	66.0-69.0	69.0-72.0
	T. verrucosum	74.5-77.5	74.0-77.0	71.0-74.0	74.0-77.0
Yellow 533-580 HEX	*M. canis*	67.0-70.0	69.0-72.0	65.5-68.5	69.0-72.0
	M. audouinii	58.5-61.5	59.0-62.0	56.5-59.5	60.5-63.5
Orange 533-610 ROX	*E. floccosum*	68.5-71.5	68.5-71.5	67.0-70.0	69.5-72.5
Red 618-660 Cy5	Internal Control	No melting peak	No melting peak	No melting peak	No melting peak

Фигура 23 – Стойности на температурата на топене: PCR микс 2 (релевантна за отчитане на точния причинител е колоната под CFX канала).



Фигура 24 – Крива на топене при детекция на T. rubrum в ROX (оранжевия) канал.

Негативните и позитивните контроли трябва задължително да бъдат отчетени предварително, за да се гарантира надеждността на получените резултати.

Изработването на real-time PCR пробите се осъществи в Центъра за приложна наука и иновации (CASI), гр. София със съдействието на фирма Ридаком ЕООД, Катедра по микробиология – PCR лаборатория, МУ-Пловдив и Катедра по медицинска биология – Технологичен център, МУ-Пловдив със съдействието на Валентин Дичев, дб.

2.3 Статистически методи

Статистическата обработка на данните беше извършена чрез:

2.3.1 Анализ на честотните разпределения

Този метод е използван за описание на количествените променливи с нормално и близко до нормалното разпределение. С теста на Колмогоров – Смирнов вариационните редове са проверени за нормалност на разпределението.

2.3.2 Алтернативен анализ

Методът е използван за оценка на честотни разпределения при качествени и групирани данни.

2.3.3 Непараметричен анализ

Методът $\chi 2$ (критерий на Пирсън) е използван за анализ на наличие на асоциация, връзки и зависимости между изучаваните признаци. При тестването на хипотези за липса на съществено влияние на даден фактор при многократните таблици е използван $\chi 2$ критерия, а при четирикратните таблици е използван точния тест на Фишер (Fisher's exact test). За изчисляване и сравняване на чувствителност, специфичност и ефикасност на всеки от диагностичните тестове е използван McNemar test.

2.3.4 Графичен анализ

За графичното представяне на данните са използвани собствени таблици, диаграми и графики, Microsoft Excel и Microsoft Word.

Използван е статистически софтуер SPSS, версия 19 за Windows. Като статистически достоверни са приемани стойностите на ниво на значимост $p<0,05$, с гаранционна вероятност по-голяма от 0,95 (интервал на доверителност 95%).

Статистическата обработка се извърши от доц. д-р Цонка Митева-Катранджиева, дм, ФОЗ, Катедра по социална медицина и обществено здраве, МУ-Пловдив.

3. Определяне на стандарт за положителна проба

В настоящия дисертационен труд за истинска гъбична инфекция се приемаха: клинични признаци за микоза, в съчетание с поне едно от следните изследвания – позитивно културелно изследване (за дерматофит или *C. albicans*), положителна хистология или положителен real-time PCR.

4. Етични аспекти

Проучването е одобрено от Етичната комисия на Медицински университет – Пловдив на заседание №7/01.10.2020 година. Участниците са подписали информирано съгласие за предоставяне на необходимите клинични проби и извършване на съответните изследвания преди включване в проучването. Спазени са изискванията на Декларацията от Хелзинки за етичност в науката. Изследванията са извършени съобразно изискванията на добрата клинична практика и българските закони и наредби за извършване на клинични и научни изследвания с участието на хора.

5. Органи на наблюдение

Проучванията са извършени от главния изследовател (докторантът) – д-р Гергана Въжева, под прякото ръководство на ръководителя на докторанта – доц. д-р Лилия Зисова, дм, с одобрение от ръководител на Катедра по дерматология и венерология, МУ-Пловдив – проф. д-р Христо Добрев, дмн и сътрудничеството на:

- старши лаборант от микологична лаборатория на Клиниката по кожни и венерически болести, УМБАЛ „Свети Георги“- Пловдив;
- началник-клиника и медицински персонал от Клиника по ендокринология и болести на обмяната, УМБАЛ „Св. Георги“ – Пловдив;

- ръководители катедра и медицински персонал на Катедра по обща и клинична патология, Катедра по микробиология и Катедра по медицинска биология, МУ-Пловдив;
- персонал на Център за приложна наука и иновации (CASI), гр. София.

Част от направените изследвания и получените резултати са осъществени в рамките на вътреуниверситетски междукатедрен научноизследователски проект №ДПДП.07/20 на тема „Приложение на класически и real-time PCR методи в проучване на онихомикозите при пациенти болни от диабет", с ръководител на проекта доц. д-р Лилия Зисова, дм и главен изследовател д-р Гергана Въжева, финансиран от Медицински университет – Пловдив.

IV. Резултати и обсъждане

1. Резултати от проспективно сравнително проучване, оценяващо резултатите от директното микроскопско, културелно, хистологичното и real-time PCR изследвания при пациенти със съмнения за дерматофитна инфекция на скалп, брада, кожа и нокти (n=196)

1.1 Обща характеристика на пациентите

В проучването бяха включени 196 пациенти на възраст от 2 до 90 години, на средна възраст 49,13 ± 1,56, стандартно отклонение (SD) 21,85. Медианата беше 54,50, а модата на възрастта - 55 години. От всички 196 пациенти, 93 (47,4%) бяха мъже, а 103 (52,6%) – жени (Фигура 25).

Фигура 25 – Процентно съотношение на мъже и жени от всички пациенти.

1.2 Разпределение на пробите в зависимост от материалите, които са събрани от пациентите и тяхната локализация по тялото на пациентите

Материалите от пациенти, които са използвани за изследване, се състоят от сквами и косми от капилициум (n=21), сквами и косми от брада (n=2), сквами от кожа (n=29) и изрезки от нокти (n=144), разпределени в процентно съотношение 10,7%, 1,0%, 14,8% и 73,5%, респективно (Таблица 1).

Таблица 1 – Разпределение на материалите.

Материал	Брой (n)	Процент %
Сквами и косми от капилициум	21	10,7
Сквами и косми от брада	2	1,0
Сквами от кожа	29	14,8
Изрезки от нокти	144	73,5
Общо	196	100,0%

Според локализацията на тялото, от които материалите бяха събрани, най-много бяха материалите от долни крайници (включващо нокти крака и кожа от долна крайници) – 147 (75%), следвани от материали от капилициум – 21 (10,7%), ръце (включително от нокти и кожа) – 12 (6,1%), материали от трункус – 11 на брой (5,6%), ингвинални гънки – 3 (1,5%) и брада – 2 (1,0%).

1.3 Разпределение на пациентите в зависимост от давността на патологичните изменения (по кожа, нокти, скалп, брада)

Най-голям брой пациентите са имали оплакванията си от 1 до 5 години преди прегледа – 61 (31,1%). Пациентите с оплакванията до 3 месеца преди прегледа бяха 44 (22,4%), тези със симптоми до 6 месеца – 11 (5,6%), до 1 година – 24 (12,2%), между 6 и 10 години – 34 (17,3%), а тези над 10 години, съответно, 22 на брой (11,2%) от всички случаи (Таблица 2).

Таблица 2 – Давност на патологичните изменения по скалп, кожа и нокти.

Давност на патологичните изменения	Брой пациенти	Процент (%)
До 3 месеца	44	22,4
До 6 месеца	11	5,6
До 1 година	24	12,2
1 – 5 години	61	31,1
6 – 10 години	34	17,3
Над 10 години	22	11,2
Общо	196	100,0

1.4 Наличие на диабет

Пациентите със захарен диабет бяха 51 (26,0%) и всички бяха със съмнения за онихомикоза. Те бяха включени в текущото проучването по проект ДПДП07/20г., сравнявайки честотата и етиологичните причинители на пациенти със съмнения за онихомикоза с и без захарен диабет. Останалите 145 пациенти (74,0%) нямаха диабетно заболяване.

1.5 Стандарт за положителна проба

За дефиниция на положителна проба за истинска гъбична инфекция бяха взети предвид клинични признаци за микоза, в съчетание с поне едно от следните изследвания: положително културелно изследване (за дерматофит или *C. albicans*), положителна хистология или положителен real-time PCR. Спрямо така зададения стандарт общия брой на положителни проби в настоящото проучване беше 124 (63,27%). Отрицателните изследвания бяха 72 на брой (36,73%).

Невалидни бяха общо 6 (3,06%) проби за real-time PCR, като 2 от тях бяха положителни за култура или хистология и бяха включени към истински положителните проби, а 4 (2,04%) от пробите бяха отрицателни на културелното и хистологично изследвания, следователно бяха включени към отрицателни проби.

За акуратно изчисляване на чувствителността, специфичността и ефикасността на метода тези 6 невалидни проби не бяха включени при изчисляването на тези параметри за метода real-time PCR.

1.6 Резултати от проведени изследвания

За да се сравнят резултатите при real-time PCR с директното, културелното и хистологичното изследвания при микотични инфекции на всички пациенти в проучването, се проучиха чувствителността, специфичността и ефикасността на всяко едно от проведените изследвания.

1.6.1 Резултати от директно микроскопско изследване за всички пациенти (n=196)

Положителните резултати бяха 87 на брой (44,39%) от всички проби, а отрицателните съответно 109 (55,61%) (Таблица 3).

Таблица 3 – Резултати за всички пациенти от директно микроскопско изследване.

Резултат от директно изследване	**Брой (n)**	**Процент (%)**
Положителен	87	44,39
Отрицателен	109	55,61
Общо	196	100,0

Чувствителността за директната микроскопия беше 63,71%, специфичността 88,89%, а ефикасността 72,96%, съгласно установения стандарт ($p<0,001$) (Таблица 4).

Таблица 4 – Чувствителност, специфичност и ефикасност на директната микроскопия за всички пациенти.

Вид изследване	Чувствителност (%) Стандарт (+) n=124	Специфичност (%) Стандарт (-) n=72	Ефикасност (%) Стандарт n=196	McNemar тест
Директно изследване	n=79 (**63,71**%)	n=64 (**88,89**%)	n=143 (**72,96**%)	**<0,001**

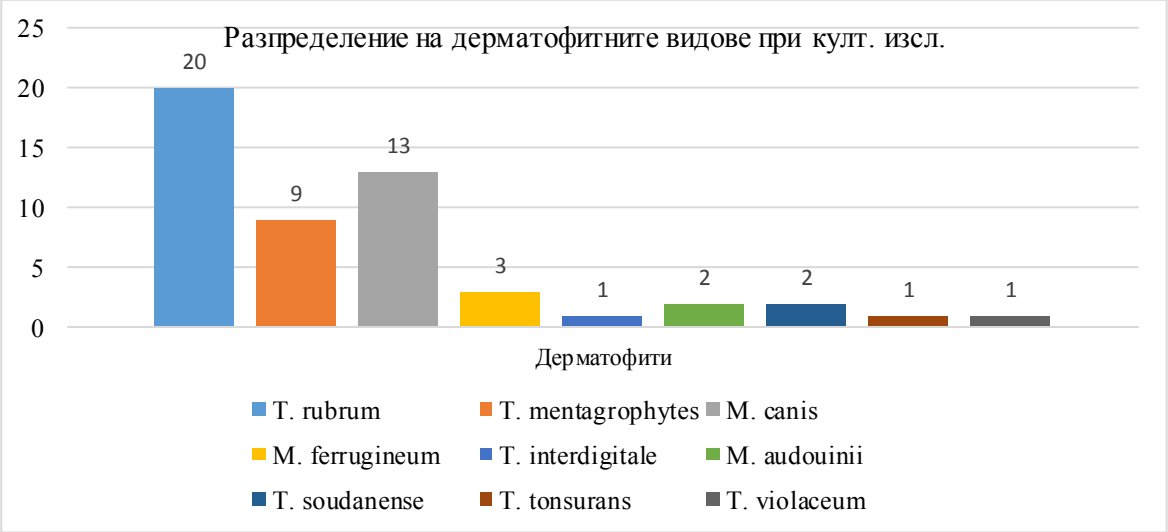
1.6.2 Резултати от културелното изследване за всички пациенти (n=196)

Получените положителните резултати за дерматофити и *C. albicans* от културелното изследване бяха 72 (36,73%), докато отрицателните - 124 (63,27%). Изцяло стерилни посявки останаха 52 проби (26,53%), а отрицателните проби спрямо определения стандарт са останалите 72 проби (36,73%), при които резултатите бяха дрожди *C. non-albicans* и/или недерматофитни плесени (НДП) (Таблица 5).

Таблица 5 – Резултат от културелно изследване за всички пациенти (n=196).

Резултат от култура	Брой (n)	Процент (%)
Положителен (вкл. дерматофити и *C. albicans*)	72	36,73
Отрицателен (стерилно петри)	52	26,54
Отрицателен (недерматофитни плесени и *C. non-albicans)*	72	36,73
Общо	196	100,0

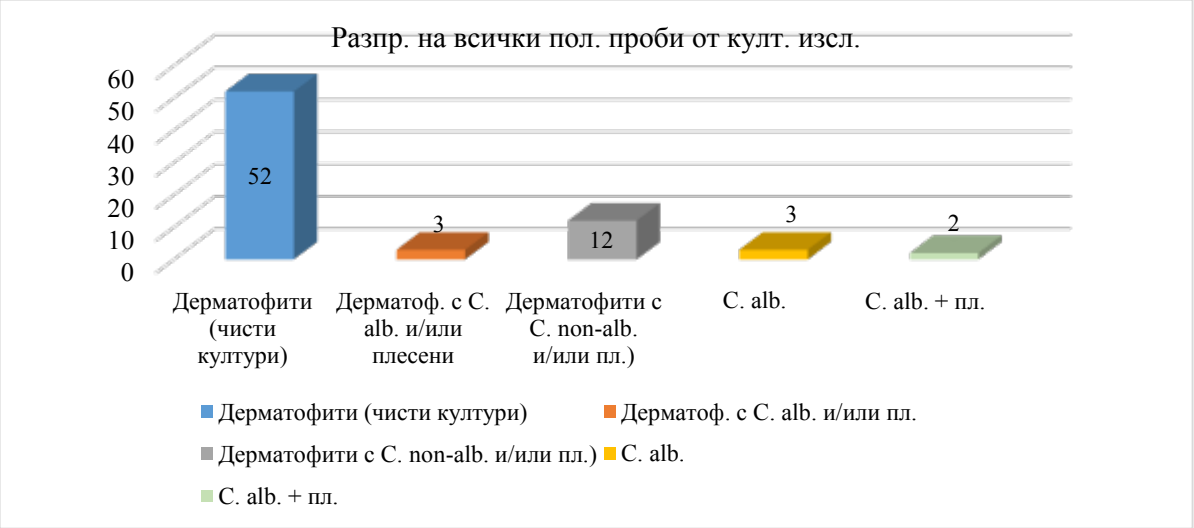
От положителните проби на посявките, 52 (72,22%) бяха чисти култури на дерматофити. От тях най-често срещан беше *T. rubrum* в 20 проби (38,46%), следван от *M. canis* – 13 (25%), *T. mentagrophytes* – 9 (17,30%), *M. ferrugineum* – 3 (5,76%), *M. audouinii* и *T. soudanense* по 2 проби всеки (3,84%) и *T. tonsurans* и *T. violaceum* по 1 проба всеки (1,92%) (Фигура 26).



Фигура 26 – Разпределение на дерматофитните видове при културелно изследване.

Останалите положителни резултати са на чисти култури *C. albicans* – 3 броя (4,16%) и смесени инфекции – 17 (23,61%), разпределени както следва*:* *T. rubrum* и *C. non-albicans* – 3 проби, *T. rubrum* и *C. albicans* – 1, *T. rubrum, C. albicans* и плесен – 1*, T. rubrum* и плесен – 3, *T. rubrum, C. non-albicans* и плесен – 1, *T. mentagrophytes* и *C. albicans* – 1, *T. mentagrophytes* и *C. non-*

albicans – 1, *T. mentagrophytes* и плесен – 2, *T. interdigitale* + плесен – 1, *M. ferrugineum* и плесен – 1 и *C. albicans* с плесени – 2 проби (Фигура 27).



Фигура 27 – Разпределение на всички положителни проби от култ. изследване (n=72).

На Chrom agar се идентифицираха следните видове *Candida: C. albicans* (8 проби), *C. krusei* (7 проби*), C. glabrata* (6), *C. tropicalis* (1) в чисти и смесени култури. От тях само *C. albicans* влиза в стандарта за положителна проба, останалите видове се означаваха като *C. non-albicans*.

Изцяло растеж на недерматофитни плесени (НДП) се наблюдаваше на 45 посявки. От тях най-често се идентифицираха *Rhodotorula spp, Aspergillus spp, Scopolariopsis spp, Alternaria spp, Penicillium spp*. Останалите отрицателни проби (27) имаха растеж на дрожди *C. non-albicans* или смесен растеж на *C. non-albicans* с НДП.

Чувствителността, специфичността и ефикасността на културелното изследване за всички изследвани проби са показани в таблица 9. Стойностите им са 58,06% чувствителност, 100% специфичност и 73,47% ефикасност ($p<0,001$) (Таблица 6).

Таблица 6 – Чувствителност, специфичност и ефикасност на културелното изследване за всички проби.

Вид изследване	Чувствителност (%) Стандарт (+) n=124	Специфичност (%) Стандарт (-) n=72	Ефикасност (%) Стандарт n=196	McNemar тест
Културелно изследване	n=72 (**58,06**%)	n=72 (**100,0**%)	n=144 (**73,47**%)	**<0,001**

1.6.3 Резултати от хистологично изследване

Хистологично изследване е направено само на материали от нокти (n=86) и са подробно описани в подточка 4.6.4 Резултати от хистологично изследване на пациентите със съмнения за онихомикоза.

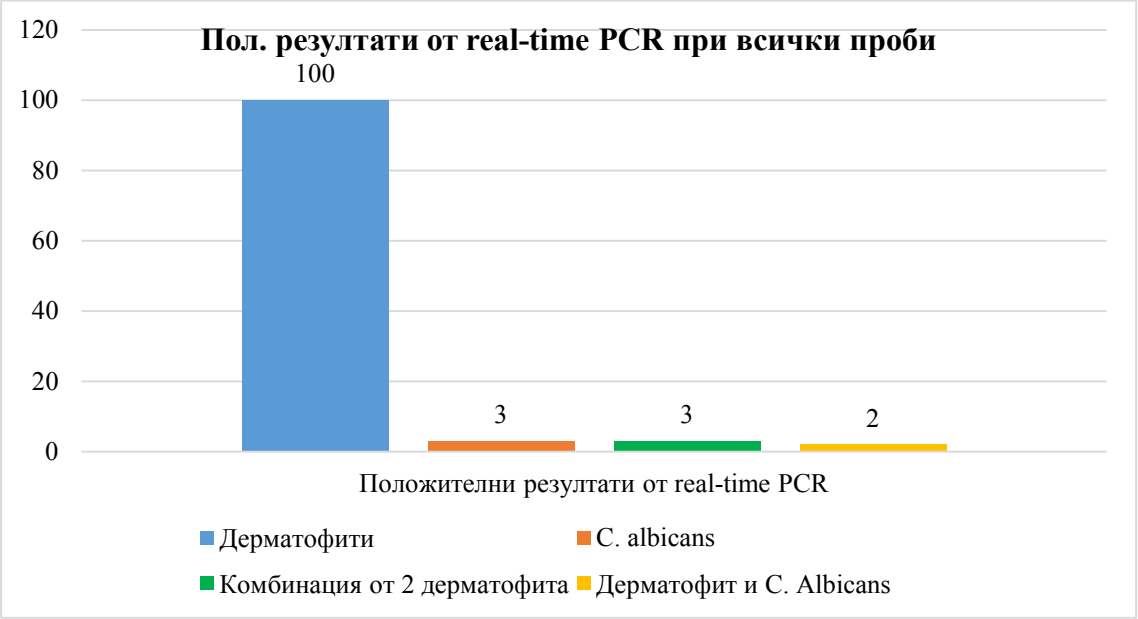
1.6.4 Резултати от real-time PCR за всички проби (n=196)

Отчетените положителни резултати от полимеразната верижна реакция в реално време (real-time PCR) бяха 108 (55,10%), а отрицателните 82 (41,84%). Получени бяха 6 невалидни проби за изследването (3,06%), което се дължи на инхибиране на пробата по време на PCR процеса, вследствие на по-голямо количество материал или материал с високо съдържание на човешка ДНК (нокти) (Таблица 7).

Таблица 7 – Резултати за всички проби от real-time PCR.

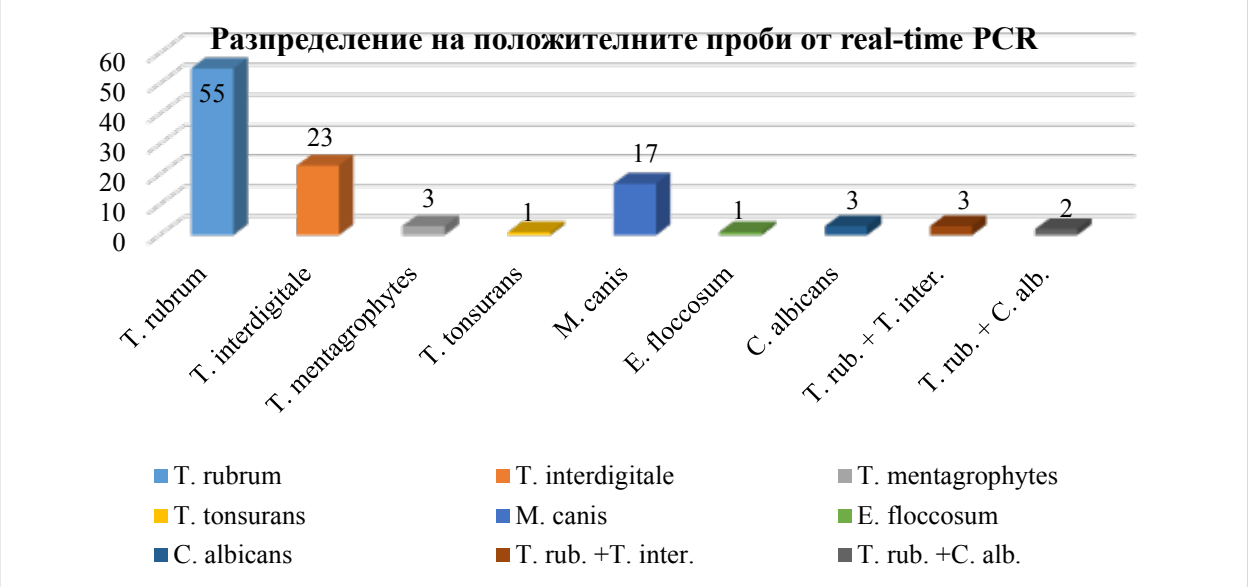
Резултат от real-time PCR	**Брой (n)**	**Процент (%)**
Положителен	108	55,10
Отрицателен	82	41,84
Невалиден	6	3,06
Общо	196	100,0

Сред положителните резултати, DermaGenius (DG) детектира предимно дерматофити – 100 (92,59%), но също така *C. albicans* – 3 (1,38%). Смесените инфекции на два дерматофита или дерматофит и *C. albicans* бяха 5 на брой (4,63%) (Фигура 28).



Фигура 28 – Положителни резултати от real-time PCR за всички проби.

Най-честият представител на дерматофитите беше *T. rubrum* с 55 проби (50,93%), следван от *T. interdigitale* – 23 (21,30%), *M. canis* – 17 (15,74%), *T. mentagrophytes* – 3 (3,78%), *C. albicans* – 3 (3,78%), *E. floccosum* – 1 (0,93%), *T. tonsurans* – 1 (0,93%). Смесени сигнали за *T. rubrum* и *T. interdigitale* в 3 проби (3,78%), а *T. rubrum* и *C. albicans* в 2 (1,85%) (Фигура 29).



Фигура 29 – Разпределение на положителните проби от real-time PCR за всички проби.

Отчетената чувствителност за полимеразната верижна реакция в реално време беше 88,52%, а специфичността и ефикасността съответно 100% и 92,63% (Таблица 8).

Таблица 8 – Чувствителност, специфичност и ефикасност на real-time PCR за всички проби.

Вид изследване	Чувствителност (%) Стандарт (+) n=122	Специфичност (%) Стандарт (-) n=68	Ефикасност (%) Стандарт n=190	McNemar тест
Real-time PCR	n=108 (**88,52%**)	n=68 (**100,0%**)	n=176 (**92,63%**)	**<0,001**

С получените резултати, се отхвърли нулевата хипотеза (H_0), която гласи, че няма разлика в чувствителността, специфичността и ефикасността на конвенционални методи, сравнени с real-time PCR.

1.7 Несъответствия в резултатите

1.7.1 Инхибиране на проби от real-time PCR

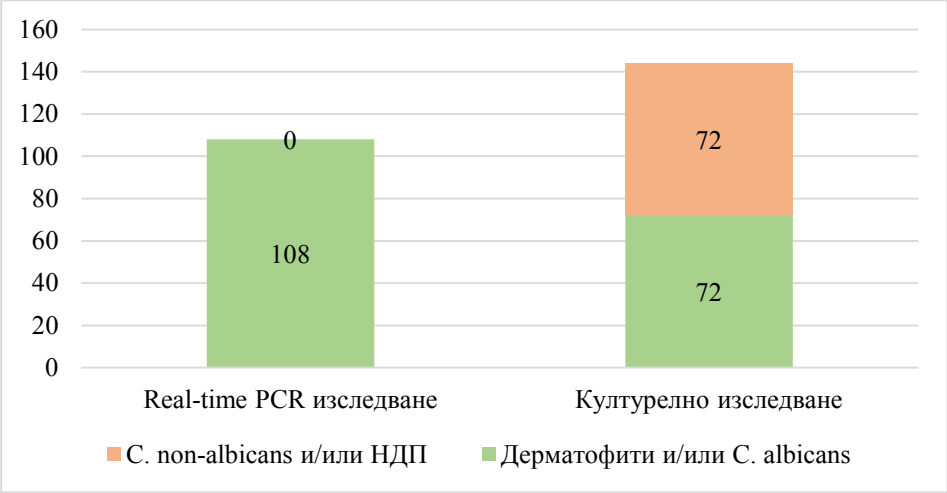
Real-time PCR беше инхибиран при 6 случая от общо 196 (3,06%). В тези случаи, Ct стойностите на вътрешната контрола (IC) бяха твърде високи в сравнение с тези на отрицателната контрола (NC), при което не беше детектиран причинител. Това предполага наличието на PCR инхибитор, което най-често се случва при голямо количество материал, твърд материал (най-често нокти) или голямо количество човешка ДНК в пробата. Сред тези 6 проби, 1 беше положителна на хистологичното изследване и 1 положителна за *C. albicans* от културелното изследване. Останалите 4 бяха отрицателни.

1.7.2 Несъответствия на real-time PCR с културелното изследване

Поради инхибиране (1 случай) или отрицателен резултат (10 случая) – (5,61%), DermaGenius (DG) PCR пропусна детекцията на 1 *T. rubrum*, 2 *T.*

mentagrophytes, 2 T. *soudanense*, 1 *T. tonsurans*, 1 *T. violaceum*, 1 *M. audouinii*, 2 *C. albicans*, които присъстват в кита за детекция, както и 1 M. ferrugineum, който не е включен в кита.

От друга страна, културелното изследване пропусна диагностицирането на 24 случая (12,24%), поради отрицателен резултат, както и 23 случая (11,73%), където имаше растеж на дрожди *C. non-albicans* и/или недерматофитни плесени, при които real-time PCR имаше положителни резултати. Пропуснати бяха общо 30 *T. rubrum,* 10 *T. interdigitale*, 2 *T mentagrophytes*, 3 *M. canis*, 1 *E. floccosum* и 1 смесена инфекция *от T. rubrum* в комбинация с *C. albicans*. На фигура 33 са показани резултатите от положителните проби за real-time PCR и резултатите от културелното изследване за дерматофити, *C. albicans, C. non-albicans* и недерматофитни плесени (НДП), които илюстрират разликите в получените резултати между двете изследвания (Фигура 30).



Фигура 30 – Съпоставяне на положителни резултати за real-time PCR, спрямо положителните резултати от културелното изследване (по стандарт) и резултатите от растеж на C. non-albicans и/или НДП.

1.7.3 Несъответствия на видовата идентификация

Несъответствия на видовата идентификация базирани на получените резултати от културелното изследване и от real-time PCR се наблюдаваха при 17 случая, показани нагледно на таблица 9.

Таблица 9 – Несъответствия във видовата идентификация между real-time PCR и култура.

Резултат от real-time PCR изследване	**Резултат от културелно изследване**
8 проби T. interdigitale	**7** проби T. mentagrophytes, **1** проба T. mentagrophytes + C. albicans
2 – T. interdigitale + T. rubrum	**1** – T. mentagrophytes, **1** – T. rubrum
1 – T. interdigitale	**1** – T. rubrum + C. albicans
1 – C. albicans	**1** – T. rubrum
1 – T. rubrum + C. albicans	**1** – C. albicans
1 – T. interdigitale	**1** – M. canis
1 – T. interdigitale	**1** – M. ferrugineum
1 – T. rubrum	**1** – M. ferrugineum
1 – M. canis	**1** – T. mentagrophytes

Общо 8 случая, детектирани от real-time PCR като *T. interdigitale*, бяха диагностицирани от културелното изследване като *T. mentagrophytes* (1 случай *T. mentagrophytes + C. albicans*); 2 случая на смесена инфекция на *T. interdigitale* в комбинация с *T. rubrum* от PCR, бяха идентифицирани от културата като 1 *T. mentagrophytes и* 1 *T. rubrum*; 1 случай на *T. interdigitale* при PCR беше диагностициран като смесена инфекция на *T. rubrum* и *C. albicans* при културата; 1 случай на *C. albicans* от PCR беше диагностициран културелно като *T. rubrum*; 1 случай на смесена инфекция на *T. rubrum* и *C. albicans* с DG беше с резултат само *C. albicans* на културелното изследване; 1 случай на *T. interdigitale* от PCR беше диагностициран като *M. canis* от културата; 1 случай на *T. interdigitale* от PCR беше диагностициран като *M. ferrugineum* от културелното изследване; 1 случай на *T. rubrum* от real-time PCR беше диагностициран като *M. ferrugineum* при посявката и 1 случай на *M. canis* от real-time PCR беше диагностициран като *T. mentagrophytes* от културелното изследване. Тези резултати биха могли да бъдат потвърдени

положително в полза на DG PCR чрез ITS (internal transcribed spacer) секвениране.

1.8 Установени зависимости

Спрямо установения стандарт за истински положителна проба, в получените резултати се отличиха две ясни зависимости, свързани с пола и възрастта на пациентите.

От всички пациенти, участващи в проучването, мъжете бяха 93 (47,45%) на брой, а жените – 103 (52,55%). От мъжете, 71 (76,34%) бяха позитивни за гъбична инфекция, спрямо установения стандарт, а 22 (23,66%) бяха отрицателни. От жените, 53 (51,46%) бяха положителни, а 50 (48,54%) – отрицателни (Таблица 10).

Таблица 10 – Разпределение на положителни и отрицателни проби според пола.

	Всички пациенти		
	Положителни	Отрицателни	Общо
Мъже – брой/(%)	71/(**76,34%**)	22/(**23,66%**)	93/(100%)
Жени – брой/(%)	53/(**51,46%**)	50/(**48,54%**)	103/(100%)
Общо – брой/(%)	124/(63,27%)	72/(36,73%)	196/(100%)

Намерена е статистически значима разлика при положителните и отрицателните резултати спрямо пола ($\chi^2 = 13,025$, $p<0,001$).

Всички пациенти в проучването бяха разпределени и във възрастови групи през 20 години с цел да се установи има ли зависимост на положителните и отрицателните проби според възрастта. Положителните пациенти в групата до 20 години бяха 19 (15,32%), 20-39 години – 10 (8,07%), 40-59 години – 48 (38,71%), 60-79 години – 39 (31,45%) и над 80 години – 8 (6,45%) (Таблица 11).

Таблица 11 – Разпределение на положителните и отрицателните проби според възрастта.

	Всички пациенти		
	Положителни	Отрицателни	Общо
До 20 години (брой) % от общия бр. положителни проби	19 15,32%	7 9,72%	26 13,27%
20-39 години (брой) % от общия бр. положителни проби	10 8,07%	21 29,17%	31 15,82%
40-59 годин (брой) % от общия бр. положителни проби	48 **38,71%**	18 25,0%	66 33,67%
60-79 години (брой) % от общия бр. положителни проби	39 **31,45**	23 31,94%	62 31,63%
Над 80 години (брой) % от общия бр. положителни проби	8 6,45%	3 4,17%	11 5,61%
Общо % от общия бр. положителни проби	124 100,0%	72 100,0%	196 100,0%

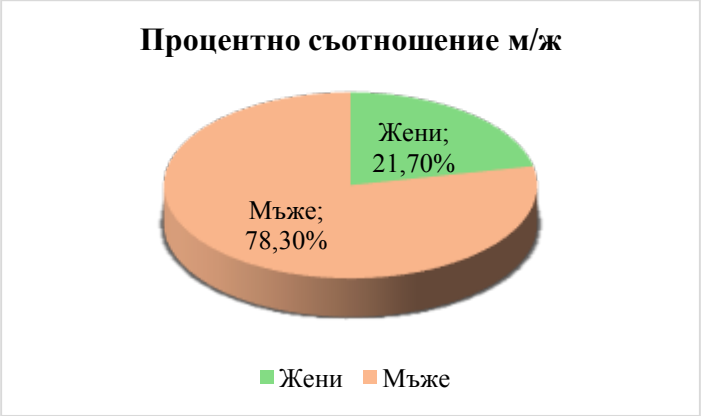
Наблюдава се статистически значим по-голям процент на положителните проби за микотична инфекция при пациентите между 40-59 години и 60-79 години ($\chi^2 = 16,871$, $p<0,002$).

2. Резултати от проспективно сравнително проучване, оценяващо резултатите от директното микроскопско, културелното и real-time PCR изследвания при пациенти със съмнения за дерматофитна инфекция с локализация по скалпа и брадата (n=23)

2.1 Обща характеристика на пациентите и събраните материали за изследвания

Пациентите със съмнения за гъбична инфекция, причинена от дерматофити, с локализация по скалп и брада бяха 23 на брой, на възраст от 2 до 56 години, средна възраст 13,57±3,03 години, стандартно

отклонение 14,52. Медианата беше 8,00, а модата на възрастта - 8. От тях 18 (78,3%) бяха мъже, а 5 (21,7%) жени (Фигура 31).



Фигура 31 – Процентно съотношение на мъже и жени сред пациентите със съмнения за микоза на скалп и брада.

Материалите, събрани от скалп – косми и сквами от капилициум, бяха 21 (93,30%) при пациенти между 2 и 27 години, а тези от брада (косми от брада и сквами от кожата в тази област) съответно 2 (8,70%) при пациенти на 55 и 56 години.

2.2 Разпределение на пациентите в зависимост от давността на патологичните изменения (скалп и брада)

Най-много пациенти имаха оплаквания по-малко от 3 месеца преди прегледа – 21 (91,4%), 1 пациент имаше оплаквания от 6 месеца (4,3%) и 1 в продължение на една година (4,3%).

2.3 Стандарт за положителна проба

Спрямо зададения стандарт за истински положителен резултат за микоза, броят на положителни проби на пациенти със съмнения за микоза на скалп и брада беше 20 (86,94%). Отрицателните изследвания бяха 3 на брой (13,04%).

2.4 Резултати от проведени изследвания

2.4.1 Резултати от директно микроскопско изследване на пациентите със съмнения за микоза на скалп и брада (n=23)

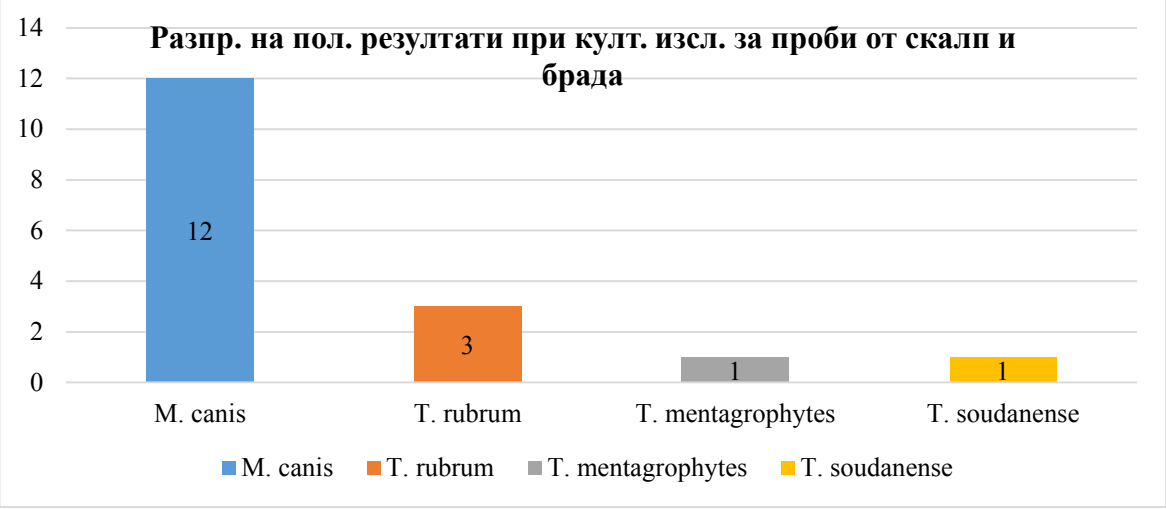
Положителните резултати бяха 17 на брой (73,91%) от всички проби, а отрицателните съответно 6 (26,09%).

Чувствителността за директната микроскопия беше 85%, специфичността 100%, а ефикасността 86,96%, съгласно установения стандарт (p>0,05) (Таблица 12).

2.4.2 Резултати от културелното изследване на пациентите със съмнения за микоза на скалп и брада (n=23)

Положителните резултати от културелното изследване бяха 17 на брой (73,91%), а отрицателните съответно 6 (26,09%), като на 5 от тях нямаше никакъв растеж, а на 1 проба имаше растеж на НДП (*Rhodotorula spp*).

От положителните проби на посявките, всички 17 (73,91%) са чисти култури на дерматофити. От тях най-често срещан беше *M. canis* в 12 проби (70,59%), следван от *T. rubrum* – 3 (17,65%), *T. mentagrophytes* – 1 (5,88%), *T. soudanense* – 1 (5,88%) (Фигура 32).



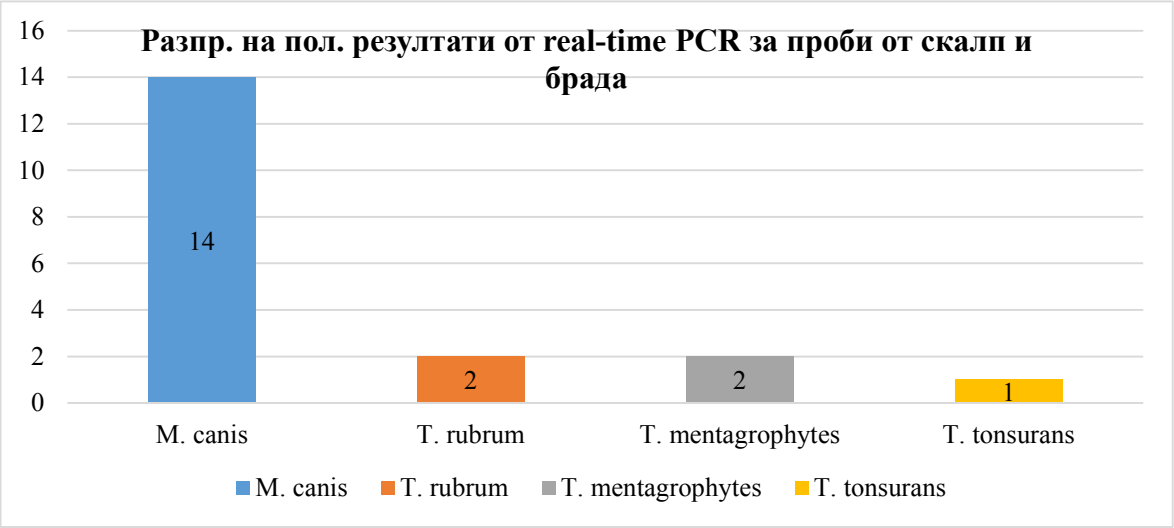
Фигура 32 – Разпределение на положителните резултати от култура при пациенти със съмнения за микоза на скалп и брада.

Чувствителността, специфичността и ефикасността на културелното изследване за проби от скалп и брада бяха 85% чувствителност, 100% специфичност и 86,96% ефикасност (p>0,05) (Таблица 12).

2.4.3 Резултати от real-time PCR за пробите от скалп и брада

Отчетените положителни резултати от полимеразната верижна реакция в реално време (real-time PCR) бяха 19 (82,61%), а отрицателните 4 (17,39%).

Сред положителните резултати, DermaGenius (DG) детектира изцяло дерматофити – *M. canis* – 14 (73,68%), *T. rubrum* – 2 (10,53%), *T. mentagrophytes* – 2 (10,53%) и *T. tonsurans* – 1 (5,26%) (Фигура 33).



Фигура 33 – Разпределение на положителните резултати от real-time PCR за пробите от скалп и брада.

Отчетената чувствителност за полимеразната верижна реакция в реално време беше 95%, а специфичността и ефикасността съответно 100% и 95,65% (p>0,05) (Таблица 12).

Таблица 12 – Чувствителност, специфичност и ефикасност на резултатите от директно, културелно и real-time PCR изследвания за пробите от скалп и брада.

	Директно изследване	Културелно изследване	Real-time PCR
Чувствителност (%) Стандарт (+) n=20	n=17 (**85,0**%)	n=17 (**85,0**%)	n=19 (**95,0**%)
Специфичност (%) Стандарт (-) n=3	n=3 (**100,0**%)	n=3 (**100,0**%)	n=3 (**100,0**%)
Ефикасност (%) Стандарт n=23	n=23 (**86,96**%)	n=23 (**86,96**%)	n=22 (**95,65**%)
McNemar тест	>0,05	>0,05	>0,05

3. Резултати от проспективно сравнително проучване, оценяващо резултатите от директното микроскопско изследване, културелното и real-time PCR изследвания при пациенти със съмнения за дерматофитна инфекция с локализация по кожата (n=29)

3.1 Обща характеристика на пациентите и събраните материали за изследвания

Пациентите със съмнения за гъбична инфекция, причинена от дерматофити, с локализация по кожата бяха 29 на брой, на възраст от 5 до 84 години, средната възраст беше 48,10±3,51, със стандартно отклонение 18,89. Медианата беше 53,00, а модата на възрастта беше 43. От тях 17 (58,62%) бяха мъже, а 12 (41,38%) жени (Фигура 34).

Фигура 34 – Процентно съотношение на мъже и жени сред пациентите със съмнения за микоза на кожата.

Материалите са сквами от кожа, разпределени както следва: 4 (13,80%) от ръце, 11 (37,93%) от крака, 11 (37,93%) от трункус, 3 (10,34%) от ингвинални гънки.

3.2 Разпределение на пациентите в зависимост от давността на патологичните изменения по кожата

Най-много пациенти имаха оплаквания по-малко от 3 месеца преди прегледа – 18 (62,07%), 2 пациенти имаха оплаквания от 6 месеца (6,90%) и 1 в продължение на една година (3,45%), 3 имаха оплаквания между 1 и 5 години (10,34%), 3 между 6 и 10 години (10,34%) и 2 пациенти имаха оплаквания от повече от 10 години (6,90%).

3.3 Стандарт за положителна проба

Спрямо зададения стандарт за истински положителен резултат за микоза, броят на положителни проби на пациенти със съмнения за микоза на кожата беше 21 (72,41%). Отрицателните изследвания бяха 8 на брой (27,59%).

От отрицателните проби, невалидна беше 1 проба (3,45%), която е отрицателна и на културелното изследване, следователно не беше включена при изчисляването на чувствителността, специфичността и ефикасността на real-time PCR.

3.4 Резултати от проведени изследвания

За да се сравнят резултатите при real-time PCR с директното и културелното изследвания при микотични инфекции на кожата, се проучиха чувствителността, специфичността и ефикасността на всяко едно от проведените изследвания.

3.4.1 Резултати от директно микроскопско изследване на пациентите със съмнения за микоза на кожата (n=29)

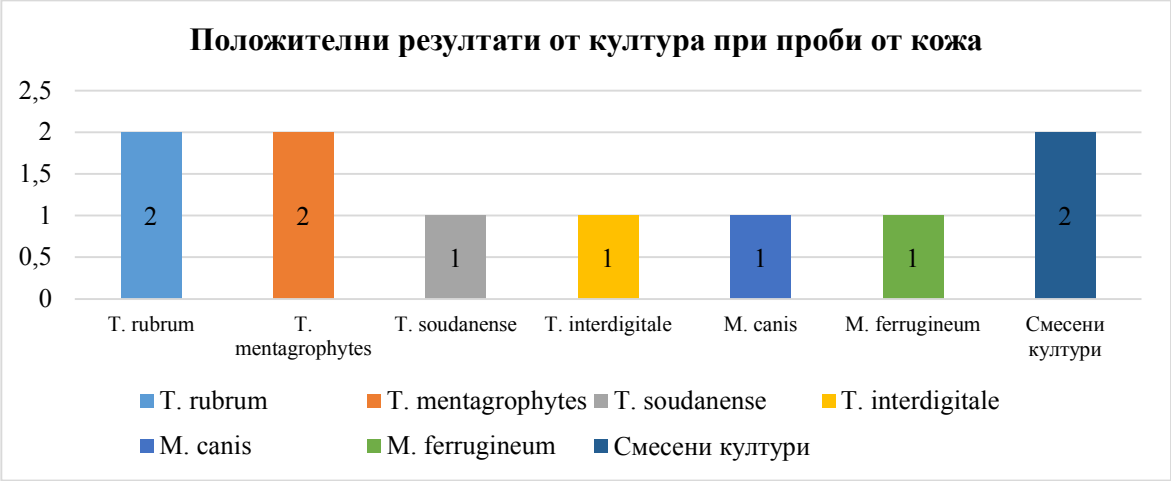
Положителните резултати от директното микроскопско изследване бяха 22 на брой (75,86%), а отрицателните съответно 7 (24,14%).

Чувствителността за директната микроскопия беше 85,71%, специфичността 50%, а ефикасността 75,86%, съгласно установения стандарт (p>0,05) (Таблица 13).

3.4.2 Резултати от културелното изследване на пациентите със съмнения за микоза на кожата (n=29)

Получените положителните резултати от културелното изследване бяха 10 на брой (34,48%), а отрицателните съответно 19 (65,52%), като на 13 от тях нямаше никакъв растеж, а на 6 проби имаше растеж на дрожди *C. non-albicans* и/или НДП.

От положителните проби на посявките, 8 (80%) бяха чисти култури на дерматофити. От тях 2 проби бяха *T. rubrum* (20%), 2 *T. mentagrophytes* (20%), 1 – *T. soudanense* (10%), 1 *T. interdigitale* (10%), 1 *M. canis* (10%), 1 *M. ferrugineum* (10%). Останалите 2 положителни проби бяха на смесени инфекции – 1 *T. rubrum* + *C. non-albicans* и 1 *T. rubrum* + *C. non-albicans* + НДП (Фигура 35).



Фигура 35 – Разпределение на положителните резултати от културата при пробите от кожа.

Чувствителността, специфичността и ефикасността на културелното изследване за проби от кожа бяха както следва: 47,62% чувствителност, 100% специфичност и 62,07% ефикасност (p<0,05) (Таблица 13).

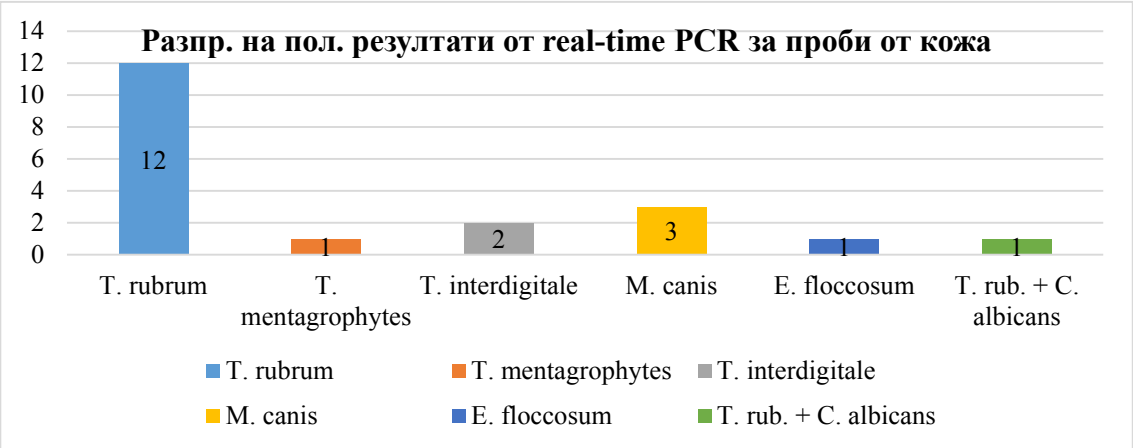
Таблица 13 - Чувствителност, специфичност и ефикасност на резултатите от директно и културелно изследвания за пробите от кожа.

Вид изследване	Чувствителност (%) Стандарт (+) n=21	Специфичност (%) Стандарт (-) n=8	Ефикасност (%) Стандарт n=29	McNemar тест
Директно изследване	n=18 (**85,71%**)	n=4 (**50,0%**)	n= 22 (**75,86%**)	>0,05
Културелно изследване	n=10 (**47,62%**)	n=8 (**100,0%**)	n=18 (**62,07%**)	<0,05

3.4.3 Резултати от real-time PCR за пробите от кожа

Отчетените положителни резултати от полимеразната верижна реакция в реално време (real-time PCR) бяха 20 (68,97%), отрицателните 8 (27,59%) и имаше 1 невалидна проба (3,45%).

Сред положителните резултати, DermaGenius (DG) детектира изцяло дерматофити. Най-често срещаният беше *T. rubrum* – 12 (41,38%), следван от *M. canis* – 3 (10,34%), *T. mentagrophytes* – 1 (3,45%), *T. interdigitale* – 2 (6,90%), *E. floccosum* – 1 (3,45%) и 1 смесен сигнал от *T. rubrum* + *C. albicans* (3,45%) (Фигура 36).



Фигура 36 – Разпределение на положителните резултати от real-time PCR от пробите от кожа.

Отчетената чувствителност за полимеразната верижна реакция в реално време беше 95,24%, а специфичността и ефикасността съответно 100% и 85,71% (p>0,05) (Таблица 14).

Таблица 14 – Чувствителност, специфичност и ефикасност на резултатите от real-time PCR за пробите от кожа.

Вид изследване	Чувствителност (%) Стандарт (+) n=21	Специфичност (%) Стандарт (-) n=7	Ефикасност (%) Стандарт n=28	McNemar тест
Real-time PCR	n=20 (**95,42**%)	n=7 (**100,0**%)	n=24 (**85,71**%)	>0,05

4. Резултати от проспективно сравнително проучване, оценяващо резултатите от директното микроскопско, културелното, хистологичното и real-time PCR изследвания при пациенти със съмнения за дерматофитна инфекция с локализация по ноктите (n=144)

4.1 Обща характеристика на пациентите и събраните материали за изследвания

Пациентите със съмнения за гъбична инфекция, причинена от дерматофити, с локализация по нокти бяха 144 на брой, на възраст от 3 до 90 години, на средна възраст 55,01±1,47 години, със стандартно отклонение 17,62. Медианата беше 57,00, а модата на възрастта - 60. От тях 58 (40,28%) бяха мъже, а 86 (59,72%) жени (Фигура 37).

Фигура 37 – Процентно съотношение на мъже и жени сред пациентите със съмнения за онихомикоза.

Събраните материалите бяха изрезки и остъргвания от нокти и субунгвален материал, разпределени както следва: 8 (5,56%) от нокти на ръце, 136 (94,44%) от нокти на крака.

4.2 Степен на засягане и локализация на промените по нокътната плочка

Според броят нокти, които бяха засегнати, измененията по ноктите бяха разпределени в три степени – лека (при засягане на <4 нокътя), средна (между 5 и 8 нокътя) и тежка (>9 нокътя). Пациентите с лека степен на засягане бяха 105 (72,92%), със средна степен – 3 (2,08%) и с тежка степен съответно 36 (25%) (Таблица 15).

Таблица 15 – Степен на засягане на ноктите.

Степен на засягане	Брой (n)	Процент (%)
Лека	105	72,92
Средна	3	2,08
Тежка	36	25
Общо	144	100,0

Според вида и локализацията на засягането на нокътната плочка имаше 135 пациенти с дистално-латерално засягане (ДЛОМ) (93,75%), 1 пациент с повърхностна бяла ОМ (0,69%) и 8 пациенти в тотална дистрофична ОМ (5,56%) (Таблица 16).

Таблица 16 – Вид на засягането по нокътната плочка.

Вид на засягането по нокътната плочка	Брой (n)	Процент (%)
Дистолатерално	135	93,75
Бяла повърхностна ОМ	1	0,69
Тотална дистрофична ОМ	8	5,56
Общо	144	100,0

4.3 Разпределение на пациентите в зависимост от давността на патологичните изменения (по ноктите)

Най-много пациенти имаха оплаквания между 1 и 5 години преди прегледа – 58 (40,28%), следвани от пациентите с оплаквания между 6 и 10 години – 31 (21,53%), 22 с оплаквания до 1 година преди прегледа (15,28%), 20 с оплаквания над 10 години (13,89), 8 до 6 месеца (5,56%) и 5 по-малко от 3 месеца преди прегледа (3,47%).

4.4 Наличие на диабет

От всички 144 пациенти със съмнения за онихомикоза, 93 (64,58%) нямаха диабет, а останалите 51 бяха със захарен диабет (35,42%). Пациентите със захарен диабет бяха включени в текущото проучване по Докторантски проект №ДПДП07/20 г. Всички те бяха с контролиран диабет с давност на заболяването, описана в Таблица 17.

Таблица 17 – Давност на заболяването при пациентите със ЗД.

Давност на ЗД	Брой (n)	Процент (%)
От 1 до 5 години	16	31,37
От 6 до 10 години	20	39,22
Над 10 години	5	9,80
Над 15 години	10	19,61
Общо	51	100,0

4.5 Стандарт за положителна проба

Спрямо зададения стандарт за истински положителен резултат за микоза, броят на положителни проби на пациенти със съмнения за онихомикоза беше 83 (57,64%). Отрицателните изследвания бяха 61 на брой (42,36%).

Невалидни за real-time PCR бяха 5 проби (3,47%), като 2 от тях бяха положителни на културелното или хистологичното изследвания, но 3 от пробите бяха отрицателни и на другите изследвания. Тези 5 проби не бяха включени при изчисляването на чувствителността, специфичността и ефикасността на real-time PCR.

4.6 Резултати от проведени изследвания

За да се сравнят резултатите при real-time PCR с директното, културелното и хистологичното изследвания при микотични инфекции на ноктите, се проучиха чувствителността, специфичността и ефикасността на всяко едно от проведените изследвания.

4.6.1 Резултати от директно микроскопско изследване на пациентите със съмнения за онихомикоза (n=144)

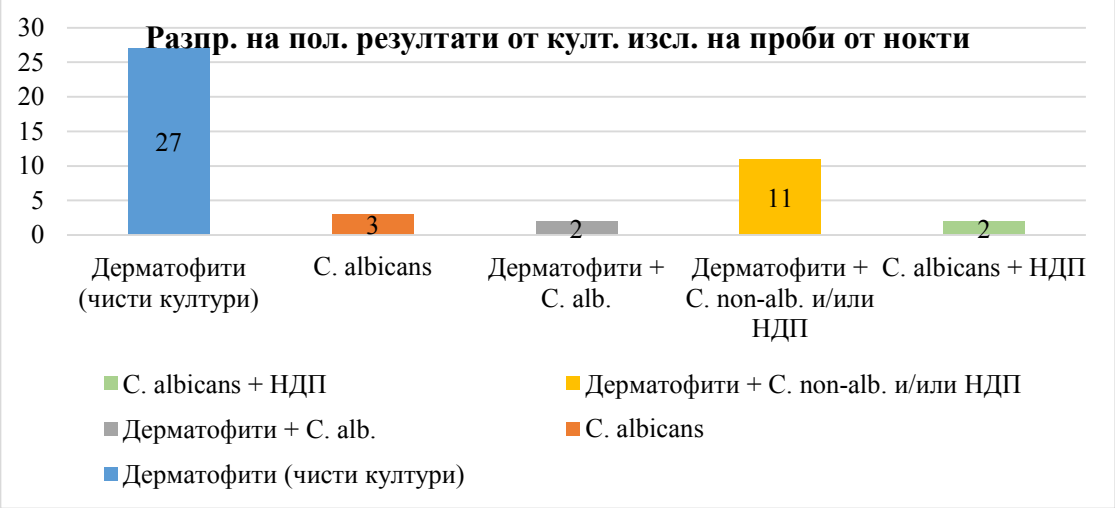
Положителните резултати от директната микроскопия бяха 48 на брой (33,33%) от всички проби, а отрицателните съответно 96 (66,67%).

Чувствителността за директната микроскопия беше 53,01%, специфичността 93,44%, а ефикасността 70,14%, съгласно установения стандарт ($p<0,001$) (Таблица 18).

4.6.2 Резултати от културелното изследване на пациентите със съмнения за онихомикоза (n=144)

Получените положителните резултати от културелното изследване бяха 45 на брой (31,25%), а отрицателните съответно 99 (68,75%), като на 34 (23,61%) от тях нямаше никакъв растеж, а на 65 (45,14%) проби имаше растеж на дрожди *C. non-albicans* и/или НДП.

От положителните проби на посявките, 27 (60%) бяха чисти култури на дерматофити. От тях 15 проби бяха *T. rubrum* (33,33%), 6 *T. mentagrophytes* (13,33%), 1 – *T. tonsurans* (2,22%), 1 *T. violaceum* (2,22%), 2 *M. audouinii* (4,44%) и 2 *M. ferrugineum* (4,44%). Положителни за *C. albicans* бяха 3 проби (6,67%). Останалите 15 положителни проби бяха със смесен растеж – 1 *T. rubrum* + *C. albicans*, 1 *T. mentagrophytes* + *C. albicans*, 2 *C. albicans* + НДП, 2 *T. rubrum* + *C. non-albicans,* 3 *T. rubrum* + НДП, 1 *T. rubrum* + *C. non-albicans* + НДП, 2 *T. mentagrophytes* + НДП, 1 *T. mentagrophytes* + *C. non-albicans,* 1 *T. interdigitale* + НДП и 1 *M. ferrugineum* + НДП (Фигура 38).



Фигура 38 – Разпределение на положителните културелни изследвания на проби от нокти.

На Chrom agar се идентифицираха следните видове *Candida*: 8 *C. albicans*, 7 *C. krusei*, 6 *C. glabrata* и 1 *C. tropicalis*. Само *C. albicans* влиза в стандарта за положителна проба на текущото проучване. Всички останалите видове се означават като *C. non-albicans*.

Изцяло растеж на недерматофитни плесени (НДП) се наблюдаваше на 39 посявки. От тях най-често се идентифицираха *Rhodotorula spp, Aspergillus spp, Scopolariopsis spp, Alternaria spp, Penicillium spp*. Останалите отрицателни проби (26 проби) имаха растеж на *C. non-albicans* или смесен растеж на дрожди *C. non-albicans* с НДП.

Чувствителността, специфичността и ефикасността на културелното изследване за проби от нокти бяха 54,22% – чувствителност, 100% – специфичност и 73,61% – ефикасност (p<0,001) (Таблица 18).

Таблица 18 – Чувствителност, специфичност и ефикасност на директно микроскопско и културелно изследвания за проби от нокти.

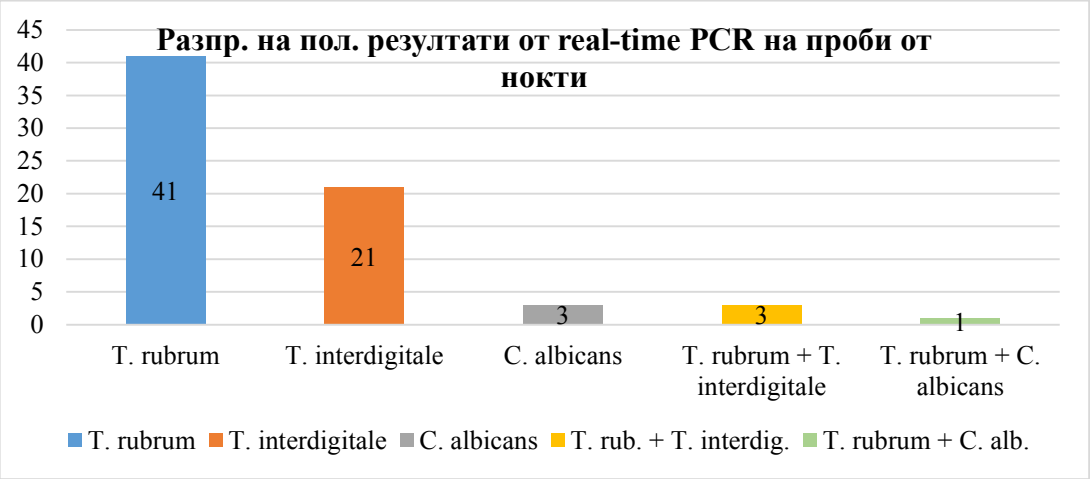
Вид изследване	Чувствителност (%) Стандарт (+) n=83	Специфичност (%) Стандарт (-) n=61	Ефикасност (%) Стандарт n=144	McNemar тест
Директно изследване	n=44 (**53,01%**)	n=57 (**93,44%**)	n=101 (**70,14%**)	<0.001
Културелно изследване	n=45 (**54,22%**)	n=61 (**100,0%**)	n=106 (**73,61%**)	<0.001

4.6.3 Резултати от real-time PCR на пациентите със съмнения за онихомикоза (n=144)

Отчетените положителни резултати от полимеразната верижна реакция в реално време (real-time PCR) бяха 69 (47,92%), отрицателните 70 (48,61%) и имаше 5 невалидни проби (3,47%).

Сред положителните резултати, DermaGenius (DG) детектира 62 дерматофита (89,85%), 3 проби с *C. albicans* (4,35%) и 4 смесени сигнала (5,80%), съдържащи *T. rubrum* + *T. interdigitale* (3 проби) и *T. rubrum* + *C. albicans* (1 проба).

Най-често срещаният дерматофит беше *T. rubrum* – 41 (59,42%), следван от *T. interdigitale* – 21 (30,43%) (Фигура 39).



Фигура 39 – Разпределение на положителните резултати от real-time PCR на проби от нокти.

Получените стойности за чувствителност, специфичност и ефикасност са както следва: 85,19% чувствителност, 100% специфичност и 91,37% за специфичност (p<0,001) (Таблица 19).

Таблица 19 – Чувствителност, специфичност и ефикасност на real-time PCR за проби от нокти.

Вид изследване	Чувствителност (%) Стандарт (+) n=81	Специфичност (%) Стандарт (-) n=58	Ефикасност (%) Стандарт n=139	McNemar тест
Real-time PCR	n=69 (**85,19%**)	n=58 (**100,0%**)	n=127 (**91,37%**)	<0,001

С получените резултати, се отхвърли нулевата хипотеза (H_0), която гласи, че няма разлика в чувствителността, специфичността и ефикасността на конвенционални методи сравнени с real-time PCR.

4.6.4 Резултати от хистологично изследване на пациентите със съмнения за онихомикоза (n=86)

Материал за хистологично изследване беше взет при 86 пациенти. От тях, 49 имаха положителен резултат (56,98%), а 37 (43,02%) бяха с отрицателен.

При 6 случая на положителна хистология, 5 бяха отрицателни, а 1 беше невалиден на real-time PCR. От друга страна, в 3 случая, където real-time PCR беше положителен, хистологичното изследване беше отрицателно.

Чувствителността, специфичността и ефикасността на хистологията за пробите от нокти беше 85,96%, 100% и 90,70%, респективно (p<0,001) (Таблица 20).

Таблица 20 – Чувствителност, специфичност и ефикасност на хистологичното изследва за проби от нокти.

Вид изследване	Чувствителност (%) Стандарт (+) n=57	Специфичност (%) Стандарт (-) n=29	Ефикасност (%) Стандарт n=86	McNemar тест
Хистологично изследване	n=49 (**85,96%)**	n=29 (**100,0%)**	n=78 (**90,70%)**	<0,001

4.6.5 Комбинация от real-time PCR и хистология

При комбиниране на хистолочното с real-time PCR изследванията се получиха най-високи резултати за чувствителност, специфичност и ефикасност – 96,26%, 100% и 97,62%, съответно (p>0,05) (Таблица 21).

Таблица 21 – Чувствителност, специфичност и ефикасност на комбиниране от хистологично и real-time PCR изследвания.

Вид изследване	Чувствителност (%) Стандарт (+) n=55	Специфичност (%) Стандарт (-) n=29	Ефикасност (%) Стандарт n= 84	McNemar тест
Хистология+ real-time PCR	n=53 (**96,36%)**	n=29 (**100,0%)**	n=82 (**97,62%)**	>0,05

5. Резултати от изследванията на честота и етиологични причините при пациенти с онихомикоза с и без диабет (n=144)

5.1 Обща характеристика на пациентите

Пациентите с онихомикоза с и без захарен диабет бяха разделени в 2 групи:

- **I група** (n=51) на пациенти със захарен диабет и съмнения за онихомикоза;
- **II група** (n=93) пациенти без ЗД, но със съмнения за ОМ.

В групата на диабетно болните със съмнения за онихомикоза бяха включени 51 пациенти от 44 до 86 години, на средна възраст 63,88 години, стандартно отклонение 10,788. С медиана 62,00 и мода на възрастта – 55. От тях 27 (52,94%) бяха мъже, а 24 (47,06%) – жени.

В групата на пациентите без диабет, но със съмнения за онихомикоза участваха 93 пациенти от 3 до 90 години, на средна възраст 50,15 години, стандартно отклонение 18,752. С медиана 51,00 и мода на възрастта – 68. От тях 31 (33,33%) бяха мъже, а 62 (66,67%) – жени.

5.2 Честота и етиологични причинители при двете групи пациенти

За да бъдат изчислени честотата и етиологичните причинители при двете групи пациенти и дали има разлика между тях, се проведоха статистически анализи на базата на резултатите от real-time PCR и от културелното изследване спрямо стандарта за истински положителна проба, зададен в настоящото проучване.

В таблица 23 са показани резултатите за етиологичните причинители от real-time PCR изследването на пациентите от група I и група II (Таблица 22).

Таблица 22 – Резултати за етиологичните причинители от real-time PCR за група I и група II.

Етиологичен причинител real-time PCR	Група I брой (%)	Група II брой (%)	Общо брой (%)
T. rubrum	19 (37,25%)	22 (23,66%)	41 (28,47%)
T. interdigitale	9 (17,65%)	12 (12,90%)	21 (14,58%)
T. rubrum + T. interdigitale	1 (1,96%)	2 (2,15%)	3 (2,08%)
T. rubrum + C. albicans	0 (0,0%	1 (1,08%)	1 (0,69%)
C. albicans	1 (1,96%)	2 (2,15%)	3 (2,08%)
Невалиден резултат	0 (0,0%)	5 (5,38%)	5 (3,47%)
Отрицателен резултат	21 (41,18%)	49 (52,69%)	70 (48,61%)
Общо	51 (100,0%)	93 (100,0%)	144 (100,0%)

Пациентите с етиологичен причинител *T. rubrum* от група I бяха 19 (37,25%), а тези от група II – 22 (23,66) от всички положителни проби в съответната група. Наличие на *T. interdigitale* от група I имаха 9 (17,65%), от група II – 12 (12,90%), смесени сигнали за *T. rubrum* + *T. interdigitale* за група I – 1 (1,96%), за група II – 2 (2,15%), смесен сигнал за *T. rubrum* + *C. albicans* само 1 (1,08%) в група II, *C. albicans* в група I – 1 проба (1,96%), а в група II – 2 (2,15%). Невалидните проби бяха 5 (5,38%) на брой само в група II, а отрицателните резултати – 21 (41,18%) за група I и 49 (52,69%) за група II.

По тези данни не се открива сигнификантна статистическа разлика между етиологичните причинители в двете групи пациенти ($\chi^2 = 6,847$, $p>0,335$).

Резултатите от културелното изследване показаха малки различия, но отново не се намери сигнификантна статистическа разлика между двете групи пациенти ($\chi^2 = 1,996$, $p>0,736$) (Таблица 23).

Таблица 23 – Резултати за етиологичните причинители от културелно изследване за група I и група II.

Етиологичен причинител културелно изсл.	Група I брой (%)	Група II брой(%)	Общо брой (%)
Дерматофит	12 (23,5%)	24 (25,8%)	36 (25%)
Дерматофит + C. albicans	2 (3,9%)	1 (1,1%)	3 (2,1%)
C. albicans	1 (2,0%)	4 (4,3%)	5 (3,5%)
НДП и/или C. albicans	23 (45,1%)	43 (46,2%)	66 (45,8%)
Отрицателен резултат	13 (25,5%)	21 (22,6%)	34 (23,6%)
Общо	51 (100,0%)	93 (100,0%)	144 (100,0%)

5.3 Установени зависимости

По отношение на наличието или липсата на захарен диабет и положителният резултат за гъбичен причинител, за групата на диабетно болните с ОМ и групата само с ОМ, се откроиха следните зависимости:

Установи се, че 72,55% от диабетно болните имаха положителен резултат за гъбична инфекция на ноктите, докато в групата на пациентите без диабет, само 49,46% имаха положителен резултат за микоза (Таблица 24). Получените резултати имат статистическа значимост ($\chi^2 = 7{,}190$, $p<0{,}007$).

Таблица 24 – Резултати за положителни и отрицателни изследвания за ОМ спрямо наличие или липса на ЗД.

Наличие на захарен диабет – да/не	Резултат по зададен стандарт		Общо
	Положителен	Отрицателен	
Да – брой (%)	37 (**72,55%**)	14 (27,45%)	51 (100,0%)
Не – брой (%)	46 (**49,46%**)	47 (50,54%)	93 (100,0%)
Общо	83 (57,64%)	61 (42,36%)	144 (100,0%)

Давността на захарния диабет също се установи, че има значение за развитието на онихомикоза. Пациентите със ЗД бяха разделени в следните групи, разграничаващи давността на ЗД – между 1 и 5 години, 6-10 години, 11-15 години и над 15 години. Пациентите със ЗД и положителни за ОМ с

давност на диабет между 1 и 5 години бяха 62,5%, между 6 и 10 години – 85%, от 11 до 15 години – 60%, над 15 години – 70% ($\chi^2 = 9{,}471$, $p<0{,}05$) (Таблица 25).

Таблица 25 – Резултати за положителни и отрицателни изследвания за ОМ спрямо давност на диабета.

Давност на ЗД	Резултат по зададен стандарт		Общо
	Положителен	Отрицателен	
1-5 години	10 (62,5%)	6 (37,5%)	16 (100,0%)
6-10 години	17 (85%)	3 (15%)	20 (100,0%)
11-15 години	3 (60%)	2 (40%)	5 (100,0%)
Над 15 години	7 (70%)	3 (30%)	10 (100,0%)
Няма диабет	46 (49,5%)	47 (50,5%)	93 (100,0%)
Общо	83 (57,6%)	61 (42,4%)	144 (100,0%)

V. Заключение

В настоящия дисертационен труд се извърши проучване, сравняващо real-time PCR методиката с конвенционалните методи – директно микроскопско, културелно и хистологично изследвания на материали от косми, кожа и нокти, с цел доказване на ползата и значението на полимеразната верижна реакция в реално време за диагностика на дерматофитни инфекции.

Получените стойности за чувствителност, специфичност и ефикасност на директното микроскопско, културелното, хистологичното и real-time PCR изследвания са както следва: 63,71%, 88,89% и 72,96% ($p<0,001$); 58,06%, 100% и 73,47% ($p<0,001$); 85,96%, 100% и 90,70% ($p<0,001$); 88,52%, 100% и 92,63% ($p<0,001$). С това H_0 се отхвърля, с което основната цел на дисертационния труд е постигната.

Също така се установиха статистически значими зависимости, потвърждаващи преобладаващото микотично засягане при мъжете и при пациенти на възраст между 40 и 79 години. Установи се и по-често наличие на онихомикоза при пациенти със захарен диабет.

В заключение, real-time PCR е една техника с изключителен потенциал в диагностиката на много инфекции и състояния. Широкото ѝ използване в най-различни области на медицината е безспорно, като най-близкият до нас пример е Covid-19 пандемията. За много други области обаче, каквато е например дерматология и в частност микологията, техниката все още не се е утвърдила като златен стандарт, въпреки че е демонстрирала многократно нейните предимства. С провеждането на проучвания като настоящото имаме възможност да променим и осъвременим „лицето“ на дерматология, като въведем нови алгоритми в диагностиката на повърхностните гъбични инфекции.

Изводи

1. Правилното взимане на материал от засегнатата област и дали той се разпределя за повече от едно изследване са от изключително значение за точността на резултатите.

2. *Trichophyton rubrum* и *Trichophyton interdigitale* са най-често срещаните дерматофити при онихомикози.

3. Мъжете са засегнати по-често от гъбични инфекции, предизвикани от дерматофити (по нокти, кожа и косми), отколкото жените.

4. Чувствителността, специфичността и ефикасността на real-time PCR е по-висока от тази на директното микроскопско, културелното и хистологичното изследвания.

5. Real-time PCR спестява 3-4 седмици изчакване, което е необходимо за културелното изследване и резултатите се получават в рамките на един работен ден.

6. С real-time PCR е възможно диагностицирането на дерматофити, дори когато на културелното изследване има растеж на недерматофитни плесени, които потискат растежа на дерматофитите и пречат културата да бъде отчетена правилно.

7. Комбинацията от real-time PCR и хистологично изследване имат най-висока чувствителност, специфичност и ефикасност за откриване на онихомикози.

8. Пациентите със захарен диабет имат по-голяма вероятност да развият онихомикоза, в сравнение с пациентите без захарен диабет.

9. Няма статистически значима разлика в етиологичните причинители на онихомикозата при пациенти с и без захарен диабет.

Приноси на автора

Приноси с оригинален характер

1. За първи път в научната литература се изпълнява real-time PCR с DermaGenius Complete multiplex real-time PCR kit с материли от косми, кожа и нокти, и се сравнява с директното микроскопско, културелното и хистологичното изследвания за диагностициране на гъбични инфекции, предизвикани от дерматофити.

2. За първи път в научната литература се сравняват честотата и етиологичните причинители на пациенти с онихомикоза с и без захарен диабет с real-time PCR, директно миркоскопско, културелно и хистологично изследвания, едновременно.

Приноси с оригинален характер за България

1. За първи път се използва DermaGenius Complete real-time PCR кит в научно проучване в нашата страна.

2. За първи път у нас се прави сравнително проучване на чувствителността, специфичността и ефикасността на real-time PCR, сравнен с директно микроскопско и културелно изследвания при пациенти със съмнения за микози на скалп и брада, както и при пациенти със съмнения за микози на кожата.

3. За първи път у нас се прави сравнително проучване на чувствителността, специфичността и ефикасността на real-time PCR, сравнен с директно микроскопско, културелно и хистологично изследвания при пациенти със съмнения за онихомикози.

4. За първи път се изследва честотата и етиологичните причинители при пациенти с онихомикоза с и без захарен диабет с real-time PCR в нашата страна.

5. За първи път у нас се прави хистологично изследване на нокти за онихомикоза, включено в обемно проучване.

Научни и научно-приложни приноси

1. За първи път се използва DermaGenius Complete multiplex real-time PCR като основен метод за диагностиката на дерматофитни инфекции на косми, кожа и нокти в нашата страна.

2. За първи път се предлага въвеждане в клиничната практика на алгоритъм за диагностика на повърхностни гъбични инфекции, включващ и real-time PCR в нашата страна.

Публикации, свързани с дисертационния труд

Списък на публикациите:

1. Класически и по-съвременни методи срещу PCR методиката в диагностиката на дерматофитните инфекции, Лилия Г. Зисова, **Гергана З. Въжева**, сп. Дерматология и венерология, бр. 3, 2019; 8-14;

2. **Vazheva G**, Zisova L (2021) Tinea barbae profunda caused by *Trichophyton rubrum* - an autoinoculation from a primary Tinea pedis. Folia Medica 63(2): 292-296.

3. **Vazheva GZ**, Zisova LG, Becheva EA, Chonov VR, Dichev VD, Miteva-Katrandzhieva TM, Rachkovska ZV, Orbetzova MM, Belovezhdov VT (2022) In search of dermatophytes – frequency and etiology of fungal infections in patients with and without diabetes mellitus. Folia Medica 64(6): 922-931.

Участия на конгреси:

1. Real-time PCR methodology in the present-day diagnostics of dermatophyte infections, Zisova L., **Vazheva G**. – E-poster – 29th EADV Virtual Congress, 29th-31st October, 2020;

2. Tinea barbae, caused by *Trichophyton rubrum* – autounoculation from a primary tinea pedis, **Vazheva G**., Zisova L. – E-poster – 29th EADV Virtual Congress, 29th-31st October, 2020;

3. Frequency and etiology of fungal infections in patients with and without diabetes mellitus - a modern view of mycological investigations, **Vazheva G**., Zisova L. – E-poster – 17th EADV Symposium, 12-14 May, 2022;

4. Application of real-time PCR in the diagnosis of dermatophyte infections of the hair, skin, and nails, **Vazheva, G.,** Zisova, L. – E-poster – EADV Symposium Seville, 18-20 May, 2023.

Summary

The diagnosis of superficial fungal infections is the subject of intensive research in many countries around the world. The diagnostic methods used are diverse, including both conventional and innovative techniques.

This dissertation presents a study comparing real-time PCR methodology with conventional methods - direct microscopic, cultural, and histological examinations of materials from hair, skin, and nails - in order to demonstrate the benefits and significance of real-time polymerase chain reaction (PCR) for the diagnosis of dermatophytic infections.

The values obtained for the sensitivity, specificity, and efficiency of direct microscopic, cultural, histological, and real-time PCR studies are as follows: 63.71%, 88.89%, and 72.96% ($p < 0.001$); 58.06%, 100%, and 73.47% ($p < 0.001$); 85.96%, 100%, and 90.70% ($p < 0.001$); 88.52%, 100%, and 92.63% ($p < 0.001$). Therefore, H0 is rejected, and the main objective of the dissertation is achieved.

Significant statistical dependencies were also established, confirming the predominant fungal involvement in men and in patients between 40 and 79 years of age. A more frequent occurrence of onychomycosis was also observed in patients with diabetes.

The use of real-time PCR in the diagnosis of dermatophytic infections is a relatively new approach in mycology and is subject to testing and experience from its use. In more and more studies, results are presented comparing conventional methods with real-time PCR or, respectively, conventional PCR with real-time PCR. The results are promising, but the method has not yet established itself as a new gold standard in the diagnosis of superficial fungal infections caused by dermatophytes.

Благодарности

Благодаря на моя научен ръководител – доц. д-р Лилия Зисова, дм за ценните съвети, градивните препоръки и подкрепата по време на съвместната ни работа по осъществяването на този труд.

Благодаря на ст. лаб. Антонина Иванова за безвъзмездната помощ и подкрепа при съвместната ни работа с пациентите.

Благодаря на фирма RIDACOM ЕООД за тяхното съдействие при работата с DermaGenius® Complete multiplex real-time PCR и предоставената възможност за изпълнение на real-time PCR в Център по приложни науки и иновации (CASI), гр. София.

Благодаря на проф. д-р Христо Добрев, дмн, ръководител на Катедрата по дерматология и венерология и началник на Клиника по кожни и венерически болести, за предоставената възможност за реализация на проучванията, както и на целия екип на Клиника по кожни и венерически болести (лекари, сестри и санитари) за помощта и съдействието в работния процес.

Благодаря на доц. д-р Цонка Митева-Катранджиева, дм за съдействието и ценните съвети при изготвянето на статистическите анализи.

Благодаря на проф. д-р Мария Орбецова, дм, ръководител на Катедра по ендокринология и болести на обмяната и д-р Елена Бечева от Катедра по ендокринология и болести на обмяната за съдействието по време на съвместната ни работа по проект ДПДП07/20 г., финансиран от МУ-Пловдив.

Благодаря на проф. д-р Веселин Беловеждов, дм, ръководител на Катедра по обща и клинична патология и д-р Веселин Чонов от Катедра по обща и клинична патология за съдействието по време на съвместната ни работа по проект ДПДП07/20 г., финансиран от МУ-Пловдив.

Благодаря на проф. д-р Мариана Мурджева, дм, мзм, ректор на МУ-Пловдив и ръководител на Катедрата по микробиология и на д-р Зоя Рачковска за съдействието по време на съвместната ни работа при изработването на real-time PCR.

Благодаря на проф. д-р Виктория Сарафян, дмн, ръководител на Катедрата по медицинска биология и Валентин Дичев, дб за съдействието по време на съвместната ни работа при изработването на real-time PCR.

Благодаря на семейството ми за незаменимата подкрепа!