

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ  
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ  
«ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗ ΥΓΙΕΙΝΗ»**

**“ΜΕΛΕΤΗ ΜΕΘΟΔΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ ΤΟΥ ΓΕΝΕΤΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ  
ΣΤΙΣ ΟΝΥΧΟΜΥΚΗΤΙΑΣΕΙΣ»**

**ΤΗΣ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΦΟΙΤΗΤΡΙΑΣ**

**ΑΝΑΣΤΑΣΙΑΣ, ΕΥΑΓΓΕΛΟΥ ΧΑΤΖΗΜΙΧΑΛΟΓΛΟΥ**

**ΤΕΧΝΟΛΟΓΟΥ ΙΑΤΡΙΚΩΝ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΩΝ  
Αλεξάνδρειο Τεχνολογικό Ίδρυμα Θεσσαλονίκης**

**ΛΑΡΙΣΑ 2015**



### **Η τριμελής επιτροπή**

Τ-Α. Βυζαντιάδης (Επίκουρος Καθηγητής ΑΠΘ, επιβλέπων)

Ε. Πετεινάκη (Αναπληρώτρια Καθηγήτρια ΠΘ)

Σ. Πουρνάρας (Αναπληρωτής Καθηγητής ΕΚΠΑ)

Στην έμπνευση, στην κινητήριο δύναμη, στην ανεξάντλητη ενέργεια, στο καθημερινό χαμόγελο, στην αισιοδοξία, στην ελπίδα που ανασαίνει μαζί της,

στην κόρη μου Φροσύνη,

στην πηγή ΟΛΩΝ...

## Ευχαριστίες

Η ερευνητική αυτή εργασία αποτέλεσε για μένα μια «περιπέτεια». Μια περιπέτεια γνώσης. Με όλα εκείνα τα στοιχεία μιας επίπονης, απαιτητικής, κοπιαστικής αλλά και γοητευτικής συνάμα, διαδικασίας που σε μετατρέπει από απλό παρατηρητή σε ενεργό συμμετόχο μιας αναζήτησης που στόχο έχει την ανακάλυψη και τελικά, τη γνώση. Ήταν ένα ταξίδι δύσκολο αλλά θαυμαστό, αξιοπρόσεχτο από πολλές απόψεις, γεμάτο εμπειρίες, γεμάτο «δώρα».

Κοντά μου από την πρώτη στιγμή, σύμβουλος, υποστηρικτής και υπομονετικός συμπαράστατης ο επιβλέπων μου Τιμολέων-Αχιλλέας Βυζαντιάδης, Επίκουρος Καθηγητής Μικροβιολογίας ΑΠΘ. Η άρτια επιστημονική του κατάρτιση στο συγκεκριμένο γνωστικό αντικείμενο και η ερευνητική του εμπειρία, αποτέλεσαν για μένα οδηγό και πρότυπο σε όλα τα στάδια της διπλωματικής μου εργασίας. Χωρίς τη συνεχή του ενθάρρυνση και προτροπή, όλα θα ήταν αλλιώς... Τον ευχαριστώ.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τα μέλη της τριμελούς επιτροπής την Αναπληρώτρια καθηγήτρια Μικροβιολογίας ΠΘ, Ευθυμία Πετεινάκη και τον Αναπληρωτή Καθηγητή Μικροβιολογίας ΕΚΠΑ, Σπυρίδωνα Πουρνάρα για την ανάθεση του θέματος και τη συμμετοχή τους στη διπλωματική εργασία.

«Ό,τι δε συνέβη ποτέ, είναι ό,τι δεν ποθήσαμε αρκετά» λέει ο Νίκος Καζαντζάκης και μάλλον έχει δίκιο. Μόνο που μπορεί να συμβαίνουν και πράγματα που τα προσπαθούμε επειδή έχουμε την τύχη να είναι δίπλα μας ξεχωριστοί άνθρωποι. Είχα την τύχη να έχω κοντά μου την Ευαγγελία Σπάνδου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Φυσιολογίας ΑΠΘ. Αν περιορίζομουν στην επιστημονικότητα, την υποστήριξη, την έμπρακτη βοήθεια, θα αδικούσα το μέγεθος της ιδιαίτερης συνδρομής της. Επιλέγω να την ευχαριστήσω για όλο το κοινό ταξίδι στη γνώση..

Ευχαριστώ ακόμη τη Δερματολόγο Μαργαρίτα Νασρ καθώς και τη Βιοπαθολόγο Αλίκη Ιωακειμίδου για την πολύτιμη συνεργασία τους και την άψογη επικοινωνία μας. Η συμπαράσταση και βοήθειά τους συνετέλεσαν καθοριστικά στην ποιότητα του παραγόμενου έργου.

Στο αίσιο τέλος της «περιπέτειάς» μου συνέβαλε τα μέγιστα, το προσωπικό του Μικροβιολογικού εργαστηρίου του ΑΠΘ και τους ευχαριστώ από καρδιάς καθώς και τον Καθηγητή κ. Νικόλαο Μαλισιόβα, Διευθυντή του Α' Εργαστηρίου Μικροβιολογίας της Ιατρικής σχολής του ΑΠΘ.

Και βέβαια, ευχαριστώ την οικογένεια και τους φίλους μου για την κατανόηση, την ηθική συμπαράσταση και την αγάπη τους.

Ξεχωριστή αναφορά θα κάνω στους «δικούς μας ανθρώπους» Σ' εκείνους που είναι για εμάς μοναδικοί. Ευχαριστώ τον δικό μου άνθρωπο, τη θεία μου, Ευφροσύνη Χατζημιχάλογλου. Δεν υπάρχουν γιατί, υπάρχει μόνο ένα φωτεινό χαμόγελο απ' όταν ήμουν κοριτσάκι μέχρι...για πάντα, μόνο για εκείνη...



## Περίληψη

Η παρούσα διπλωματική, με θέμα σύγκριση τριών πρωτοκόλλων εκχύλισης του DNA στις ονυχομυκητιάσεις, έχει ως σκοπό την προσέγγιση της διάγνωσης των ονυχομυκητιάσεων και της ταυτοποίησης αυτών μέσω μοριακών τεχνικών. Το ενδιαφέρον για την εν λόγω έρευνα προκύπτει από το γεγονός ότι οι κλασικές μεθοδολογίες στις ονυχομυκητιάσεις είναι πολύ απαιτητικές και χρονοβόρες. Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την ολοκλήρωση της έρευνας ήταν δείγματα ονύχων 45 ατόμων, χαρακτηρισμένα ως θετικά (31) ή αρνητικά (14), σύμφωνα με το αποτέλεσμα της καλλιέργειας. Η εκχύλιση του DNA πραγματοποιήθηκε σε ζυγισμένα, παρόμοιου μεγέθους (περίπου 4mm) και περαιτέρω τεμαχισμένα μικρότερα κομμάτια των ονύχων με τη χρήση τριών διαφορετικών πρωτοκόλλων. Στο πρώτο πρωτόκολλο 1 (Prot1), η εκχύλιση έγινε σύμφωνα με τη μεθοδολογία των Tahir και Watson (1995), με ένα επιπλέον στάδιο καθαρισμού με το kit NucleoSpin® Blood Quick Pure, της εταιρείας Macherey-Nagel. Στο δεύτερο πρωτόκολλο 2 (Prot2), εφαρμόστηκε η μεθοδολογία του Statens Serum Institute, Κοπεγχάγη, Δανία. Τέλος στο πρωτόκολλο 3 (Prot3) η εκχύλιση έγινε με τη χρήση του DNA IQ™ System, DC6701 (Promega) για υγρά δείγματα, μετά από κατάλληλη τροποποίηση. Οι παράμετροι που αξιολογήθηκαν ήταν πέντε (5) και συγκεκριμένα η καθαρότητα του DNA (OD260/OD280), η συγκέντρωση του DNA (μg/mL), ο λόγος της ολικής ανάκτησης του DNA/g ιστού, το κόστος της μεθόδου και η διάρκεια του πρωτοκόλλου. Οι τιμές εκφράστηκαν ως mean±SD και αναλύθηκαν με τις δοκιμασίες Kruskal-Wallis and Mann-Whitney. Στην προσπάθεια να αξιολογηθεί συνολικά η απόδοση των τριών πρωτοκόλλων, υπολογίσθηκε για την κάθε παράμετρο (συγκέντρωση, ανάκτηση/g ιστού και καθαρότητα) η διάμεση τιμή, χωριστά για το κάθε πρωτόκολλο, στο σύνολο των δειγμάτων. Η τιμή εκφράστηκε σε πολλαπλάσια της μέσης τιμής των διαμέσων (mean of medians) για την κάθε παράμετρο. Οι τρεις τιμές (μία για κάθε παράμετρο) αθροίσθηκαν για το κάθε πρωτόκολλο και βρέθηκε ότι: το πρωτόκολλο Prot1=1,94, το Prot2=5,34 και το Prot3=1,89, Prot2> Prot1> Prot3. Βάσει των συμπερασμάτων που κατέληξε η παρούσα έρευνα το πρωτόκολλο 2 (Prot2) παρουσίασε υψηλή συγκέντρωση και ανάκτηση DNA/g ιστού, ενώ η διάρκεια και το κόστος ήταν επίσης πολύ ευνοϊκά. Ωστόσο η καθαρότητα του DNA ήταν χαμηλή. Αν απαιτείται υψηλής καθαρότητας DNA, για ειδικές μοριακές εφαρμογές, το πρωτόκολλο 3 (Prot3) και πρωτόκολλο 1 (Prot1) (φθηνότερο από το Pr3) είναι πιθανώς καταλληλότερα.

**Λέξεις κλειδιά:** ονυχομυκητιάσεις, εκχύλιση, DNA, μέθοδοι.

## Abstract

The present thesis, with the subject of comparing three protocols of DNA extraction, aims to approach the diagnosis of onychomycoses and their identification by the use of molecular techniques. The interest for this research comes from the fact that the classical methodology used in onychomycoses is very demanding and time consuming. The materials used for the condition of the research were nail samples of 45 subjects characterized as positive (31) or negative (14), according to the result of the nail culture. DNA extraction was performed on weighed nail clippings of equal size (approximately 4 mm) and further chopped, using three different protocols. At the first protocol (Prot1), the extraction was performed according to the nail-specific protocol of Tahir and Watson, with an additional purification step by the Macherey – Nagel NucleoSpin Blood Quick Pure extraction kit. At the second (Prot2), the Denmark patent WO/2006/133701, proposed by the Statens Serum Institute of Copenhagen, was used for DNA extraction. Finally for the third protocol (Prot3) DNA extraction was performed using the DNA IQ System DC6701 (Promega) for liquid samples, after appropriate modification. The evaluation parameters were five (5): DNA purity (ratio of OD260/OD280), DNA concentration ( $\mu\text{g/ml}$ ), the ratio of total DNA yield/gr of tissue, method cost and protocol duration. Data was expressed as mean  $\pm$  SD and analyzed using Kruskal-Wallis and Mann-Whitney tests. In an effort to evaluate the total performance of the three methods, we calculated for each parameter (concentration, yield/gr of tissue, ratio) the median, separately for each protocol in the general population. The value was expressed in multiples of the mean of medians for each parameter. The three values (one for each parameter) were added for each protocol and found that: Prot1=1.94, Prot2 =5.34, Prot3=1.89, Prot2>Prot1>Prot3. Based on the conclusions of the present research, Prot2 protocol showed high concentration and DNA yield/gr of tissue, while the duration and the cost were also advantageous. However, DNA purity was low. If high DNA purity is required, for specific molecular techniques, Prot3 and Prot1 (cheaper compared to Prot3) would be more appropriate.

**Keywords:** onychomycoses, extraction, DNA, methods.



## Περιεχόμενα

Περίληψη .....	7
Κατάσταση Πινάκων .....	11
Κατάσταση Εικόνων και Σχημάτων.....	11
1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....	1
1.1 Γενικά περί ονχομυκητιάσεων-Επιδημιολογικά στοιχεία .....	1
1.2 Μορφολογία του όνυχα .....	3
1.3 Αιτιολογία της ονχομυκητίασης.....	4
1.4 Μετάδοση της ονχομυκητίασης .....	9
1.5 Κλινικές μορφές της ονχομυκητίασης .....	10
1.6. Εργαστηριακή διάγνωση ονχομυκητιάσεων .....	13
1.7.Διαφορική διάγνωση ονχομυκητιάσεων .....	17
1.8. Θεραπεία-Πρόληψη Ονχομυκητιάσεων .....	18
1.9. Σκοπός της διπλωματικής εργασίας .....	20
2.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	22
2.1. Συλλογή, επεξεργασία και διάγνωση δειγμάτων .....	22
2.2 Μέθοδοι εκχύλισης.....	25
2.3. Φωτομέτρηση του τελικού προϊόντος της εκχύλισης.....	31
2.4. Παράμετροι που εκτιμηθήκαν.....	32
2.5. Στατιστική μέθοδος ανάλυσης αποτελεσμάτων.....	33
2.6. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης Polymerase Chain Reaction -PCR) .....	33
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ .....	36
3.1. Δημογραφικά στοιχεία.....	36
3.2. Η καθαρότητα του DNA.....	37
3.3. Η συγκέντρωση του DNA.....	37
3.4. Η ανάκτηση σε γενετικό υλικό (DNA), στο συνολικό όγκο του δείγματος, ανά γραμμάριο ιστού (yield/gr ιστού).....	38
3.5. Χρόνος και κόστος εκτέλεσης κάθε πρωτοκόλλου .....	39
3.6. Υπολογισμός μέσης τιμής των διάμεσων τιμών για κάθε παράμετρο .....	39
3.7. Αποτελέσματα της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) .....	40
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	41
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....	50
Παράρτημα 1.....	58

Παράρτημα 2.....	62
------------------	----

## **Κατάσταση Πινάκων**

<b>Πίνακας 1.</b> Δημογραφικά στοιχεία θετικών δειγμάτων	<b>58</b>
<b>Πίνακας 2.</b> Δημογραφικά στοιχεία αρνητικών δειγμάτων	<b>60</b>
<b>Πίνακας 3.</b> Αποτελέσματα χρόνου και κόστους εκτέλεσης κάθε πρωτοκόλλου	<b>61</b>
<b>Πίνακας 4.</b> Υπολογισμός μέσης τιμής των διάμεσων τιμών κάθε παραμέτρου	<b>61</b>

## **Κατάσταση Εικόνων και Σχημάτων**

### **Σχήματα**

<b>Σχήμα 1.</b> Ο λόγος OD 260/280 στο σύνολο των δειγμάτων στα τρία εξεταζόμενα πρωτόκολλα. Μέση τιμή±SEM. Στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα, # Pr1 και Pr2, ## Pr3 και Pr1, * Pr3 και Pr2	<b>62</b>
--	-----------

<b>Σχήμα 2.</b> Η συγκέντρωση του DNA στο σύνολο των δειγμάτων, στα τρία εξεταζόμενα πρωτόκολλα. Μέση τιμή±SEM. Στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα: # Pr2 και Pr3, * Pr2 και Pr1, ## Pr1 και Pr3	<b>62</b>
--	-----------

<b>Σχήμα 3.</b> Η ανάκτηση του DNA ανά γραμμάριο ιστού, στο σύνολο των δειγμάτων, στα τρία εξεταζόμενα πρωτόκολλα. Μέση τιμή±SEM. Στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα: # Pr2 και Pr1, * Pr2 και Pr3.	<b>63</b>
---	-----------

### **Εικόνες**

<b>Εικόνα 1.</b> LL, 198 B (1, 2, 3), 159 (1, 2, 3), 160 A (1, 2, 3),	<b>63</b>
<b>Εικόνα 2.</b> LL, 220-1, 2, 3, 236-1, 2, 3,	<b>63</b>
<b>Εικόνα 3.</b> 185 (1, 2, 3), 231 (1, 2, 3), (-).	<b>64</b>

## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### 1.1 Γενικά περί ονυχομυκητιάσεων-Επιδημιολογικά στοιχεία

Με τον όρο ονυχομυκητίαση περιγράφουμε την προσβολή ενός ή περισσότερων ονύχων από οποιοδήποτε είδος μύκητα.

Οι ονυχομυκητιάσεις μπορούν δυνητικά να προκληθούν από όλα τα είδη των μυκήτων, όπως από τους νηματοειδείς μύκητες (moulds), καθώς και από τους ζυμομύκητες (yeasts). Το 90% οφείλονται σε δερματοφυτικούς νηματοειδείς μύκητες και το υπόλοιπο 10% σε ζυμομύκητες και διάφορους άλλους νηματοειδείς μύκητες (εκτός των δερματοφύτων), (English, 1976)

Αν και δεν είναι απειλητική για τη ζωή του ανθρώπου, η ονυχομυκητίαση, κυρίως αυτή που προκαλείται από δερματόφυτα, αποτελεί σημαντικό πρόβλημα υγείας λόγω του υψηλού επιπολασμού (περίπου 10 % του πληθυσμού των Η.Π.Α. εμφανίζει νοσηρότητα) και της δυσκολίας αντιμετώπισής της. (Elewski, 1998).

Οι ονυχομυκητιάσεις είναι συχνές και αποτελούν πάνω από το 50% όλων των ονυχίων (Campbell et al., 2004). Η ονυχομυκητίαση εμφανίζεται συχνότερα στους άνδρες σε σχέση με τις γυναίκες. Επίσης η προσβολή των ονύχων είναι συχνότερη στους ενήλικες σε σχέση με τα παιδιά, πιθανώς λόγω της ταχύτερης ανάπτυξης των ονύχων κατά την παιδική ηλικία και επομένως της μηχανικής απομάκρυνσης του παθογόνου μύκητα (Gupta et al., 2000).

Σύμφωνα με επιδημιολογικά δεδομένα, το 50% των ατόμων ηλικίας άνω των 70 ετών έχει εμφανίσει ονυχομυκητίαση, ενώ η μέγιστη συχνότητα της ονυχομυκητίας εμφανίζεται μεταξύ 40 και 60 ετών. Αντίθετα ηλικίες κάτω των 18 ετών εμφανίζουν ονυχομυκητίαση σε πολύ μικρό ποσοστό 2,6%. (Baran et al., 2006). Ωστόσο, θα πρέπει να σημειωθεί ότι η συχνότητα των ονυχομυκητιάσεων στον γενικό πληθυσμό δεν μπορεί να προσδιοριστεί με ακρίβεια. Τα αναφερόμενα ποσοστά στη διεθνή βιβλιογραφία είναι πολύ χαμηλά, λόγω του ότι ο αριθμός των ασθενών που προσφεύγουν στον ιατρό είναι περιορισμένος. Αυτό πιθανότατα να οφείλεται στο ότι τα συμπτώματα δεν είναι έντονα και οι ασθενείς θεωρούν ότι η θεραπεία είναι χρόνια και αναποτελεσματική (Friedlander et al., 2012).

Ορισμένες φορές η συχνότητα των ονυχομυκητιάσεων, στον γενικό πληθυσμό υπολογίζεται δια συσχετισμού με τη μυκητίαση των πελμάτων, με την οποία συχνά

συνυπάρχει. Σε επιδημιολογική μελέτη η οποία πραγματοποιήθηκε στις ΗΠΑ σε πληθυσμό 20.000 ατόμων, η συχνότητα της μυκητίασης των πελμάτων ανερχόταν σε ποσοστό 8,1 % και της προσβολής των ονύχων ανερχόταν στο 2,2 %. (Alteras and Cojacoaru, 1973).

Σε αντίστοιχες μελέτες στο Ηνωμένο Βασίλειο τα ποσοστά προσβολής των ονύχων ανέρχονται σε 2,8 % στους άνδρες και 2,6 % στις γυναίκες (Roberts, 1992). Επίσης ένα ποσοστό της τάξης του 30% των ασθενών με δερματική λοίμωξη εμφανίζουν ονυχομυκητίαση (English, 1976).

Στις ΗΠΑ τα τελευταία χρόνια έχει παρατηρηθεί ιδιαίτερη εξάπλωση των ονυχομυκητιάσεων, η οποία αποδίδεται στα δερματόφυτα και κυρίως στο *Trichophyton rubrum*, λόγω μετανάστευσης από τις περιοχές της Αφρικής, Νοτιοανατολικής Ασίας, καθώς και της Βόρειας Αμερικής. Έτσι συγκεκριμένα στη Βόρεια Αμερική η συχνότητα εμφάνισης της ονυχομυκητίασης έχει καταγραφεί μεταξύ 2-13 %, ενώ σε διάφορες χώρες της Ευρώπης ( Ηνωμένο Βασίλειο, Ισπανία και Φιλανδία) τα ποσοστά φαίνεται να είναι περίπου ( 2-8%). (Kemna and Elewski, 1996).

Επίσης η συχνότητα της νόσου, τα τελευταία χρόνια, παρουσιάζει ανοδική τάση ως αποτέλεσμα του αυξημένου αριθμού ασθενών με ανοσοκαταστολή, που προκύπτει από την ευρεία χρήση ανοσοκατασταλτικών και χημειοθεραπευτικών φαρμάκων καθώς και ευρέως φάσματος αντιβιοτικών. Επίσης η αύξηση του μέσου όρου επιβίωσης του πληθυσμού και η ενασχόληση όλο και περισσότερων ανθρώπων με τον αθλητισμό και κατά συνέπεια με τη χρήση κλειστών αθλητικών υποδημάτων καθώς και κοινόχρηστων κολυμβητηρίων και λουτήρων, αποτελούν ακόμη δύο αιτίες που συμβάλλουν στην αύξηση του ποσοστού εμφάνισης των ονυχομυκητιάσεων (Haneke 1991, Iorizzo et al., 1997).

Επιβαρυντικοί παράγοντες για την προσβολή των ονύχων από τους μύκητες θεωρούνται οι μυκητιάσεις του δέρματος, οι αρτηριακές αλλά και φλεβικές διαταραχές, οι επανειλημμένοι τραυματισμοί (όπως στους αθλητές), ο καλλωπισμός των ονύχων (τα τεχνητά νύχια, η παρατεταμένη βαφή των ονύχων), οι διαταραχές περιφερικών νεύρων, ο σακχαρώδης διαβήτης, η μεγάλη ηλικία, οι ανοσολογικές διαταραχές, η ψωρίαση, το μήκος του όνυχα ( μήκος του ελεύθερου άκρου πάνω από 3mm, ευνοεί τον αποικισμό από μύκητες και βακτηρίδια), το ιστορικό αγγειοιδήματος, ιστορικό κνίδωσης, άσθματος και κακοηθειών, καθώς και η παρατεταμένη διαβροχή από το νερό (καθαριστές, νοικοκυρές, κολυμβητές) (Gupta et al., 2000). Η βραδεία ανάπτυξη των ονύχων στα άτομα μεγάλης ηλικίας ευνοεί επίσης την εμφάνιση των ονυχομυκητιάσεων

στους ηλικιωμένους σε συνδυασμό με τραυματισμούς, κυκλοφορικές διαταραχές, περιφερικές νευροπάθειες και παραμορφώσεις των ποδιών (Siegfried and Korting 1990, Summerbell, 1997).

## 1.2 Μορφολογία του όνυχα

Οι όνυχες αποτελούν πλάκες σκληρής κερατίνης στη ραχιαία επιφάνεια των τελικών φαλάγγων των δακτύλων των άκρων χεριών και ποδιών. Η **ονυχαία πλάκα** καλύπτει την **κοίτη του όνυχα**, δηλαδή την επιφάνεια του δέρματος, που αποτελείται μόνο από τη βασική και ακανθωτή στιβάδα. Η κοίτη του όνυχα σχηματίζει τη βάση ή την κοιλιακή επιφάνεια της ονυχαίας πλάκας. Το σώμα της ονυχαίας πλάκας περιβάλλεται από τις **πλάγιες ονυχαίες πτυχές** με μια δομή παρόμοια με εκείνη της παρακείμενης επιδερμίδας του δέρματος (Ρηγόπουλος, 2006).

Η ονυχαία πλάκα καθηλώνεται στην **ονυχοφόρο αύλακα**, που αποτελεί εγκόλπωση του δέρματος, περιβαλλόμενη από μία ημισεληνοειδή πτυχή του δέρματος το **παρωνύχιο**. Το **επωνύχιο** ή **περινύχιο** αποτελεί την προβάλλουσα ημισεληνοειδή πτυχή της κεράτινης στιβάδας. Το **υπονύχιο** αποτελεί την πάχυνση της επιδερμίδας κάτω από το ελεύθερο άκρο της ονυχικής πλάκας. Η λειτουργία του έγκειται στο να καθιστά την κοίτη του όνυχα αδιαπέραστη, έχοντας προστατευτικό ρόλο (Williams et al, 2008).

Το εγγύς άκρο της ονυχαίας πλάκας αποτελεί τη **ρίζα** του όνυχα όπου βρίσκεται ο λευκωπός-ημισεληνοειδής **μηνίσκος**, περιοχή της **μήτρας** του όνυχα, δηλαδή της περιοχής της επιδερμίδας που ευθύνεται για το επιθήλιο της ονυχαίας πλάκας. Το κεντρικό άκρο της μήτρας εκτείνεται βαθειά μέσα στη ρίζα του όνυχα.

Τα κύτταρα της μήτρας διαιρούνται, κινούνται προς την περιφέρεια και εντέλει κερατινοποιούνται σχηματίζοντας την κεντρική μοίρα της ονυχαίας πλάκας. Η σχεδόν διαφανής ονυχαία πλάκα και το λεπτό επιθήλιο της κοίτης του όνυχα αποτελούν ένα χρήσιμο παράθυρο για την εκτίμηση της οξυγόνωσης του αίματος (Luiz Carlos Junqueira and Jose Carneiro, 2004).

Η ονυχαία πλάκα αποτελείται από αλληλοσυνδεόμενα κερατινοκύτταρα που στερούνται πυρήνων και οργανιδίων. Τα άλατα του ασβεστίου είναι σημαντικά συστατικά της ονυχαίας πλάκας καθώς και οι ινιδώδεις και σφαιρικές πρωτεΐνες που

περιέχουν θείο. Η σκληρότητα των ονύχων οφείλεται στις πρωτεΐνες της θεμέλιας ουσίας με υψηλή περιεκτικότητα σε θείο (Cano et al, 2004).

Η φυσιολογική αύξηση των ονύχων των δακτύλων των άκρων χεριών είναι περίπου 0,1mm την ημέρα, δηλαδή περίπου 3mm το μήνα. Αντίθετα στους όνυχες των δακτύλων των άκρων ποδιών η ταχύτητα ανάπτυξης περιορίζεται κατά 60%. Έτσι η πλήρης ανανέωση των ονύχων των χεριών απαιτεί 4-6 μήνες, ενώ των ποδιών 12-18 μήνες. Η ταχύτητα ανάπτυξης των ονύχων επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες, όπως την ηλικία, την εποχή, την εγκυμοσύνη, το θηλασμό, το κάπνισμα ή τη λειτουργία του θυρεοειδούς αδένος (Kierszenbaum and Tresg, 2012).

### **1.3 Αιτιολογία της ονυχομυκητιάσης**

Το 90% των ονυχομυκητιάσεων οφείλονται σε δερματοφυτικούς νηματοειδείς μύκητες και το υπόλοιπο 10% σε ζυμομύκητες και διάφορους άλλους νηματοειδείς μύκητες (εκτός των δερματοφυτικών).

#### **1.3.1 Δερματοφυτικοί νηματοειδείς μύκητες**

Οι δερματοφυτικοί νηματοειδείς μύκητες ή δερματόφυτα είναι ατελείς μύκητες, των οποίων το κύριο ενδιαίτημα είναι το έδαφος, το φυτικό υλικό το οποίο βρίσκεται σε αποσύνθεση καθώς και η επιφάνεια του σώματος των ζώων. Οι δερματοφυτικοί μύκητες, όπως και οι υπόλοιποι μύκητες, αποτελούν ετερότροφους οργανισμούς καθώς δεν μπορούν να επιβιώσουν χωρίς οργανικό υλικό για τροφή και προσλαμβάνουν την τροφή τους μέσω του τοιχώματος και της κυτταροπλασματικής τους μεμβράνης (Madigan et al., 2012).

Οι δερματοφυτικοί μύκητες είναι κερατινόφιλοι, πρωτοπαθώς παθογόνοι μύκητες, οι οποίοι μολύνουν υγιείς οργανισμούς χωρίς να απαιτείται η ύπαρξη κάποιας ανοσολογικής διαταραχής ή να είναι απαραίτητη κάποια πύλη εισόδου στο δέρμα όπως ένα τραύμα (Robert and Pihet, 2008).

Είναι εκλεκτικοί και τρέφονται με κερατίνη, η οποία περιλαμβάνει πρωτεΐνες με υψηλή περιεκτικότητα σε θείο. Οι δερματοφυτικοί μύκητες προσβάλλουν τις δομές του δέρματος, οι οποίες περιέχουν κερατίνη σε μεγάλη ποσότητα, όπως είναι η επιδερμίδα, οι όνυχες και οι τρίχες. Η σχέση τους με την κερατίνη στιβάδα, τους καθιστά

υπεύθυνους για τις επιφανειακές μυκητιάσεις που προκαλούν. Η επιφανειακή τους εντόπιση οφείλεται πιθανώς και στο γεγονός ότι οι δερματοφυτικοί μύκητες «επιλέγουν» ασφαλείς περιοχές για την ανάπτυξη τους, προκειμένου να ξεφύγουν από τους μηχανισμούς άμυνας, παρά γιατί δεν μπορούν να εισβάλουν σε εν τω βάθει ιστούς.(Kanbe, 2008).

Πολλά είδη δερματοφύτων είναι συγγενικά μεταξύ τους ως βιολογικοί οργανισμοί. Έχουν ταυτοποιηθεί 42 διαφορετικά είδη δερματοφύτων, από τα οποία τα 29 είναι παθογόνα για τον άνθρωπο (Weitzman, 1995).

Σύμφωνα με την οικολογία τους και την προτίμηση ξενιστή, τα δερματόφυτα διακρίνονται σε τρεις κατηγορίες :

**α) τα ανθρωπόφιλα**, τα οποία αποτελούν τους σημαντικότερους δερματοφυτικούς μύκητες, μεταδίδονται από άνθρωπο σε άνθρωπο. Η μετάδοσή τους με άμεση επαφή είναι σπάνια, ενώ συχνότερα μεταδίδονται με θραύσματα μύκητα ή λέπια δέρματος, τα οποία φέρουν μολυσματικά σωματίδια μύκητα. Επίσης τα θραύσματα μύκητα καθώς και τα λέπια δέρματος αποπίπτουν από νοσούντες και προσκολλώνται σε αντικείμενα (πατώματα, λουτρά, χτένες, έπιπλα), από τα οποία κάποιος που έρχεται σε επαφή μπορεί να μολυνθεί. Τα πιο συνήθη ανθρωπόφιλα δερματόφυτα είναι το *Trichophyton tonsurans* και *Microsporum audouinii*, τα οποία μπορούν να προκαλέσουν πληθώρα περιστατικών σε σχολεία, φυλακές, οίκους ευγηρίας και άλλους δημόσιους χώρους.

**β) τα ζωόφιλα**, τα οποία μολύνουν κυρίως ζώα, όπως γάτες, σκύλους, πτηνά κ.α. και μολύνουν στη συνέχεια τον άνθρωπο, ο οποίος έρχεται σε στενή επαφή με τα ζώα αυτά. Ωστόσο τα δερματόφυτα αυτά δε μεταδίδονται από άνθρωπο σε άνθρωπο. Τα πιο γνωστό ζωόφιλο δερματόφυτο είναι το *Microsporum canis*, το οποίο μεταδίδεται από κυνοειδή στους ανθρώπους με άμεση επαφή ή μετά από βραχύχρονη παραμονή στο περιβάλλον, π.χ σε οικιακή μοκέτα ή θαλάσσια άμμο.

**γ) τα γεόφιλα**, τα οποία αποτελούν τη σπανιότερη αιτία δερματοφυτικών μολύνσεων για τον άνθρωπο, καθώς επιβιώνουν στο έδαφος και είναι δυνατόν να μολύνουν μόνο κάποιον ο οποίος έρχεται σε επαφή με αυτό, όπως το *Microsporum gypsum* (Cafardi, 2012).

Τα δερματόφυτα διακρίνονται σε τρία γένη: *Trichophyton*, *Microsporum* και *Epidermophyton*. Το 98% περίπου των δερματοφυτικών ονυχιών οφείλονται στο *T. mentagrophytes* (var *interdigitale*) και στο *T. rubrum*. Το πρώτο περιορίζεται στους όνυχες των ποδιών και τα πέλματα και σπανιότερα στους όνυχες των χεριών. Αυτό είναι



δυνατόν να οφείλεται στο ότι οι συνθήκες ανάπτυξης του μύκητα στους όνυχες των χεριών είναι δυσμενέστερες και στο ότι σπάνια προσβάλλει την παλαμιαία και ραχιαία επιφάνεια των χεριών και επομένως δεν αποτελεί δεξαμενή μόλυνσης.

Αντίθετα το *Trichophyton rubrum* επεκτείνεται βαθμιαία σε άλλα σημεία του σώματος όπως πέλματα, πελματιαία επιφάνεια δακτύλων, ραχιαία επιφάνεια ποδιού, μηρογεννητικές πτυχές καθώς και στους όνυχες των χεριών και στις παλάμες. Το είδος αυτό έχει μεγαλύτερη προσαρμοστικότητα και λοιμογόνο δύναμη έναντι άλλων ειδών. Άλλα δερματόφυτα που προσβάλλουν συχνά τους όνυχες, είναι το *E. floccosum* και το *T. tonsurans* (Foster et al., 2002, Devliotou- Panagiotidou et al., 1992)

Τα δερματόφυτα είναι η συχνότερη αιτία ονυχομυκητιάσεων των ποδιών με κύριο υπεύθυνο το *T. rubrum*, ενώ οι ονυχομυκητιάσεις των χεριών οφείλονται στη πλειοψηφία τους σε ζυμομύκητες, κυρίως του γένους *Candida* (Gupta et al., 2000).

Η προσβολή των ονύχων των ποδιών από δερματόφυτα έπονται συνήθως της προσβολής των εγγύς μεσοδακτύλιων πτυχών ή και των πελμάτων από δερματόφυτα, ενώ οι προσβολές των άκρων χεριών έπονται των προσβολών των παλαμών και των μηρογεννητικών πτυχών. Ειδικότερα, οι προσβολές των ονύχων των κάτω άκρων από δερματόφυτα ανέρχονται σε ποσοστό 80 %, ενώ οι προσβολές των ονύχων των άνω άκρων από δερματόφυτα ανέρχονται στο 20% (Andre and Achetn, 1987 )

Τα περισσότερα είδη των δερματοφύτων διεισδύουν στον όνυχα μέσω του υπωνυχίου ή της ονυχικής πτυχής και σπάνια μέσω του επωνυχίου. Η περαιτέρω ανάπτυξη των δερματοφύτων αντανakλά την ανατομική δομή του όνυχα. Στις περιπτώσεις που ο μύκητας διεισδύει μέσω του υπωνυχίου ή των πλάγιων πτυχών προσβάλλει πρώτα την κοίτη του όνυχα. Η τελευταία καλύπτεται από πολλαπλές στιβάδες κυλινδρικού επιθηλίου, το οποίο βρίσκεται σε άμεση επαφή με την ημιδιαφανή ονυχική πλάκα στην οποία και προσδίδει ρόδινη χροιά, λόγω των υποκείμενων αγγείων. Η επιφάνειά της φέρει επιμήκεις ραβδώσεις και αύλακες που αντικατοπτρίζουν αντίστοιχες διαμορφώσεις στην κάτω επιφάνεια της ονυχικής πλάκας και οι οποίες ενισχύουν την πρόσφυση του όνυχα στην κοίτη. Η επιδερμική στιβάδα της κοίτης αποτελεί ιδανικό υπόστρωμα για την ανάπτυξη του μύκητα γιατί είναι πλούσια σε θρεπτικές ουσίες και υγρασία και πιθανότατα δρα ως δεξαμενή για επαναμολύνσεις του αναπτυσσόμενου όνυχα.

Οι υφές αποτελούν λεπτότατα διακλαδιζόμενα νημάτια και το σύνολο τους ονομάζεται μυκήλιο. Ο πολλαπλασιασμός των υφών στα επιθηλιακά κύτταρα της κοίτης του όνυχα, οδηγεί σε φλεγμονώδη αντίδραση της τελευταίας και προοδευτικά στη

δημιουργία της κοκκώδους στιβάδας καθώς και κερατινοκυττάρων, με αποτέλεσμα την υπωνύχια υπερκεράτωση. Η τελευταία υποβοηθά τον σχηματισμό μυκηλίων με επακόλουθο την περαιτέρω αύξηση της κεράτινης στιβάδας (Ogawa et al., 1998)

Κατά το αρχικό στάδιο της διείσδυσης και της ανάπτυξης του μύκητα στην κοίτη, η ονυχαία πλάκα παραμένει ανέπαφη, προοδευτικά όμως παρατηρείται υπέργερση της, λόγω της υπωνύχιας υπερκεράτωσης, η οποία συνοδεύεται από μεταβολή του χρώματος του προσβεβλημένου μέρους της ονυχαίας πλάκας σε υπόλευκο (Aljabre et al., 1993).

Η υπερπλασία των κερατινοκυττάρων μαζί με τις πολλαπλασιαζόμενες υφές, οι οποίες παραμένουν αραιά διατεταγμένες, οδηγεί προοδευτικά σε μυκητιακή ονυχόλυση, λόγω της μη σταθερής σύνδεσης μεταξύ της ονυχικής πλάκας και της κοίτης του όνυχα. Παράλληλα η λοίμωξη επεκτείνεται και στην ονυχαία πλάκα. Η διείσδυση και ο πολλαπλασιασμός των δερματοφύτων στην ονυχαία πλάκα αντικατοπτρίζει την κυτταρική δομή της. Οι υφές διεισδύουν με μεγαλύτερη ευκολία μεταξύ των κυττάρων της κοιλιακής επιφάνειας της ονυχαίας πλάκας και διατάσσονται παράλληλα. Το μεγαλύτερο μέρος των υφών κατευθύνονται προς τα πλάγια τμήματα ακολουθώντας την εγκάρσια κυτταρική δομή της πλάκας, ενώ οι υπόλοιπες προς τη μήτρα του όνυχα. Η τελευταία δε προσβάλλεται με αποτέλεσμα να διατηρείται η φυσιολογική παραγωγή της ονυχαίας πλάκας (Ogawa et al., 1998 ).

Στη σπανιότερη περίπτωση διείσδυσης του μύκητα από το επωνύχιο, η μόλυνση ξεκινά από τον μηνίσκο και επεκτείνεται στην κατώτερη επιφάνεια του επωνύχιου. Όταν η επέκταση φθάσει στο σημείο σύνδεσης της μήτρας με το επωνύχιο, ο μύκητας προσβάλλει τις επιφανειακές στιβάδες της ονυχαίας πλάκας, η οποία στην περιοχή αυτή είναι μαλακή και εύπεπτη και μπορεί να προκαλέσει ήπια φλεγμονή. Η διαδικασία ξεκινά με την εμφάνιση λευκωπής κηλίδας. Στη συνέχεια ο μύκητας προσβάλλει όλες τις στιβάδες της ονυχικής πλάκας καθώς και την κοίτη του όνυχα με επακόλουθο την έντονη φλεγμονώδη αντίδραση και καταστροφή του όνυχα. Κατά την ανάπτυξη του μύκητα κατά μήκος της ονυχαίας πλάκας δημιουργούνται διακλαδώσεις, οι οποίες εκτείνονται μέχρι τη ρίζα του όνυχα (English, 1976).

Η σπουδαιότητα των δερματοφύτων στην ονυχομυκητίαση έχει μελετηθεί ευρέως. Ο επιπολασμός των ειδών των δερματοφύτων έχει παρουσιάσει σημαντική αύξηση τις τελευταίες τρεις δεκαετίες σε περιοχές όπως το Ηνωμένο Βασίλειο, γεγονός που καθιστά ιδιαίτερα σημαντική τη μελέτη των ειδών αυτών (Borman et al, 2007).

### 1.3.2. Ζυμομύκητες

Οι επιφανειακές μυκητιάσεις οφείλονται σε ποσοστό 5- 10% σε ζυμομύκητες. Η προσβολή από ζυμομύκητες του γένους *Candida*, εμφανίζει τη μεγαλύτερη πιθανότητα πρόκλησης λοιμώξεων. Επίσης υπάρχουν και διάφοροι άλλοι ζυμομύκητες, όπως τα είδη του γένους των *Malassezia*.

Οι μύκητες του γένους *Candida* είναι ευκαιριακά παθογόνοι, ενώ αρκετοί από αυτούς αποτελούν και μέρος της χλωρίδας του ανθρώπου. Τα κυριότερα είδη είναι η *Candida albicans*, η *Candida parapsilosis* η *Candida guilliermondii*, η *Candida tropicalis* και η *Candida glabrata*. Ανήκουν στους ζυμομύκητες, είναι μονοκύτταροι μικροοργανισμοί και πολλαπλασιάζονται με εκβλάστηση, σχηματίζοντας ψευδομυκήλιο. Εξάίρεση αποτελεί η *Candida glabrata*, η οποία δε δημιουργεί ψευδοϋφές (Segal et al. 2000, Trofa et al. 2008, Weller et al. 2008).

Η *Malassezia furfur*, ένα από τα είδη του γένους *Malassezia*, είναι μέρος της φυσιολογικής χλωρίδας του δέρματος, ευθύνεται όμως για την πρόκληση της ποικιλόχρωμης πιτυρίασης.

Οι παράγοντες κινδύνου για την προσβολή από την *Candida parapsilosis* περιλαμβάνουν τραυματισμούς των ονύχων καθώς και έκθεσή τους στο έδαφος κατά τη διάρκεια δραστηριοτήτων, όπως η κηπουρική (Harmsen et al., 1999). Γενικότερα οι λοιμώξεις των ονύχων από το γένος *Candida* είναι συχνότερες στις γυναίκες και εντοπίζονται συνήθως στους όνυχες των χεριών. Επίσης συχνά παρατηρούνται σε μάγειρες, ζαχαροπλάστες, νοικοκυρές, καθαριστές και επαγγελματικές ομάδες που συχνά έρχονται τα χέρια τους σε επαφή με το νερό.

Κατά την προσβολή των ονύχων από ζυμομύκητες του γένους *Candida*, στα πλάγια ή στο ελεύθερο άκρο των ονύχων σχηματίζονται αδιαφανείς κηλίδες, οι οποίες όσο εξελίσσεται η νόσος γίνονται μελανές. Στο ελεύθερο άκρο των ονύχων παρατηρείται πάχυνση, ενώ είναι δυνατόν ακόμη και να καταστραφούν και να αποπέσουν (Frankel, 2006). Συνήθως οι προσβολές των ονύχων από το γένος *Candida* χαρακτηρίζονται από οίδημα και ερύθημα της εγγύς περιοχής και των πλευρικών πτυχώσεων των ονύχων (Kaur R et al, 2008). Οι ζυμομύκητες του γένους *Candida* δεν μπορούν να διεισδύσουν σε υγιή ονυχαία πλάκα γιατί δεν μπορούν να παράγουν ειδικές κερατινάσες (Hay et al., 2001).

### 1.3.3. Μη δερματοφυτικοί νηματοειδείς μύκητες

Οι ονυχομυκητιάσεις σπανιότερα οφείλονται και σε άλλους νηματοειδείς μύκητες, μη δερματοφυτικούς, όπως οι μύκητες *Scytalidium dimidiatum*, *Scytalidium hyalinum*, καθώς και διάφορα είδη των γενών *Scopulriopsis*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Scedosporium* όπως και της ομάδας των *Mucoraceae* (παλαιότερα Ζυγομύκητες).

Οι μύκητες αυτοί επηρεάζουν κυρίως τους όνυχες των ποδιών και περιστασιακά τους όνυχες των χεριών, ενώ αποτελούν το 1,5-6% του συνόλου των ονυχομυκητιάσεων.

Ταξινομούνται σε δύο ομάδες από τις οποίες η πρώτη περιλαμβάνει μύκητες που μπορούν να αποτελούν κύριο αιτιολογικό παράγοντα μιας ονυχομυκητίασης, όπως οι μύκητες *Scytalidium dimidiatum* και *Scytalidium hyalinum*, ενώ η δεύτερη ομάδα περιλαμβάνει μύκητες οι οποίοι ευκαιριακά επιμολύνουν τους όνυχες και προκαλούν ονυχομυκητιάσεις, όπως οι μύκητες *Scopulriopsis brevicaulis*, *Aspergillus sydowii* και *Onychocola Canadensis* (Kaur et al., 2008).

Οι μύκητες *Scytalidium dimidiatum* και *Scytalidium hyalinum* εμπλέκονται σε λοιμώξεις παρόμοιες με αυτές που προκαλεί το *Trichophyton Rubrum*, καθώς προκαλούν ονυχόλυση χωρίς όμως σημαντική υπερκεράτωση. Η ανάπτυξη και των δύο μπορεί να ανασταλεί από την κυκλοεξαμίδη (ακτιδιόνη), η οποία πρέπει να απουσιάζει από τα θρεπτικά υλικά που χρησιμοποιούνται για την καλλιέργειά τους.

Εκτός από τα είδη *Scytalidium* και τον μύκητα *Scopulriopsis brevicaulis* που συχνά προκαλούν ονυχομυκητιάσεις, η ερμηνεία των καλλιεργειών από τους υπόλοιπους μη δερματοφυτικούς νηματοειδείς μύκητες, πρέπει να γίνεται με προσοχή γιατί μπορεί να είναι απλώς σαπροφυτικοί.

Οι μη δερματοφυτικοί νηματοειδείς μύκητες συνδέονται συχνά με λοιμώξεις που σχετίζονται με τραυματισμένους όνυχες σε ηλικιωμένους ασθενείς, όπως οι μύκητες *Acremonium spp*, *Alternaria spp* και *Aspergillus spp* (Effendy et al., 2005).

### 1.4 Μετάδοση της ονυχομυκητίασης

Η μετάδοση της ονυχομυκητίασης επέρχεται μετά από άμεση ή έμμεση επαφή του ξενιστή με τους πάσχοντες. Η μετάδοση μπορεί να πραγματοποιηθεί μέσω της μεταφοράς στον ξενιστή ελεύθερων αρθροκονιδίων, τα οποία αποτελούν τη λοιμογόνο

μορφή του μύκητα ή μέσω μικρών ενεργών τμημάτων του δέρματος ή των ονύχων, τα οποία εμπεριέχουν αρθροκονίδια. Τα αρθροκονίδια προσκολλώνται επιλεκτικά στα επιθηλιακά κύτταρα της κεράτινης στιβάδας του δέρματος του ξενιστή. Ο ενοφθαλμισμός θεωρείται ότι επιτυγχάνεται με σχηματισμό φυσικών ή χημικών δεσμών μεταξύ αρθροκονιδίων και κερατινοκυττάρων του δέρματος. Επακολουθεί εκβλάστηση των αρθροκονιδίων, παραγωγή υφών και δεισδυση αυτών στην κεράτινη στιβάδα στην οποία αναπτύσσονται τόσο οριζόντια, μεταξύ των επιμέρους στιβάδων, όσο και κάθετα (Aljabre, 1993).

Η διαδικασία της διείσδυσης διευκολύνεται από την παρουσία απολέπισης και διαβροχής. Γι' αυτό η μετάδοση γίνεται μετά από επαφή π.χ. του γυμνού πέλματος του ξενιστή με μολυσμένες υγρές επιφάνειες κοινόχρηστων χώρων, όπως τα κολυμβητήρια, λουτήρες και αθλητικές εγκαταστάσεις. Η χρήση κλειστών αθλητικών υποδημάτων βοηθά την ανάπτυξη των μυκήτων λόγω της υψηλής θερμοκρασίας και υγρασίας που υπάρχει σε αυτά (Zaias, 1972).

Η παθογένεια της ονυχομυκητίασης εξαρτάται από τον κλινικό τύπο. Στην πιο κοινή μορφή ονυχομυκητίασης ο μύκητας εξαπλώνεται από το δέρμα του πέλματος και εισβάλλει στο υπονύχιο. Στην περίπτωση όπου εμφανίζεται φλεγμονή τότε προκαλούνται τα κλινικά συμπτώματα της ονυχομυκητίασης. Στην επιφανειακή ονυχομυκητίαση προκαλείται άμεση εισβολή του μύκητα στην επιφάνεια του όνυχα. Στην περίπτωση όπου ο μύκητας διαπερνά την επιφάνεια των ονύχων η προσβολή είναι πιο έντονη (Baran, 2006).

Η ανατομία των ονύχων ευνοεί την είσοδο παθογόνων μικροοργανισμών, γεγονός που συντελεί στην εμφάνιση ονυχομυκητιάσεων. Παρά το γεγονός ότι υπάρχουν διάφοροι παράγοντες προδιάθεσης για την εμφάνιση των ονυχομυκητιάσεων δεν είναι σαφής η παθογένειά της. Μηχανισμοί του ανοσοποιητικού συστήματος θεωρείται ότι εμπλέκονται στην εμφάνιση της ονυχομυκητίασης (Grover and Khurana, 2012).

## **1.5 Κλινικές μορφές της ονυχομυκητίασης**

Οι ονυχομυκητίσεις ταξινομούνται σε τέσσερις κλινικές μορφές, ανάλογα με τον τρόπο προσβολής των ονύχων (ταξινόμηση κατά Zaias) (1972).

α) **Την περιφερική ονχομυκητίαση**, που είναι η πιο συχνή μορφή και οφείλεται στα δερματόφυτα και σπανιότερα στα μη δερματόφυτα. Στις περισσότερες περιπτώσεις υπεύθυνοι αιτιολογικοί παράγοντες θεωρούνται τα δερματόφυτα *T. rubrum* και *T. mentagrophytes* (var. *interdigitale*). Η προσβολή ξεκινάει από την κεράτινη στιβάδα του υπονυχίου ή της πλάγιας ονυχιάς πτυχής και καταλαμβάνει την κοίτη του όνυχα, με συνέπεια την υπονύχια υπερκεράτωση που υπεργείρει την ονυχία πλάκα. Οι όνυχες παχύνονται, γίνονται εύθρυπτοι, χάνουν τη στιλπνότητά τους και εμφανίζουν αλλοίωση της φυσιολογικής τους χροιάς (ωχροκίτρινη ή κιτρινόφαιη).

β) **Τη λευκή επιφανειακή ονχομυκητίαση**, που είναι αρκετά σπάνια μορφή και παρατηρείται κυρίως στους όνυχες των ποδιών. Ο συχνότερα ενοχοποιημένος μύκητας είναι το *T. mentagrophytes* (var. *interdigitale*). Άλλα είδη νηματοειδών μυκήτων (μη δερματόφυτα) έχουν επίσης ενοχοποιηθεί, όπως *Fusarium*, *Cephalosporium* και *Aspergillus spp.*

Η μορφή αυτή της ονχομυκητίασης, έχει παρατηρηθεί σε ασθενείς με AIDS και μπορεί να αποτελεί ένα από τα πρόδρομα σημεία της νόσου (Σωτηριάδης και Πατσατσή, 2005).

Προσβάλλεται η άνω επιφάνεια της ονυχιάς πλάκας, με συνέπεια τη δημιουργία μικρών, αδιάφανων, λευκωπών νησιδίων, σαφώς περιγεγραμμένων, που αντιστοιχούν στις αποικίες του υπεύθυνου μύκητα. Τα νησίδια προοδευτικά εξαπλώνονται και καταλαμβάνουν ολόκληρη την επιφάνεια του όνυχα, η οποία γίνεται τραχειά και εύθρυπτη.

γ) **Την εγγύς υπονύχια ονχομυκητίαση**, που είναι η πιο σπάνια κλινική μορφή. Συνήθως ενοχοποιούνται το *T. rubrum*, το *T. mentagrophytes* (var. *interdigitale*) και το *T. tonsurans*. Παρατηρείται στους όνυχες τόσο των χεριών όσο και των ποδιών. Η προσβολή της κεράτινης στιβάδας ξεκινάει από την εγγύς ονυχία αύλακα και χωρίς θεραπεία προσβάλλεται η μήτρα του όνυχα. Αυτό έχει ως συνέπεια τη δημιουργία μιας λευκωπής μέχρι λευκοκίτρινης περιοχής κάτω από το μηνίσκο, η οποία δεν αφορά την επιφάνεια της ονυχιάς πλάκας, που παραμένει ομαλή και ανέπαφη, αλλά τις βαθύτερες στιβάδες της. Σπάνια στη μορφή αυτή υπάρχει και πόνος.

Τα τελευταία χρόνια αρκετοί ασθενείς με AIDS παρουσιάζουν εγγύς υπονύχια ονχομυκητίαση στους όνυχες των ποδιών. Ο συχνότερος υπεύθυνος παθογόνος μύκητας είναι το *T. Rubrum* (Elewski, 1993).

δ) **Την καντιντιακή ονυχομυκητίαση**, που είναι γνωστή ως καντιντιακή λοίμωξη και εκδηλώνεται με τρεις μορφές:

1. **Την παρωνυχία και δευτεροπαθή ονυχία**, που είναι η συχνότερη κλινική μορφή ονυχίας από *Candida*. Η *C. albicans* ευθύνεται συνήθως για τη μορφή αυτή αλλά μπορεί επίσης να απομονωθούν και *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii* και *C. tropicalis*. Η έναρξη της νόσου δεν είναι οξεία. Η προσβολή αρχίζει από την εγγύς ονυχαία πτυχή, η οποία διογκώνεται, γίνεται εξέρυθρη, επώδυνη και συχνά πυορροεί.

2. **Την ονυχόλυση του περιφερικού άκρου του όνυχα**, που είναι εξαιρετικά σπάνια κλινική εικόνα, κατά την οποία υπάρχει προσβολή της κερατίνης της ονυχαίας πλάκας από *C.albicans*. Προηγείται συνήθως πόνος στο ελεύθερο άκρο του όνυχα και στη συνέχεια εμφανίζεται χαρακτηριστική τριγωνική ονυχόλυση.

3. **Την ονυχία σε σύνδρομο χρόνιας δερματοβλεννογόνιας καντιντίασης**. Πρόκειται για εξαιρετικά σπάνια μορφή καντιντιακής ονυχίας που εμφανίζεται από την παιδική ηλικία. Προσβάλλεται η ονυχαία πλάκα σε όλο το πλάτος της από την *Candida*, με συνέπεια το σχηματισμό υπονύχιας υπερκεράτωσης. Συνήθως καταλήγει σε δυστροφία των ονύχων, οίδηματώδη παρωνυχία και τα δάκτυλα παίρνουν τη μορφή πλήκτρου τυμπάνου (Tan et al., 1994).

Πληρέστερη ίσως θεωρείται η ταξινόμηση των ονυχομυκητιάσεων κατά Baran κατά την οποία διακρίνουμε 5 κλινικούς τύπους ονυχομυκητίασης:

α) **DLSO (Distal lateral subungual onychomycosis)**-περιφερική ονυχομυκητίαση του ελεύθερου άκρου ή των πλαγίων της ονυχαίας πλάκας, κατά την οποία οι ασθενείς παρουσιάζουν τοπική υπερκεράτωση και ονυχόλυση, η οποία έχει συνήθως κίτρινο – λευκό χρώμα

β) **WSO (White superficial onychomycosis)**- λευκή επιφανειακή ονυχομυκητίαση, η οποία περιορίζεται στους όνυχες και χαρακτηρίζεται από μια μεγαλύτερη και σε βαθύτερη επιφάνεια προσβολή του όνυχα.

γ) **PSO (Proximal subungual onychomycosis)**- Εγγύς υπονύχια ονυχομυκητίαση, κατά την οποία προκαλείται λευκονυχία των ονύχων.

δ) **EO (Endonyx onychomycosis)**- ενδονύχια ονυχομυκητίαση, κατά την οποία εμφανίζεται γαλακτώδης, λευκός αποχρωματισμός της επιφάνειας των ονύχων, χωρίς ενδείξεις υπερκεράτωσης ή ονυχόλυσης (Piraccini , 2013).

ε) **TDO (Total dystrophic onychomycosis)**- ολική ονυχοδυστροφία, κατά την οποία η ονυχαία πλάκα είναι κατεστραμμένη και στην κοίτη του όνυχα υπάρχουν

υπολείμματα κερατίνης. Είναι θεωρητικά η τελική κατάληξη όλων των μορφών ονυχομυκητιάσεις, όταν δεν εφαρμοσθεί θεραπεία (Baran et al., 1998).

Οι ονυχομυκητιάσεις συνήθως είναι χρόνιες, υποτροπιάζουσες και χωρίς θεραπεία καταλήγουν σε ολική ονυχοδυστροφία και ονυχόλυση, κυρίως στις κάντινες. Είναι ιδιαίτερα σημαντικό να επιβεβαιωθεί εργαστηριακά ότι η ονυχαία βλάβη οφείλεται σε μύκητα και να ταυτοποιηθεί ο υπεύθυνος μύκητας, διότι η χορηγούμενη από του στόματος θεραπεία είναι μακρά και δαπανηρή και μπορεί να επιβαρύνει τον ασθενή. Έτσι είναι πολύ σημαντικό, οι ονυχομυκητιάσεις να διαγιγνώσκονται, να ταυτοποιούνται και να αντιμετωπίζονται με την κατάλληλη θεραπευτική αγωγή (Tan et al., 1994).

### **1.6. Εργαστηριακή διάγνωση ονυχομυκητιάσεων**

Η διάγνωση των ονυχομυκητιάσεων είναι δύσκολο να επιτευχθεί μόνο με την κλινική παρατήρηση. Οι μυκητολογικές εξετάσεις είναι απαραίτητες για την επιβεβαίωση ή τον αποκλεισμό της λοίμωξης, τον εντοπισμό του υπεύθυνου μικροοργανισμού ή μικροοργανισμών (αν υπάρχει μική λοίμωξη) και την αποφυγή άσκοπης θεραπείας. Η μυκητολογική εξέταση των ονύχων παρουσιάζει αρκετές δυσκολίες σε ότι αφορά την απομόνωση, ταυτοποίηση και αξιολόγηση των αποτελεσμάτων (Habif, 2010).

Οι μέθοδοι που εφαρμόζονται για την εργαστηριακή διάγνωση των ονυχομυκητιάσεων είναι κυρίως οι κλασικές τεχνικές, ενώ οι μοριακές τεχνικές αποτελούν νεότερο διαγνωστικό εργαλείο στη διερεύνηση των ονυχομυκητιάσεων.

Στις κλασικές τεχνικές ανήκουν:

1) Η άμεση μικροσκοπική εξέταση ρινισμάτων ονύχων. Η τεχνική αυτή περιλαμβάνει κυρίως την επεξεργασία του δείγματος με διάλυμα KOH 10-30% και παραμονή σε θερμοκρασία δωματίου ή θερμοκρασία 35-37°C για μία ώρα ή περισσότερο ως και την επόμενη ημέρα. Συνήθως μία ως δύο ώρες σε θερμοκρασία δωματίου είναι αρκετές. Σκοπός είναι η αποδόμηση της κυτταρίνης, η διαύγαση του ιστού και η εμφάνιση ορατών μυκητιακών στοιχείων. Η ανεύρεση των μυκητιακών δομών (υφές και αρθροκονίδια) μπορεί να διαχωρίσει τον υπεύθυνο μύκητα, αλλά δεν ταυτοποιεί τον μικροοργανισμό. Η άμεση μικροσκόπηση αν και είναι ταχεία και



οικονομική μέθοδος, δίνει ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα στο 5-15% των περιπτώσεων (Petrini and Rosen, 2002).

Με την άμεση μικροσκοπική εξέταση τα δερματόφυτα μπορούν να αναγνωρισθούν από την παρουσία αρθροσπορίων, καθώς και υφών μεμονωμένων ή με διακλαδώσεις, ομοιόμορφου εύρους, οι οποίες φέρουν χαρακτηριστικά διαφράγματα. Συχνά οι υφές είναι ελάχιστες πολύ λεπτές και δεν διακρίνονται εύκολα. Δεν είναι σπάνιο, η άμεση μικροσκοπική εξέταση να αποβεί ψευδώς αρνητική, ακόμη και αν η εξέταση γίνεται από έμπειρο προσωπικό. Στην περίπτωση αυτή αν ο ασθενής έχει κλινική εικόνα πιθανής μυκητίασης η μικροσκοπική εξέταση θα πρέπει να επαναληφθεί (Sher and Ackerman, 1980)

Η διάγνωση των ονχομυκητιάσεων πραγματοποιείται συνήθως με λήψη δείγματος από τον ασθενή. Η λήψη γίνεται κοντά στο δέρμα και εκεί όπου ο όνυχας παρουσιάζει τη βλάβη. Το δείγμα θα πρέπει να λαμβάνεται σύμφωνα με την κλινική εικόνα του όνυχα. Καθότι η προσβολή των ονύχων από δερματόφυτα πραγματοποιείται πρωτοπαθώς στην κοίτη, το δείγμα θα πρέπει να λαμβάνεται κυρίως από το υπωνύχιο και όχι από την ονυχαία πλάκα. Ειδικότερα θα πρέπει να λαμβάνεται από το όριο μεταξύ υγιούς και καταστρεμμένου τμήματος του όνυχα. Δείγματα λαμβανόμενα μόνο από το πλάγιο άκρο μπορεί να δώσουν ψευδώς αρνητικές καλλιέργειες, επειδή στο σημείο αυτό ο μύκητας δεν είναι βιώσιμος. Ξέσματα της επιπολής επιφάνειας λαμβάνονται όταν η ονυχαία πλάκα επικαλύπτεται από λευκωπά νησίδια (Habif., 2010).

2) Η καλλιέργεια σε ειδικά θρεπτικά υποστρώματα και η ταυτοποίηση του είδους βάση μορφολογικών και βιοχημικών-φυσιολογικών κριτηρίων. Η καλλιέργεια αποτελεί την περισσότερη διαδεδομένη μέθοδο επιβεβαίωσης της διάγνωσης της ονχομυκητίασης, παρ'ότι το ποσοστό ψευδώς αρνητικών καλλιεργειών, φθάνει στο 30% ή και περισσότερο, ανάλογα με το εργαστήριο. Επίσης οι καλλιέργειες αποβαίνουν αρνητικές σε περισσότερο από 40% επί των θετικών μικροσκοπικά, δειγμάτων.

Λόγω της ύπαρξης βακτηρίων και σαπροφυτικών μυκήτων στα δείγματα ονύχων, είναι απαραίτητο να χρησιμοποιούνται εκλεκτικά υλικά, ώστε να μπορούμε με μεγαλύτερη πιθανότητα να απομονώσουμε τον παθογόνο μύκητα. Έτσι χρησιμοποιείται το Sabouraud's dextrose άγαρ με διάφορα αντιβιοτικά, όπως χλωραμφενικόλη ή/και γενταμικίνη, αλλά και με κυκλοεξαμίδη (ακτιδιόνη) για την αναστολή της ανάπτυξης βακτηρίων, αλλά και σαπροφυτικών μυκήτων. Επίσης εναλλακτικά χρησιμοποιείται το dermatophyte test medium, το οποίο είναι κυρίως υλικό ταυτοποίησης κι όχι

πρωτογενούς απομόνωσης, αλλά μπορεί να χρησιμοποιηθεί και εξαρχής για συντόμευση του χρόνου καλλιέργειας (Campell et al., 1996).

Οι καλλιέργειες επωάζονται σε θερμοκρασίες δωματίου (20°C-25°C) ως και 30°C-32°C, συνήθως για χρονικό διάστημα τουλάχιστο 3 εβδομάδων, για το αρνητικό αποτέλεσμα. Η ταυτοποίηση θα βασισθεί στα μακροσκοπικά και μικροσκοπικά χαρακτηριστικά των μυκήτων. Η αναγνώριση χαρακτηριστικών στοιχείων για τους διάφορους μύκητες και η χρησιμοποίηση ειδικών αλγόριθμων ταυτοποίησης (κλειδες), θα κάνει δυνατή την αναγνώριση του είδους, στις περισσότερες περιπτώσεις κλινικών στελεχών (Shemer et al., 2009).

Συγκεκριμένα για την ταυτοποίηση των δερματοφυτικών μυκήτων υπάρχουν κάποιες δοκιμασίες σημαντικές για την απομόνωσή τους. Τέτοιες είναι η δοκιμασία διάτρησης της τρίχας, η παραγωγή ουρεάσης, η ανάπτυξη σε κόκκους ρυζιού, δοκιμασίες αφομοίωσης πηγών άνθρακα και αζώτου, δοκιμασίες υδρόλυσης, καθώς και ανάπτυξης ή όχι υπό την παρουσία διαφόρων θρεπτικών συστατικών.

Αντίστοιχα η δοκιμασία παραγωγής βλαστικού σωλήνα (germ tube), η ανακαλλιέργεια στο ειδικό χρωμογόνο υλικό Chromagar και η χρήση εμπορικών τυποποιημένων συστημάτων ταυτοποίησης για την αφομοίωση των υδατανθράκων, μπορούν να συμβάλλουν στην οριστική ταυτοποίηση του είδους ενός ζυμομύκητα (Seebacher et al., 2007).

Οι παραπάνω κλασικές/μορφολογικές μέθοδοι διάγνωσης, παρ' όλο που χρησιμοποιούνται ευρέως στα μυκητολογικά εργαστήρια, παρουσιάζουν ορισμένα μειονεκτήματα. Για παράδειγμα, η άμεση μικροσκόπηση δεν έχει καλή ειδικότητα για την αναγνώριση των διαφόρων μυκητιακών ειδών. Παρομοίως, η καλλιέργεια και η ακόλουθη ταυτοποίηση του υπεύθυνου είδους, είτε με βιοχημικές μεθόδους, είτε με μικροσκόπηση και τη χρήση αλγοριθμικών κλειδών, είναι βραδεία και συνήθως απαιτεί 2-4 εβδομάδες. Η ευαισθησία και των δύο μεθόδων στην εργαστηριακή πράξη είναι σχετικά χαμηλή. (Αραμπατζής και Βελεγράκη, 2009).

Η χρήση του συστήματος OSI (Onychomycosis Severity Index) εφαρμόστηκε για τον προσδιορισμό της σπουδαιότητας της ονυχομυκητίασης. Σύμφωνα με το σύστημα αυτό, το οποίο χρησιμοποιεί μια κλίμακα, μια ήπιας μορφής ονυχομυκητίαση αντιπροσωπεύει τιμές 1 έως 5, μια μέτριας μορφής ονυχομυκητίαση αντιστοιχεί σε τιμές μεταξύ 6 έως 15 και μια σοβαρής μορφής μυκητίαση αντιστοιχεί σε τιμές μεταξύ 16 έως 35 (Carney et al., 2011).

3) Η ιστολογική εξέταση αποτελεί μια ακόμη εργαστηριακή διαγνωστική μέθοδο της ονχομυκητιάσης, κυρίως στις περιπτώσεις όπου, παρά το γεγονός ότι η κλινική εικόνα του όνυχα συνηγορεί υπέρ της μυκητιακής λοίμωξης, δεν ανευρίσκονται στοιχεία του μύκητα, σε επαναλαμβανόμενες μικροσκοπικές εξετάσεις και ο μύκητας δεν απομονώνεται στις καλλιέργειες. Στα ιστολογικά παρασκευάσματα εντοπίζονται ευκρινέστερα οι υφές των δερματοφύτων ή άλλων μυκήτων, με διαφορετική μορφολογική εμφάνιση, στις βαθύτερες στιβάδες της ονυχιάς πλάκας, όπως στην κοιλιακή επιφάνεια και στην κεράτινη στιβάδα της κοίτης του όνυχα.

Πρόσφατα έχουν αναπτυχθεί μέθοδοι διάγνωσης οι οποίες βασίζονται στην ανίχνευση του DNA των δερματοφύτων. Οι μέθοδοι αυτοί βασίζονται στη μέθοδο PCR (polymerase chain reaction) είναι πολύ ευαίσθητες και επιτυγχάνουν ακριβέστερη διάγνωση των προσβολών από δερματοφύτα και ειδικότερα των ονχομυκητιάσεων. Λόγω της επίπονης και χρονοβόρας ταυτοποίησης των δερματοφύτων η μέθοδος PCR μπορεί να συμβάλλει ουσιαστικά στην ακρίβεια της ταυτοποίησης. Με βάση τον προσδιορισμό της αλληλουχίας των βάσεων του DNA, η οποία είναι μοναδική για κάθε είδους δερματοφύτου μπορεί να γίνει η ταυτοποίηση του αιτιολογικού παράγοντα των ονχομυκητιάσεων. Στη μέθοδο αυτή απαιτείται απομόνωση και καλλιέργεια του μύκητα και εκχύλιση του ολικού DNA από το στέλεχος που θα αναπτυχθεί στην καλλιέργεια ή ακόμη και από το ίδιο δείγμα του όνυχα. (Arabatzis et al., 2007).

Η επιστημονική κοινότητα έχει επικεντρώσει το ενδιαφέρον της στην ανεύρεση και αξιολόγηση μοριακών τεχνικών, που αποτελούν νεώτερα διαγνωστικά εργαλεία, στη διερεύνηση των ονχομυκητιάσεων και με τη βοήθεια των οποίων θα μπορεί να γίνει άμεσα η ανίχνευση των μυκήτων στο κλινικό υλικό. Οι πρώτες διαγνωστικές τεχνικές αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR), οι οποίες ενίσχυαν τη συνθετάση της χιτίνης 1 ή το γονίδιο της 18S περιοχής του ριβοσωμικού DNA, ήταν εξαιρετικά ευαίσθητες, όταν εφαρμόζονταν σε κλινικό υλικό λεπιών δέρματος και ονύχων, αλλά δεν μπορούσαν να διαχωρίσουν τα δερματοφύτα από μη παθογόνους μύκητες (Foster et al, 2002).

Τα τελευταία χρόνια έχει αναπτυχθεί μία σειρά ειδικών για τα δερματοφύτα, διαγνωστικών PCR, με ιδιαίτερη έμφαση στο *T. rubrum*. Ικανοποιητικές ως προς την ευαισθησία και ειδικότητα, συμβατικές PCR ανίχνευσης του *T. rubrum*, έχουν σχεδιαστεί στη βάση του μικροδορυφορικού δείκτη T1 και των γονιδίων των περιοχών ITS του ριβοσωμικού DNA (rDNA) (Kardjeva et al., 2007).

Έχουν επίσης αναπτυχθεί μέθοδοι PCR πραγματικού χρόνου ανάγνωσης (real-time PCR) για τη διάγνωση δερματοφυτικών λοιμώξεων (Harmsen et al., 1997, Arabatzis et al., 2007). Η αποτελεσματικότητα ενός αξιόπιστου πρωτοκόλλου μοριακής διάγνωσης ή ταυτοποίησης προϋποθέτει την ύπαρξη ενός κατάλληλου πρωτοκόλλου εκχύλισης του γενετικού υλικού του μύκητα. Στη μυκητολογία σημαντικό τέτοιο παράδειγμα είναι η PCR του Ασπεργίλλου, όπου φαίνεται σε πρόσφατα δημοσιευμένα συμπεράσματα, ότι η εκχύλιση του γενετικού υλικού είναι πολύ σημαντικός παράγοντας, ίσως πιο καθοριστικός για το αποτέλεσμα από το ίδιο το εφαρμοζόμενο πρωτόκολλο ενίσχυσης του DNA.

Σημαντικά προβλήματα στις ονυχομυκητιάσεις αφορούν στη σκληρή και ανθεκτική υφή του ιστού και στην απομόνωση επαρκούς ποσότητας του γενετικού υλικού. Στη βιβλιογραφία προτείνονται διάφορα πρωτόκολλα εκχύλισης με χρήση χημικών αντιδραστηρίων ή σε συνδυασμό με νεότερα εμπορικά kit. (Liu et al., 2000, Kaur et al., 2008).

### **1.7. Διαφορική διάγνωση ονυχομυκητιάσεων**

Πολλές παθήσεις μπορούν να συνδέονται με τη δυστροφία του όνυχα, συμπεριλαμβανομένων βακτηριακών και μυκητιακών λοιμώξεων. Μερικές φορές η βακτηριακή λοίμωξη μπορεί να συνυπάρχει με μυκητιακή και να χρήζει θεραπείας από μόνη της. Τα κυριότερα βακτήρια που προκαλούν λοίμωξη στους όνυχες είναι τα *Pseudomonas aeruginosa* και *Staphylococcus aureus* (Denning et al., 1995).

Πολλές άλλες ασθένειες μπορούν να προκαλέσουν αλλαγή στην εμφάνιση ενός όνυχα, αλλά η επιφάνεια ενός όνυχα συνήθως δεν γίνεται μαλακή και εύθρυπτη όπως σε μία μυκητιακή λοίμωξη. Τέτοιες ασθένειες που μοιάζουν με μία μυκητιακή λοίμωξη είναι η ψωριασική ονυχία στην οποία παρατηρούνται βοθρία στον όνυχα και η οποία πιθανώς να συνοδεύεται και από άλλες ψωριασικές βλάβες (Jiaravuthisan et al, 2007), όπως το χρόνιο έκζεμα χεριών που μπορεί να προκαλέσει παραμορφώσεις και στους όνυχες, το σύνδρομο Reiter, τον ομαλό λειχήνα, τη γυροειδή αλωπεκία, τη νόσο Darier καθώς και τη Νορβηγική ψώρα. Άλλα δερματικά νοσήματα που σπανιότερα εμφανίζουν διαταραχές στους όνυχες είναι η ακροφλυκταίνωση, η λέπρα, η κοινή πέμφιγα, η ερυθρά ιόνθιος πιτυρίαση, η σκληροδερμία (Tamaki et al, 2012), η οζώδης σκλήρυνση ή νόσος του Bourneville-Pringle, η σπογγοειδής μυκητίαση, η σαρκοείδωση, η ροδόχρους

πιτυρίαση (Allevato, 2010), το σύνδρομο Sweet, το σύνδρομο Raynaud, το σύνδρομο Netherton, η μυξοειδής κύστη ονύχων και η συγγενής λευκονυχία.

Επίσης κακοήθεις και καλοήθεις όγκοι μπορεί να προσβάλλουν τους όνυχες, όπως το κακόηθες μελάνωμα, το βασικοκυτταρικό καρκίνωμα, η νόσος Bowen, το ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα, το κερατοακάνθωμα, οι σπίλοι της μήτρας του όνυχα, το γλωμαγγείωμα και το ινοκεράτωμα (Zabawski et al, 2001). Τέλος διάφορες δυστροφίες ή αλλοιώσεις ονύχων παρατηρούνται και σε συστηματικά νοσήματα όπως σε ηπατοπάθεια, καρδιακή ανεπάρκεια, νόσο των νεφρών και σε συστηματική λήψη φαρμάκων.

Το γεγονός λοιπόν ότι πολλές παθήσεις μιμούνται την κλινική εικόνα της ονχομυκητίασης καθιστά ακόμη πιο επιτακτική την ανάγκη ανεύρεσης μεθόδων που θα εξασφαλίζουν την έγκυρη και έγκαιρη διάγνωση της, με τελικό στόχο την αποτελεσματική θεραπεία της.

### **1.8. Θεραπεία-Πρόληψη Ονχομυκητιάσεων**

Η ονχομυκητίαση είναι μια επώδυνη νόσος, χρόνια και υποτροπιάζουσα, η οποία χωρίς θεραπεία μπορεί να προκαλέσει μόνιμη βλάβη στους όνυχες, καταλήγοντας σε ολική ονχοδυστροφία. (Roujeau et al., 2004).

Τα συμπτώματα της ονχομυκητίασης και η επίδραση της στην εμφάνιση του ασθενούς, είναι σημαντικοί παράγοντες που καθορίζουν την αντίδραση των ασθενών ως προς την αντιμετώπισή της. Η επίδραση της ονχομυκητίασης είναι μεγαλύτερη στη ψυχοκοινωνική λειτουργία του ασθενούς, παρά στη σωματική και είναι άμεσα συνδεδεμένη με το εύρος της ασθένειας (Shaw et al., 2002).

Η ονχομυκητίαση μπορεί να προκαλέσει σωματικούς και επαγγελματικούς περιορισμούς, οι οποίοι οδηγούν στη μείωση της ποιότητας ζωής. Οι ασθενείς με ονχομυκητίαση συνήθως παρουσιάζουν προβλήματα στην εμφάνιση των ονύχων, χωρίς έντονα σωματικά συμπτώματα. Καθώς η νόσος εξελίσσεται, δημιουργούνται προβλήματα στο περπάτημα, πόνο, δυσφορία, παραμόρφωση και απώλεια επιδεξιότητας των άκρων (Ralph, 1996). Επίσης, είναι δυνατόν σπάνια να προκαλέσει σοβαρές λοιμώξεις εφόσον ο οργανισμός βρίσκεται σε καταστολή του ανοσοποιητικού του συστήματος (Siegfried and Kortling, 1990).

Αρκετοί παράγοντες πρέπει να συνυπολογιστούν πριν την έναρξη της θεραπείας σε μία ονυχομυκητίαση. Ο αιτιολογικός παράγοντας, η ευαισθησία του στα αντιμυκητιακά φάρμακα, τα συνοδά νοσήματα του ασθενή, η συνέργεια της φαρμακευτικής αγωγής με άλλα φάρμακα που λαμβάνει ο ασθενής ή με τις διατροφικές του συνήθειες, οι παρενέργειες του φαρμάκου, η ηλικία του ασθενή, οι πιθανότητες συμμόρφωσης με την αγωγή καθώς και το κόστος της θεραπείας είναι μερικοί από τους παράγοντες αυτούς. Επίσης η επέκταση της νόσου και η σοβαρότητά της θα καθορίσουν την επιλογή της θεραπείας (Szerietowski et al 2006, Cathcart et al., 2009).

Η θεραπεία των ονυχομυκητιάσεων είναι ανάλογη του υπεύθυνου μύκητα (δερματόφυτο, κάντιντα ή μη δερματοφυτικός νηματοειδής μύκητας).

Συνήθως αγωγή από του στόματος ενδείκνυται στις ονυχομυκητιάσεις αλλά και σε δερματοφυτίαση του τριχωτού. Η αγωγή αυτή συνήθως χορηγείται τουλάχιστο για 3 μήνες και τα συνηθέστερα φάρμακα που χρησιμοποιούνται περιλαμβάνουν τη γκριζεοφουλβίνη, ιτρακοναζόλη και τερμπιναφίνη. Τα τοπικά χορηγούμενα φάρμακα σε μορφή κρέμας, αλοιφής κ.ά. που χρησιμοποιούνται ανήκουν σε τρεις κύριες κατηγορίες: στις αζόλες (μικοναζόλη, κροτριμαζόλη, εκοναζόλη, σουλκοναζόλη, μπιφοναζόλη, φεντικοναζόλη και σερτρακοναζόλη), στις αλλυλαμίνες (τερμπιναφίνη, ναφτιφινίνη) και στις κυκλοπυριδινόνες (κυκλοπυροξολαμίνη). Άλλα τοπικά χορηγούμενα φάρμακα είναι η αμορολφίνη, η χαλοπρογκίνη και η τολναφτάτη. Τα αντιμυκητιακά φάρμακα που χορηγούνται από το στόμα πρέπει να παρέχονται μετά από ιατρική παρακολούθηση λόγω των πιθανών συνεργειών τους με άλλα φάρμακα (Baran et al., 2006)..

Η καντιντιακή ονυχία αποκρίνεται σε τοπική και συστηματική θεραπεία. Η θεραπεία με ιτρακοναζόλη ή φλουκοναζόλη ή συνδυασμός και των δύο είναι εξίσου αποτελεσματική. Επίσης η ιτρακοναζόλη μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως συνεχής ή περιοδική θεραπευτική αγωγή ανάλογα με την εξέλιξη της πάθησης.

Η θεραπεία των νηματοειδών, μη δερματοφυτικών μυκήτων είναι ιδιαίτερα δύσκολη γιατί οι οργανισμοί αυτοί δεν είναι ευαίσθητοι σε κανένα αντιμυκητιακό φάρμακο. Κάποιες αζόλες, τοπική τερμπιναφίνη καθώς και η αλοιφή Whitfield's μπορεί να αποδειχθούν χρήσιμα φάρμακα για τους συγκεκριμένους μύκητες. Μέχρι σήμερα δεν υπάρχει κάποια αποτελεσματική θεραπεία. (Tosti et al., 2003)

Από τους νηματοειδείς, μη δερματοφυτικούς μύκητες, ο *Aspergillus* είναι η μόνη εξαίρεση, καθώς η ονυχομυκητίαση υποχωρεί με συστηματική θεραπεία είτε με τερμπιναφίνη είτε με ιτρακοναζόλη. Επίσης η τερμπιναφίνη θεωρείται ότι έχει

αποτελεσματική δράση σε ονυχομυκητιάσεις που προκαλούνται από διάφορα είδη του γένους *Scopulariopsis* (Gianni and Romano, 2004).

Η **πρόληψη** αποτελεί τον κυριότερο τρόπο αντιμετώπισης της νόσου. Στις μεθόδους πρόληψης περιλαμβάνονται: η τήρηση των κανόνων υγιεινής, η ορθή απολύμανση κοινόχρηστων χώρων όπως τα μπάνια και οι δεξαμενές κολύμβησης καθώς και η ελάττωση των μολυσματικών πηγών μέσω έγκαιρης και πλήρους θεραπείας (Piraccini, 2013).

Επίσης χρησιμοποιούνται επιτυχώς εμβόλια για την πρόληψη των λοιμώξεων, από ζωόφιλα δερματόφυτα, όπως το *T.verrucosum*, όπου πρόσφατα κυκλοφόρησε ένα εμβόλιο για τα άλογα (Insol®Dermatophyton), ενώ για τα ανθρωπόφιλα δερματόφυτα, όπως το *T. rubrum*, ακόμη δεν έχουν κατασκευαστεί αντίστοιχα εμβόλια (Smith et al., 1991).

### **1.9. Σκοπός της διπλωματικής εργασίας**

Οι ονυχομυκητιάσεις, αν και μη απειλητικές για τη ζωή, είναι επίμονες και χρόνιες λοιμώξεις, οι οποίες απαιτούν ειδική διαγνωστική προσέγγιση (κλινική και εργαστηριακή) και ταυτόχρονα εξειδικευμένη και παρατεταμένη φαρμακευτική θεραπεία. Η κλασική εργαστηριακή προσέγγιση είναι χρονοβόρα και μπορεί να υπολείπεται σε ευαισθησία.

Η προσπάθεια εφαρμογής ταχύτερης, πιο ευαίσθητης και πιο ειδικής μεθοδολογίας, οδηγεί την έρευνα στην εντατικότερη μελέτη για την εφαρμογή των μοριακών μεθόδων διάγνωσης και ταυτοποίησης. Στη διαγνωστική μοριακή προσέγγιση ένα αρχικό πρόβλημα που πρέπει να αντιμετωπιστεί είναι ο τρόπος εκχύλισης του DNA. Οι δυσκολίες εστιάζονται στο ότι ο όνυχας είναι ένα σκληρό και ανθεκτικό υλικό και συγχρόνως υπάρχει έλλειψη τυποποιημένων μοριακών μεθοδολογιών για την ανίχνευση μυκητιακού DNA απευθείας από το κλινικό δείγμα, με σκοπό τη διάγνωση των μυκητιακών λοιμώξεων των ονύχων

Έτσι σκοπός της διπλωματικής αυτής εργασίας είναι η συγκριτική μελέτη διαφορετικών πρωτοκόλλων εκχύλισης και η επιλογή του καταλληλότερου προκειμένου να χρησιμοποιηθεί σε μελλοντικά πρωτόκολλα μοριακής διάγνωσης των ονυχομυκητιάσεων.





## **2.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

### **2.1. Συλλογή, επεξεργασία και διάγνωση δειγμάτων**

Για τον σκοπό της μελέτης συλλέχθηκαν δείγματα ονύχων από ασθενείς με ονυχία, που είχαν κλινικά χαρακτηριστικά ονυχομυκητίασης και προσήλθαν στο Α΄ Εργαστήριο Μικροβιολογίας, της Ιατρικής Σχολής του Α.Π.Θ., με σκοπό τη διάγνωση πιθανής ονυχομυκητίασης.

Η συλλογή και επεξεργασία των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε στα παρακάτω στάδια:

A) Λήψη ξεσμάτων και μικρών τεμαχιδίων από τον προσβεβλημένο όνυχα. Η λήψη γινόταν με αποστειρωμένα εργαλεία (ξέστρο, νυχοκόπτη, αντικειμενοφόρο πλάκα), έτσι ώστε να μην υπάρχει κίνδυνος επιμόλυνσης του εξεταστέου υλικού. Το δείγμα λαμβάνονταν, όσο το δυνατό εγγύτερα στο όριο της προσβεβλημένης περιοχής κι όχι από περιοχές όπου υπήρχε μόνο νεκρή κυτταρίνη, καθώς σε αυτές υπήρχε μικρή πιθανότητα να βρεθεί ο υπεύθυνος μύκητας. Όταν είχαν προσβληθεί πολλοί όνυχες, η λήψη του δείγματος γινόταν από το σημείο που ήταν πιο εύκολη η πρόσβαση και από την περιοχή μεταξύ υγιούς και προσβεβλημένου σημείου του όνυχα (Tan C S et al, 1994).

B) Περαιτέρω κατάτμηση των τεμαχιδίων των ονύχων, τα οποία χρησιμοποιούνταν για την εφαρμογή των κλασικών μεθόδων διάγνωσης με άμεση μικροσκόπηση και καλλιέργεια. Ταυτόχρονα, τρία τεμαχίδια των ονύχων διατηρούνταν στο ψυγείο (4°C), μέχρι τη διαδικασία της εκχύλισης που αναλύεται παρακάτω.

Η διάγνωση των παραπάνω δειγμάτων σε θετικά και αρνητικά έγινε με κλασικές τεχνικές, ακολουθώντας την παρακάτω διαδικασία:

#### **A) Μικροσκόπηση**

Η άμεση μικροσκόπηση ρινισμάτων ονύχων πραγματοποιήθηκε μετά από επεξεργασία με διάλυμα KOH 15%. Μικρά τεμαχίδια του όνυχα τοποθετούνταν στην επιφάνεια αντικειμενοφόρου πλάκας, εμβαπτίζονταν σε μικρή ποσότητα διαλύματος KOH και καλύπτονταν με μία καλυπτρίδα. Ακολουθούσε επώαση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος ή σε επωαστικό κλίβανο (37°C), για χρονικό διάστημα περίπου μίας ώρας. Το διάλυμα KOH, καθώς και η επώαση βοηθούν στη διαύγαση της κερατίνης, η

οποία αποτελεί κύριο στοιχείο του όνυχα. Με τη διαδικασία αυτή τα στοιχεία του μύκητα παραμένουν ανέπαφα και μπορούμε να τα παρατηρήσουμε στο μικροσκόπιο (Petrini and Rosen, 2002).

## **B) Καλλιέργεια**

Η καλλιέργεια ξεσμάτων και τεμαχιδίων ονύχων (νύξη κομματιού) πραγματοποιούνταν σε δύο τρυβλία με ειδικά θρεπτικά υποστρώματα:

- Το ένα τρυβλίο περιείχε **Sabouraud Dextrose agar (SDA)** με χλωραμφενικόλη (0,5gr/L). Το θρεπτικό αυτό υλικό περιέχει πεπτόνη, δεξτρόζη, άγαρ και απεσταγμένο νερό και είναι κατάλληλο για την καλλιέργεια και την απομόνωση των μυκήτων, οι οποίοι απαιτούν πλούσιο υλικό, με μεγάλη περιεκτικότητα σε αζωτούχες ενώσεις. Η χλωραμφενικόλη είναι αντιβιοτικό το οποίο εμποδίζει την ανάπτυξη των Gram θετικών και Gram αρνητικών βακτηρίων.
- Το δεύτερο τρυβλίο περιείχε **Dermatophyte test Medium agar (DTMB)**, θρεπτικό υλικό ελέγχου και ταυτοποίησης των δερματόφυτων. Περιέχει πεπτόνη, δεξτρόζη, άγαρ, απεσταγμένο νερό, ερυθρό της φαινόλης, κυκλοεξιμίδη (ακτιδιόνη, 0,5gr/L) και χλωραμφενικόλη (0,05gr/L).

Η ανάπτυξη δερματόφυτων προκαλεί την αλλαγή του χρώματος του άγαρ, από πορτοκαλί- κίτρινο σε ερυθρό, μέσω της αλκαλοποίησης του υλικού, παρουσία ερυθρού της φαινόλης, ως δείκτη. Η ακτιδιόνη που περιέχεται στο υλικό αναστέλλει την ανάπτυξη των περισσότερων σαπροφυτικών μυκήτων (Μιχαήλογλου-Φραγκούλη, 2009).

- Στη συνέχεια τα δύο τρυβλία επωάζονταν στους 30°C, για δύο ως τρεις εβδομάδες και ελέγχονταν, δύο φορές την εβδομάδα, για τυχόν ανάπτυξη των μυκήτων σε αυτά. Η *Candida* αναπτύσσεται συνήθως μέσα σε μία εβδομάδα, ενώ τα δερματόφυτα και οι σαπροφυτικοί μύκητες σε διάστημα 15-20 ημερών.

- Ακολουθούσε ανακαλλιέργεια, εφόσον υπήρχαν ενδείξεις για ανάπτυξη δερματόφυτου, (τόσο στη μικροσκοπική εξέταση όσο και στην καλλιέργεια στα παραπάνω θρεπτικά υποστρώματα) και εφόσον χρειαζόταν σε **Potato dextrose agar (PDA)**. Το PDA αποτελείται από εκχύλισμα πατάτας, γλυκόζη, άγαρ και απεσταγμένο νερό. Πρόκειται για υλικό το οποίο, καθώς είναι πτωχότερο του SDA σε γλυκόζη, ευνοεί τη σπορογονία πολλών μυκήτων και βοηθά στην ταυτοποίηση αυτών (Μπίμπαση και Τσουμπλέκη, 2010)

- Σε περίπτωση ανάπτυξης **ζυμομύκητα** πχ *Candida*, ακολουθούσε ταυτοποίηση με τη **δοκιμασία παραγωγής βλαστικού σωλήνα** (Germ tube test). Η δοκιμασία αυτή περιλαμβάνει την ενοφθάλμιση μικρής ποσότητας από την καλλιέργεια του μύκητα σε 100-200μl ορού αίματος υγιούς ανθρώπου. Ακολουθεί επώαση στους 37°C για δύο ώρες. Στη συνέχεια ακολουθεί παρατήρηση στο μικροσκόπιο νωπού παρασκευάσματος (μικρής σταγόνας), για να διαπιστωθεί εάν έχει εκβλαστήσει ή όχι, ο μύκητας. Η *Candida albicans* δίνει θετική τη δοκιμασία του βλαστικού σωλήνα (Gow, 1997).

Επίσης, πραγματοποιούταν ανακαλλιέργεια της *Candida* σε **CHROMagar**, ένα εκλεκτικό χρωμογόνο υλικό, για την απομόνωση και ταυτοποίηση ορισμένων ειδών του γένους *Candida*. Τα βασικά συστατικά του είναι πεπτόνη, γλυκόζη και διάφορα χρωμογόνα προϊόντα. Είναι πολύ χρήσιμο υλικό, για την ανίχνευση μικτών πληθυσμών ζυμομυκήτων, από κλινικά δείγματα. Στο υλικό αυτό τα συνηθέστερα παθογόνα είδη *Candida* παράγουν χαρακτηριστικό χρώμα, όπως η *Candida albicans*, που παράγει πράσινο χρώμα, από υποκίτρινο που είναι το υλικό αυτό. Η επώαση γίνεται στους 35°C για 36-48 ώρες (Larone, 2002). Για την τελική ταυτοποίηση του ζυμομύκητα χρησιμοποιήθηκε το API ID32C, το οποίο αποτελεί ένα προτυποποιημένο σύστημα, για την ταυτοποίηση ζυμών, χρησιμοποιώντας 32 εξετάσεις αφομοίωσης υδατανθράκων και βασίζεται σε μία ευρεία βάση δεδομένων.

- Σε περίπτωση ανάπτυξης **νηματοειδών μυκήτων**, σημαντικό ρόλο έπαιξε η παραγωγή έντονου ερυθρού χρώματος στο Dermatophyte test medium (DTMB), που σήμαινε την πιθανή παρουσία δερματοφυτικού μύκητα, δηλαδή *Trichophyton*, *Epidermophyton* ή *Microsporum*.

Ακολουθούσε άμεσο παρασκεύασμα από την καλλιέργεια, με τη χρήση μικροβιολογικού κρίκου ή κολλητικής ταινίας, πάνω σε αντικειμενοφόρο πλάκα, στην οποία τοποθετήθηκε μία σταγόνα γαλακτοφαινόλης με κυανούν του βάμβακος. Η χρωστική αυτή αδρανοποιεί, ενώ ταυτόχρονα χρωματίζει τις υφές και τα κονίδια του μύκητα, τα οποία φαίνονται κυανά κατά τη μικροσκόπηση.

Η μορφολογική ταυτοποίηση του μύκητα γινόταν με τη χρήση κατάλληλων μορφολογικών αλγόριθμων (κλειδών).

- Για την αξιολόγηση των **μη δερματοφυτικών – νηματοειδών μυκήτων** πχ. *Aspergillus*, *Fusarium*, *Acremonium*, *Scybalidium*, *Alternaria spp* κá, ακολουθούσε ανακαλλιέργεια, σε Malt extract agar (MEA) και σε Czapek dox agar.

Το Malt extract agar είναι ένα μη εκλεκτικό υλικό, περιέχει εκχύλισμα βύνης και είναι κατάλληλο για την καλή και γρήγορη ανάπτυξη των περισσότερων μυκήτων (Davies, 1998).

Το Czapek dox agar αποτελείται από μείγμα ανόργανων αλάτων, σακχαρόζης και άγαρ. Χρησιμοποιείται στις καλλιέργειες μυκήτων, ειδικά για την καλλιέργεια των ασπεργίλλων και είναι το προτεινόμενο υλικό για την ταυτοποίηση τους (Kang et al, 2013).

Η συνολική ταυτοποίηση γινόταν επίσης με τη χρήση των μορφολογικών αλγόριθμων.

Μετά το διαχωρισμό των δειγμάτων σε θετικά και αρνητικά δείγματα, βάση των κλασικών τεχνικών που εφαρμόστηκαν και της διάγνωσης και ταυτοποίησης των ονυχομυκητιάσεων, σε όλα τα θετικά δείγματα καθώς και σε ορισμένα αρνητικά (μάρτυρες) ακολούθησε η διαδικασία της εκχύλισης των τεμαχιδίων που είχαν διατηρηθεί στους 4°C.

Τα δείγματα χωρίστηκαν στις παρακάτω:

1. Η πρώτη ομάδα αποτελούνταν από 31 δείγματα ασθενών με διαγνωσμένη και ταυτοποιημένη ονυχομυκητίαση
2. Η δεύτερη ομάδα αποτελούνταν από 14 δείγματα ατόμων με αρνητικά αποτελέσματα ονυχομυκητίασης.

## **2.2 Μέθοδοι εκχύλισης**

Μετά την ολοκλήρωση των κλασικών τεχνικών για τη διάγνωση της ονυχομυκητίασης, ακολούθησε η σύγκριση τριών διαφορετικών πρωτοκόλλων (Prot1, Prot2 και Prot3), με σκοπό την επιλογή του καταλληλότερου προς χρήση σε εφαρμογή μοριακών μεθόδων ταυτοποίησης και διάγνωσης.

Η επιλογή χρήσης των παρακάτω περιγραφόμενων τριών πρωτοκόλλων πραγματοποιήθηκε μετά από προσπάθεια εύρεσης των πιο αντιπροσωπευτικών πρωτοκόλλων, σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία. Τα δύο από τα τρία περιλαμβάνουν εμπορικά κιτ (Prot1, Prot3) με τροποποιήσεις, ενώ στο δεύτερο πρωτόκολλο (Prot2) εφαρμόστηκε μέθοδος από τη Δανία κατοχυρωμένη με διεθνή αριθμό πατέντας.

Αρχικά πραγματοποιήθηκε καταμέτρηση του βάρους (gr) και του μήκους (mm) του κάθε τεμαχιδίου όνυχα από το κλινικό δείγμα με σκοπό να χρησιμοποιηθούν

δείγματα παρόμοιων διαστάσεων σε όλα τα εξεταζόμενα πρωτόκολλα. (πίνακας με βάρη και μήκη). Το κάθε δείγμα τεμαχιζόταν σε αποστειρωμένο τρυβλίο, χρησιμοποιώντας κατάλληλα εργαλεία (ψαλίδι και λαβίδα), τα οποία είχαν αποστειρωθεί μέχρι πυράκτωσης πάνω από τη φλόγα. Κατά την κοπή του δείγματος το τρυβλίο καλύπτονταν με το καπάκι του, έτσι ώστε να μην πεταχτεί το υλικό και μειωθεί η συγκεκριμένη ποσότητα του δείγματος (gr). Χρησιμοποιήθηκαν αποστειρωμένα ρύγχη για τους απαραίτητους χειρισμούς με τις πιπέτες ή και ρύγχη με φίλτρο (aerosol-resistant pipette tips). Επίσης όλα τα σωληνάρια ήταν αποστειρωμένα.

### **Πρωτόκολλο 1 (Prot1)**

Το πρωτόκολλο αυτό βασίστηκε στο εξειδικευμένο πρωτόκολλο εκχύλισης DNA από κλινικό δείγμα (όνυχα), το οποίο εφαρμόστηκε από τους Tahir & Watson (1995), τροποποιημένο με ένα επιπλέον στάδιο καθαρισμού (με χρήση στηλών εμπορικού κιτ), μετά την ενζυματική διάσπαση με πρωτεϊνάση K (Qiagen® GmbH, Germany) και dithiothreitol DTT (Sigma-Aldrich Co, USA.), (Arabatzis et al, 2007).

Το κάθε τεμαχίδιο όνυχα τοποθετήθηκε σε σωληνάριο eppendorf (1,5ml) που περιείχε **200 µl ρυθμιστικού διαλύματος- buffer** με σύσταση:

1. 10mmol/L Tris-HCl σε PH=8
2. 10mmol/L Na<sub>2</sub>EDTA (ethylenediamin tetraacetic acid)
3. 100mmol/L NaCl
4. 2% SDS (sodium dodecyl sulfate)

Το διάλυμα παρασκευάστηκε με νερό μοριακής βιολογίας (DNases, RNases free water, sterilization grade filtrated 0,22µm pore size filter) και αποστειρώθηκε στο αυτόκαυστο.

- Στο παραπάνω ρυθμιστικό διάλυμα προστέθηκε **15µl πρωτεϊνάσης K (Qiagen®)**, συγκέντρωσης 20mg/ml και **20µl dithiothreitol DTT (Sigma)**, από διάλυμα 1M έτοιμο προς χρήση.
- Ακολούθησε επώαση του δείγματος στους 56°C σε υδατόλουτρο για 14-18 ώρες (overnight).
- Στη συνέχεια προστέθηκαν **10µl πρωτεϊνάσης K** και το δείγμα επώαστηκε στους 56°C σε υδατόλουτρο για άλλες 3 ώρες.
- Μετά την παραπάνω διαδικασία εφαρμόστηκε το κιτ **εκχύλισης NucleoSpin® Blood Quick Pure extraction kit (Macherey-Nagel GmbH&Co.KG, Germany)**, με μικρές τροποποιήσεις ως εξής:

Το ρυθμιστικό διάλυμα BE που περιλαμβάνεται στο κιτ θερμαίνεται μέχρι να χρησιμοποιηθεί στους 70°C, σε υδατόλουτρο.

- Σε κάθε σωληνάριο τύπου erppendorf προστείνονται 25μl πρωτεΐνάσης K και 200μl Lysis buffer BQ που περιλαμβάνονται στο κιτ.
- Ακολουθεί ανάδευση για 15-20sec (vortex) και επώαση στους 70°C σε υδατόλουτρο για 15 λεπτά.
- Το δείγμα φυγοκεντρείται για λίγα δευτερόλεπτα (short-spin).
- Σε κάθε σωληνάριο τύπου erppendorf προστείνονται 200μl αιθανόλης (ethanol, 96-100%).
- Ακολουθεί και πάλι ανάδευση για 15-20sec (vortex) και φυγοκέντρωση για λίγα δευτερόλεπτα (short-spin).
- Το δείγμα τοποθετείται σε στήλες που περιλαμβάνονται στο κιτ.
- Ακολουθεί φυγοκέντρωση αρχικά για 1 λεπτό σε 11000g και στη συνέχεια για 1 λεπτό σε 15000 g.
- Απομακρύνεται το σωληνάριο με το υγρό της φυγοκέντρωσης και η στήλη τοποθετείται σε καινούργιο σωληνάριο.
- Προστίθενται 350 μl Buffer BQ2 που περιλαμβάνεται στο κιτ.
- Φυγοκέντρωση για 3 λεπτά σε 11000 g.
- Προστίθενται εκ νέου 200μl BQ2.
- Φυγοκέντρωση ξανά για 3 λεπτά σε 11000 g.
- Απόρριψη του σωληναρίου (tube) με το υγρό φυγοκέντρωσης και τοποθέτηση της στήλης σε ένα καινούργιο σωληνάριο τύπου erppendorf.
- Προσθήκη **50 μl Elution Buffer (BE)**, ρυθμιστικό διάλυμα, το οποίο όπως έχει αναφερθεί παραπάνω είναι προθερμασμένο στο υδατόλουτρο στους 70°C. Τα 50μl ρυθμιστικού διαλύματος BE προστέθηκαν στη στήλη διαδοχικά, 2 φορές χ 25μl. Κάθε φορά γίνεται επώαση 3min σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκέντρωση για 1min σε 11000g. Η τροποποίηση αυτή στο συγκεκριμένο στάδιο του πρωτοκόλλου, δηλαδή της διαδοχικής χρήσης του συνολικού όγκου των 50μl Elution Buffer ως 2χ25 μl, πετυχαίνει μεγαλύτερη ανάκτηση DNA και μεγαλύτερη συνολικά συγκέντρωση έκλουσης από τη στήλη.
- Τέλος απόρριψη της στήλης του κιτ και διατήρηση των **50μl** που αποτελούν το τελικό προϊόν της εκχύλισης, σε καινούργιο σωληνάριο, στους -20°C μέχρι τη χρησιμοποίησή τους.

## Πρωτόκολλο 2 (Prot2)

Στο πρωτόκολλο αυτό εφαρμόστηκε η προτεινόμενη μεθοδολογία της Μονάδας Μυκητολογίας και Παρασιτολογίας του Ινστιτούτου Statens της Κοπεγχάγης της Δανίας (Brillowska-Dabrowska et al, 2007) κατατεθειμένη ως διεθνής πατέντα με αριθμό WO/2006/133701.

Χρησιμοποιήθηκε το προτεινόμενο ρυθμιστικό διάλυμα και θέρμανση στους 95°C για 10 λεπτά.

- Μετά την καταμέτρηση του βάρους (gr) και μήκους (mm) των τεμαχιδίων του κλινικού δείγματος, κάθε τεμαχίδιο τοποθετήθηκε σε σωληνάριο τύπου erpendorf μαζί με **100μl ρυθμιστικού διαλύματος** το οποίο αποτελείται από:

1. 60mmol/L NaHCO<sub>3</sub>
2. 250mmol/L KCl
3. 50mmol/L Tris- hydroxymethyl aminomethane (Trizma).

Το επιτρεπτό pH του λυτικού αυτού διαλύματος (lysis buffer) είναι μεταξύ 7.0 και 12, με βέλτιστο pH το 9.5. Η παρασκευή του διαλύματος έγινε με τη χρήση νερού μοριακής βιολογίας (DNases, RNases free water, sterilization grade filtrated 0,22μm pore size filter) και η επιπλέον αποστείρωση του έγινε με φίλτρα 0.20μm για χρήση σε σύριγγα.

Εκτός από το λυτικό διάλυμα προστέθηκαν και **100μl BSA 2% (λευκωματίνη βόειου ορού), (Sigma-Aldrich Co, USA)**, που αποτελεί ένα σταθεροποιητικό διάλυμα. Παρασκευάστηκε και αυτό σε νερό μοριακής βιολογίας και αποστειρώθηκε με τη χρήση φίλτρων όπως και το ρυθμιστικό διάλυμα. Για τη διάλυσή του απαιτήθηκε θέρμανση σε υδατόλουτρο. Η αποστείρωση του απαγορεύεται να γίνει σε υπεριώδη ακτινοβολία UV, γιατί αυτό θα προκαλέσει την καταστροφή των πρωτεϊνών του ορού.

- Μετά την προσθήκη του ρυθμιστικού διαλύματος και της λευκωματίνης, το σωληνάριο τοποθετήθηκε σε θερμαινόμενη πλάκα στους 95°C για 10 λεπτά. Ο χρόνος θέρμανσης δεν επιτρέπεται να ξεπερνά τα 10 λεπτά γιατί υπάρχει κίνδυνος καταστροφής του γενετικού υλικού.

- Στη συνέχεια ακολούθησε ανάδευση του δείγματος (vortex), για αρκετή ώρα ( περίπου 15 λεπτά) στο σύστημα έντονης ανάδευσης TurboMix™, Vortex-Genie®disrupting system.

- Διατήρηση του υπερκείμενου (περίπου **200 μl**), δηλαδή του τελικού προϊόντος της εκχύλισης, σε καινούργιο σωληνάριο, στους -20°C μέχρι τη χρησιμοποίησή του.

### Πρωτόκολλο 3 (Prot3)

Στο τελευταίο πρωτόκολλο, η εκχύλιση του DNA του δείγματος, πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του εμπορικού κιτ DNA IQ™ System, DC6701 (Promega Corporation, USA) για υγρά δείγματα, μετά από σχετική κατάλληλη τροποποίηση. Το πρωτόκολλο αυτό στηρίχτηκε στο μαγνητικό διαχωρισμό που πραγματοποιήθηκε με τη χρήση παραμαγνητικής ρητίνης (paramagnetic resin). Τα παραμαγνητικά τεμαχίδια αποτελούνται από σωματίδια διοξειδίου του πυριτίου και έχουν συγγενική σχέση με τα νουκλεϊνικά οξέα του DNA, υπό καθορισμένες συνθήκες. Η δομή των σωματιδίων αυτών και η σύνθεση του διαλύματος που χρησιμοποιείται στην εκχύλιση, καθορίζει την επιλεκτική προσρόφηση νουκλεϊνικών οξέων του DNA. Έτσι η παραμαγνητική ρητίνη έχει καθορισμένη δυνατότητα δέσμευσης DNA. (Paul Otto, Promega Corporation, MagneSil™ Paramagnetic Particles: Magnetics for DNA Purification).

Πριν από την εφαρμογή του εμπορικού κιτ το δείγμα ομογενοποιήθηκε με τη προσθήκη πρωτεΐνης K (Qiagen®), γυάλινων σφαιριδίων (Sigma-Aldrich), υπερκαθαρού νερού ελεύθερου νουκλεασών και ισχυρής μηχανικής ανάδευσης. (Lewis et al, 2006).

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι η παρακάτω:

- Το τεμαχίδιο του δείγματος τοποθετήθηκε σε ένα σωληνάριο τύπου eppendorf (1,5ml) και προστέθηκαν **50μl πρωτεΐνης K (Qiagen®)** και μικρή ποσότητα γυάλινων σφαιριδίων (Sigma-Aldrich, 710-1.180μm), αποστειρωμένων και καρτεργασμένων σε όξινο περιβάλλον.
- Επίσης προστέθηκαν **50μl νερό μοριακής βιολογίας** (DNases, RNases free water, sterilization grade filtrated 0,22 μm pore size filter), το οποίο είχε επιπλέον αποστειρωθεί με υπεριώδη ακτινοβολία UV πριν τη χρήση του.
- Ακολούθησε έντονη ανάδευση (TurboMix™, Vortex-Genie® disrupting system) για 15 λεπτά.
- Στη συνέχεια το δείγμα επώαστηκε στους 56°C σε υδατόλουτρο για 14-18 ώρες (overnight).
- Ακολούθησε και πάλι έντονη ανάδευση με τον ίδιο τρόπο για 10 λεπτά και φυγοκέντρηση για λίγα δευτερόλεπτα (short-spin).
- Μετά τη διαδικασία ομογενοποίησης του δείγματος ακολούθησε η εφαρμογή του εμπορικού κιτ: **DNA IQ™ System, DC6701.**



Τα υλικά που χρειάστηκαν για την εφαρμογή του κιτ και δεν περιλαμβάνονταν ήταν:

1. 95-100% αιθανόλη
2. ισοπροπυλική αλκοόλη
3. υδατόλουτρο στους 65°C
4. σωληνάρια τύπου eppendorf (1,5ml)
5. στατώ μαγνητικού διαχωρισμού (Magnesphere technology magnetic separation stand)
6. 1M DTT dithiothreitol
7. νερό μοριακής βιολογίας (DNases, RNases free water, sterilization grade filtrated 0,22μm pore size filter)

ενώ περιείχε:

1. 0,9ml ρητίνη (resin)
2. 40ml λυτικό διάλυμα (Lysis buffer)
3. 30ml διάλυμα έκπλυσης (2xWash buffer)
4. 15ml Elution buffer

Παρασκευάστηκε το Prepared Lysis buffer, το οποίο αποτελείται από dithiothreitol (DTT) 1M και το παρεχόμενο lysis buffer (1μl dithiothreitol- DTT για 100μl Lysis buffer) σε διπλάσια ποσότητα και μοιράστηκε σε δύο σωληνάρια τύπου eppendorf.

Σε ένα σωληνάριο τύπου eppendorf προστέθηκε ρητίνη (resin) και παρασκευάστηκε το resin/prepared lysis buffer (7μl resin για 93μl prepared Lysis buffer).

Επίσης το διάλυμα έκπλυσης (Wash buffer) αναμείχθηκε με 15ml αιθανόλη και 15ml ισοπροπυλική αλκοόλη.

Μετά από την παρασκευή των αντιδραστηρίων χρησιμοποιήθηκαν καινούργια αποστειρωμένα σωληνάρια για κάθε δείγμα και εφαρμόστηκαν τα στάδια του κιτ:

- Προσθήκη σε κάθε σωληνάριο 40μl δείγματος και 100μl resin/Prepared Lysis buffer το οποίο προηγουμένως είχε αναδευθεί (vortex) για 3 δευτερόλεπτα σε υψηλή ταχύτητα
- Ανάδευση (vortex) ξανά για 3 δευτερόλεπτα σε υψηλή ταχύτητα.
- Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά και κάθε 1 λεπτό ανάδευση (vortex) του μείγματος για 3 δευτερόλεπτα.
- Ανάδευση (vortex) ξανά για 2 δευτερόλεπτα σε υψηλή ταχύτητα.
- Τοποθέτηση των σωληναρίων σε μαγνητικό στατώ (magnetic stand), με σκοπό να γίνει ο μαγνητικός διαχωρισμός με τη χρήση ρητίνης, όπως αναφέρθηκε παραπάνω.
- Απόρριψη του υπερκειμένου που προέκυψε μετά το μαγνητικό διαχωρισμό, δηλαδή 140μl.

- Προσθήκη 100μl Prepared Lysis buffer και ανάδευση (vortex) του μείγματος για 2 δευτερόλεπτα.
- Τοποθέτηση και πάλι του σωληναρίου στο μαγνητικό στατώ και απόρριψη του υπερκειμένου, δηλαδή των 100μl.
- Προσθήκη 100μl Prepared wash και ανάδευση (vortex) του μείγματος για 2 δευτερόλεπτα.
- Απόρριψη του Prepared wash που προστέθηκε και επανάληψη για δύο επιπλέον φορές του πλυσίματος, συνολικά τρεις φορές.
- Τοποθέτηση στο μαγνητικό στατώ με ανοιχτό το καπάκι του σωληναρίου και ξήρανση της ρητίνης, για 10 λεπτά (μέγιστος χρόνος).
- Προσθήκη 70μl Elution buffer.
- Ανάδευση (vortex) για 2 δευτερόλεπτα σε υψηλή ταχύτητα.
- Επώαση στους 65°C σε υδατόλουτρο για 5 λεπτά.
- Ανάδευση (vortex) για 2 δευτερόλεπτα σε υψηλή ταχύτητα.
- Τοποθέτηση του σωληναρίου στο μαγνητικό στατώ (το δείγμα πρέπει να τοποθετηθεί θερμασμένο αμέσως μετά το υδατόλουτρο, στο μαγνητικό στατώ έτσι ώστε να μη μειωθεί η ανάκτηση (yield) του DNA.
- Διατήρηση του υπερκειμένου (περίπου **70 μl**), δηλαδή του τελικού προϊόντος της εκχύλισης, σε καινούργιο σωληνάριο, στους -20°C μέχρι τη χρησιμοποίησή του.

### **2.3. Φωτομέτρηση του τελικού προϊόντος της εκχύλισης**

Η συγκέντρωση (concentration) του DNA του δείγματος στο τελικό προϊόν της κάθε εκχύλισης, η ανάκτηση (yield) του DNA και η καθαρότητα (purity) του DNA υπολογίστηκαν με τη χρήση φασματοφωτόμετρου (spectrophotometer Hitachi Model U-1900UV-Vis, Tokyo, Japan), με δυνατότητα μέτρησης σε υπεριώδη μήκη κύματος.

- Αρχικά αναδεύτηκε (vortex) το τελικό προϊόν και φυγοκεντρήθηκε για λίγα δευτερόλεπτα (short-spin). Η φυγοκέντρηση έγινε για την αποφυγή ύπαρξης DNA στο καπάκι του σωληναρίου.
- Στη συνέχεια αραιώθηκε το τελικό προϊόν της εκχύλισης, σε αναλογία 1/10 με νερό μοριακής βιολογίας, σε κυβέττες φωτομέτρησης (135μl νερό μοριακής βιολογίας και 15μl τελικού προϊόντος εκχύλισης).

- Στο τελικό προϊόν του κάθε πρωτοκόλλου και για κάθε δείγμα ξεχωριστά, πραγματοποιήθηκαν δύο μετρήσεις σε διαφορετικά μήκη κύματος (260nm και 280nm) και λήφθηκαν δύο διαφορετικές απορροφήσεις: OD260 και OD280.

## 2.4. Παράμετροι που εκτιμηθήκαν

Η αξιολόγηση των τριών διαφορετικών πρωτοκόλλων εκχύλισης γενετικού υλικού έγινε με βάση τις παρακάτω παραμέτρους:

**1) Την καθαρότητα του παραγόμενου προϊόντος (DNA purity)**, η οποία ορίζεται με το λόγο των δύο διαφορετικών απορροφήσεων OD260 και OD280, για το κάθε δείγμα σε κάθε πρωτόκολλο (ratio OD260/OD280).

Το διάλυμα δίκλωνου DNA 50μg/ml έχει οπτική πυκνότητα 1,0 στα 260nm και λόγο OD260/OD280 1,8. Όταν υπάρχει επιμόλυνση του δείγματος με πρωτεΐνες ή φαινόλη ο λόγος OD260/OD280 είναι σημαντικά μικρότερος από 1,8. Επίσης όταν υπάρχει επιμόλυνση του δείγματος με RNA ο λόγος OD260/OD280 είναι μεγαλύτερος από 1,8. Το καθαρό RNA έχει OD260/OD280 περίπου 2,0.

[Ποσοτικοποίηση του DNA. Τμήμα Μυκητολογίας. Εθνικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Εργαστήριο Μικροβιολογίας. Διευθυντής Καθηγητής Ν.Ι.Λεγάκης.]

Στα 260nm η απορρόφηση αντιπροσωπεύει τα νουκλεοτίδια του δείγματος, ενώ στα 280nm τις πρωτεΐνες που περιέχονταν σ' αυτό. Άρα ο λόγος OD260/OD280 προσδιορίζει πόσα νουκλεοτίδια υπάρχουν στο δείγμα. Τα νουκλεοτίδια μπορεί να μην είναι μόνο DNA αλλά και RNA και ελεύθερα νουκλεοτίδια.

Όταν ο λόγος OD260/OD280 κυμαίνεται μεταξύ 1,7 έως 2,0 θεωρείται ότι λαμβάνεται προϊόν υψηλής καθαρότητας σε DNA.

**2) Τη συγκέντρωση του παραγόμενου προϊόντος (DNA concentration, μg/ml)**, η οποία προσδιορίζεται από το γινόμενο της τιμής της απορρόφησης στα 260nm επί 50μg/ml (καθώς 50μg/ml DNA έχουν οπτική πυκνότητα 1,0 στα 260nm) επί την αραίωση του παραγόμενου προϊόντος (ήταν 1:10), δηλαδή:

$$\text{Concentration} = \text{OD260} \times 50 \mu\text{g/ml} \times 10.$$

**3) Την ανάκτηση του γενετικού υλικού (DNA), στο συνολικό όγκο του δείγματος, ανά γραμμάριο ιστού (DNA yield mg/gr tissue).**

Η ανάκτηση προσδιορίζεται από το γινόμενο της συγκέντρωσης επί το συνολικό όγκο του δείγματος εκχύλισης δηλαδή:

DNA yield (mg) = DNA Concentration x total sample volume (ml).

Στη συνέχεια γνωρίζοντας το συνολικό βάρος του τεμαχιδίου του όνυχα γίνεται αναγωγή στο 1gr ιστού, με αποτέλεσμα την ανάκτηση ανά γραμμάριο ιστού.

#### **4) Το κόστος εκτέλεσης κάθε πρωτοκόλλου**

Το κόστος του κάθε πρωτοκόλλου υπολογίστηκε βάση των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν καθώς και της ποσότητας αυτών, των αναλώσιμων υλικών (σωληνάρια φυγοκέντρησης, ρύγχοι πιπετών, ρύγχοι με φίλτρα κ.ά) και του κάθε κιτ.

#### **5) Τη χρονική διάρκεια εκτέλεσης κάθε πρωτοκόλλου**

Ο υπολογισμός του χρόνου εκτέλεσης του κάθε πρωτοκόλλου καθορίστηκε από την παρασκευή των αντιδραστηρίων, τον χρόνο επώασης καθώς και το χρόνο φυγοκέντρησης του κάθε δείγματος.

### **2.5. Στατιστική μέθοδος ανάλυσης αποτελεσμάτων**

Ο έλεγχος της προϋπόθεσης της κανονικότητας των δεδομένων έγινε με τη χρήση του τεστ Kolmogorov-Smirnov (test of Normality-Kolmogorov-Smirnov). Λόγω της έλλειψης κανονικής κατανομής η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με τη στατιστική μέθοδο Kruskal-Wallis, ενώ η σύγκριση μεταξύ των ομάδων ανά ζεύγη έγινε με τη δοκιμασία Mann-Whitney test.

Υπολογίστηκαν οι μέσες τιμές και τα τυπικά σφάλματα (SD) για την περιγραφή των δεδομένων και χρησιμοποιήθηκαν τα αντίστοιχα ραβδογράμματα για τη γραφική απεικόνιση των δεδομένων. Το επίπεδο σημαντικότητας ορίστηκε στο  $p \leq 0,05$ . Τα αποτελέσματα της στατιστικής μελέτης εκφράστηκαν ως μέσος όρος  $\pm$  SEM (standard error of the mean).

Για την ανάλυση χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πακέτο STATISTICA 8 (Statsoft Inc, Tulsa OK, USA) και το λογιστικό πακέτο MS Excel.

### **2.6. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction -PCR)**

Όπως είναι γνωστό η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) μας επιτρέπει να πολλαπλασιάσουμε εκθετικά αλληλουχίες βάσεων του DNA. Βασίζεται σε

διαδοχικούς κύκλους αντιγραφής που ξεκινούν από καθορισμένες θέσεις μίας «μήτρας» DNA.

Οι πιο διαδεδομένοι μυκητιακοί γονιδιακοί στόχοι για τις μοριακές προσεγγίσεις στις μυκητιάσεις, βρίσκονται στο ριβοσωμιακό DNA (r DNA). Εκεί περιέχονται ισχυρά διατηρημένες περιοχές, που χωρίζονται από άλλες περισσότερο μεταβλητές, που παρουσιάζουν ειδικές του είδους αλληλουχίες. Αυτές οι περιοχές είναι ιδεώδεις για το σχεδιασμό πανμυκητιακών εκκινητών (primers) ειδικών για το γένος ή το είδος (Blanz et al., 2000).

Μετά την εκχύλιση εφαρμόστηκε πανμυκητιακή PCR (panfungal PCR), βασισμένη στο γονίδιο της 18S περιοχής του ριβοσωμικού DNA, για την απόδειξη ύπαρξης μυκητιακού DNA (Einsele et al, 1997).

Τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν είναι:

- **Ρυθμιστικό διάλυμα (Buffer) 10X** που περιέχει 200mM Tris-HCl και 500 mM KCl.

Από το διάλυμα αυτό απαιτείται διάλυμα συγκέντρωσης 1X για την αντίδραση.

- **Διάλυμα MgCl<sub>2</sub>** συγκέντρωσης 50mM.

Για την αντίδραση χρειάζεται διάλυμα συγκέντρωσης 1,5mM MgCl<sub>2</sub>.

- **Εκκινητές (primers)**, οι οποίοι είναι ολιγονουκλεοτίδια που έχουν σχεδιαστεί ώστε να είναι απόλυτα συμπληρωματικοί στα άκρα των γονιδιακών στόχων της αντίδρασης. Χρησιμοποιήθηκαν οι:

EIN1 (1μM)

EIN2 (1μM)

Η αρχική συγκέντρωση του κάθε εκκινητή είναι 100μmol/L.

- **Μείγμα βάσεων του DNA (dNTPs)**, μείγμα τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοτιδίων, (Invitrogen, CA, USA).

Η επιθυμητή συγκέντρωση του μείγματος στην αντίδραση είναι 0,3mmol/L.

- **Taq DNA recombinant polymerase** – θερμοσταθερή, θερμοανθεκτική, ανασυνδυασμένη- DNA- πολυμεράση, (Invitrogen, CA, USA).

Για την αντίδραση είναι απαραίτητη 1,5U πολυμεράσης συνολικά

- **Νερό μοριακής βιολογίας** (DNases, RNases free water, sterilization grade filtrated 0,22μm pore size filter).

- Όλες οι αντιδράσεις της PCR είναι των 50μl, με 10μl DNA σε κάθε αντίδραση.

Το πρόγραμμα της αντίδρασης ήταν το εξής:

- Αρχικά ένας κύκλος στους 94 °C επί 5 λεπτά.

- Στη συνέχεια σαράντα πέντε (45) κύκλοι ως εξής:
- 94 °C επί 30 δευτερόλεπτα, (αποδιάταξη-denaturation).
- 62 °C επί 1λεπτό, (υβριδισμός, σύνδεση των εκκινητών-annealing).
- 72 °C επί 2 λεπτά, (επιμήκυνση-extention).
- Στο τέλος ένας κύκλος στους 72 °C επί 5 λεπτά (για την τελική επιμήκυνση).

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης έλαβε χώρα σε θερμοκυκλοποιητή (Thermal Cycler) T personal της Biometra®. Ο θερμοκυκλοποιητής διαθέτει την ικανότητα να αυξομειώνει τη θερμοκρασία της αντίδρασης, κάθε λίγα λεπτά ή δευτερόλεπτα, ώστε να επιτρέπεται η σύνθεση νέων τμημάτων DNA.

Η ανίχνευση των τελικών προϊόντων της PCR έγινε με ηλεκτροφόρηση, σε πηκτή αгарόζης 2,5% (L.E. Analytical Grade, Promega USA), με σήμανση με βρωμιούχο αιθίδιο και η απεικόνιση των ταινιών έγινε με τη βοήθεια υπεριώδους ακτινοβολίας-UV.

Επιλέχθηκαν οχτώ θετικά δείγματα και δύο αρνητικά δείγματα και από τα τρία πρωτόκολλα εκχύλισης, δηλαδή συνολικά έγιναν τριάντα προσδιορισμοί με τη συγκεκριμένη PCR.

Μετά από δοκιμές βρέθηκε ότι για τη βέλτιστη λειτουργία της αντίδρασης η συγκέντρωση του κάθε δείγματος πρέπει να είναι 13-14 ng/μl, οπότε τα δείγματα μετά τη φωτομέτρηση αραιώθηκαν ανάλογα με νερό μοριακής βιολογίας.

### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

#### 3.1. Δημογραφικά στοιχεία

Συγκεντρώθηκαν δημογραφικά στοιχεία συνολικά για 45 δείγματα, τα οποία στη συνέχεια, με βάση τα αποτελέσματα των κλασικών τεχνικών (μικροσκοπήση-καλλιέργεια), χωρίστηκαν σε θετικά (31) και αρνητικά (14). Συγκεκριμένα καταγράφηκε η ηλικία, το φύλο, το επάγγελμα, η ύπαρξη κατοικίδιου ζώου, η κλινική εικόνα του όνυχα καθώς και ο αιτιολογικός παράγοντας της ονυχομυκητίασης (Πίνακας 1 και 2, Παράρτημα 1, σελ. 58 - 60). Σύμφωνα με την καταγραφή των στοιχείων το μεγαλύτερο ποσοστό των ασθενών (74%) ήταν ηλικίας άνω των 50 ετών. Συγκεκριμένα στην ηλικία 50-60 ετών βρισκόταν το 32% των ασθενών, μεταξύ 60-70 ετών το 6,5%, ενώ από την ηλικία άνω των 70 ήταν το 35,5%. Αντίθετα το ποσοστό των ασθενών σε ηλικία μικρότερη των 30 ετών ήταν μόνο 22,5%. Στο σύνολο των θετικών δειγμάτων οι 18 (58,0%) ασθενείς ήταν θήλεις και οι 13 (41,9%) άρρενες. Όσον αφορά στην επαγγελματική απασχόληση τους το μεγαλύτερο ποσοστό αυτών ήταν συνταξιούχοι (35,5%), γεγονός που έχει άμεση σχέση με την ηλικία των ασθενών, ενώ ένα πολύ μικρότερο ποσοστό (6,5%) ασχολούνταν με τα οικιακά. Η παρουσία κατοικίδιου ζώου φάνηκε ότι στο δείγμα της μελέτης δε συνδέθηκε με την ονυχομυκητίαση, δεδομένου ότι μόνο οι 2 (6,5%) από τους 31 ασθενείς είχαν κατοικίδιο ζώο.

Η κλινική εικόνα των ονύχων των ασθενών που προσήλθαν στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας και στους οποίους διαπιστώθηκε μικροσκοπικά και καλλιεργητικά ονυχομυκητίαση, περιελάμβανε στο μεγαλύτερο ποσοστό (35,48%) υπονύχια υπερκεράτωση του όνυχα, αλλαγή της χροιάς του (16,12%) καθώς και ονυχόλυση (9,67%).

Επίσης, όσον αφορά στην τραυματική ονυχία (19,35%) καθώς και στην ψωριασική ονυχία (3,22%), αποτέλεσαν μικρό ποσοστό των θετικών δειγμάτων των ονυχομυκητιάσεων. Τέλος η ύπαρξη ονυχοδυστροφίας, η οποία αποτελεί την τελική κατάληξη όλων των κλινικών μορφών των ονυχομυκητιάσεων, ανευρέθηκε σε πολύ μικρό ποσοστό (6,45%).

Από τα 31 θετικά δείγματα τα 21 (67,74%) ήταν δείγματα ονύχων ποδιών, ενώ τα 10 (32,25%) δείγματα ονύχων χεριών. Τα είδη των μυκήτων που απομονώθηκαν από τα δείγματα των ονύχων των ποδιών ήταν: οι νηματοειδείς δερματοφυτικοί μύκητες

(*Trichophyton sp.*) στην πλειοψηφία των δειγμάτων (71,42%) και σε μικρότερο ποσοστό οι ζυμομύκητες (*Candida sp.*) (14,28%) και οι νηματοειδείς μη δερματοφυτικοί μύκητες (*Scopulariopsis sp.*, *Acremonium sp.*) με το ίδιο ποσοστό (14,28%). Αντίθετα από τα δείγματα ονύχων χεριών απομονώθηκαν στο μεγαλύτερο ποσοστό οι ζυμομύκητες (70%) και σε μικρότερο ποσοστό οι νηματοειδείς δερματοφυτικοί μύκητες (30%).

### 3.2. Η καθαρότητα του DNA

Ο λόγος της απορρόφησης, του τελικού προϊόντος της εκχύλισης, στα 260nm προς την απορρόφηση του στα 280nm, για το κάθε δείγμα και σε κάθε πρωτόκολλο, χρησιμοποιήθηκε προκειμένου να εκτιμηθεί η καθαρότητα του DNA. Σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας, στο σύνολο των θετικών και αρνητικών δειγμάτων, το πρωτόκολλο 3 (Prot3) εμφάνισε την υψηλότερη τιμή καθαρότητας ( $1,92 \pm 0,72$ ) σε σχέση με τα άλλα δύο εξεταζόμενα πρωτόκολλα, πρωτόκολλο 1 (Prot1) ( $1,28 \pm 0,03$ ) και πρωτόκολλο 2 (Prot2) ( $1,03 \pm 0,03$ ) με στατιστικά σημαντική διαφορά  $p < 0,001$ . Επίσης, βρέθηκε ότι στατιστικά σημαντική διαφορά υπήρχε και μεταξύ του πρωτοκόλλου 1 (Pr1) και του πρωτοκόλλου 2 (Pr2)  $p < 0,001$ .

Έτσι, με βάση τα αποτελέσματά μας, σε ότι αφορά στην καθαρότητα του DNA η κατάταξη των πρωτοκόλλων ήταν: (Prot3) > (Prot1) > (Prot2). Σύγκριση του λόγου OD 260/280 των τριών πρωτοκόλλων πραγματοποιήθηκε επίσης ξεχωριστά για τα θετικά και τα αρνητικά δείγματα. Η στατιστική ανάλυση επιβεβαίωσε τα παραπάνω αποτελέσματα και έδειξε ότι το πρωτόκολλο 3 εμφάνισε σημαντικά υψηλότερη τιμή καθαρότητας, τόσο στα θετικά, όσο και στα αρνητικά δείγματα, σε σύγκριση με τα άλλα δύο πρωτόκολλα (Pr1 και Pr2),  $p < 0,001$ . (Σχήμα 1, Παράρτημα 2, σελ. 62)

### 3.3. Η συγκέντρωση του DNA

Εκτός από την καθαρότητα, σημαντική παράμετρος για την αξιολόγηση των τριών πρωτοκόλλων αποτέλεσε η συγκέντρωση του DNA του τελικού προϊόντος της εκχύλισης. Σύμφωνα με τη στατιστική ανάλυση, στο σύνολο των δειγμάτων, η συγκέντρωση του DNA εμφάνισε σημαντική διαφορά μεταξύ των τριών πρωτοκόλλων



εκχύλισης. Έτσι, το πρωτόκολλο 2 (Prot2) παρουσίασε την υψηλότερη συγκέντρωση ( $367,00 \pm 31,66$ ) σε σχέση με το πρωτόκολλο 1 (Prot1,  $110,83 \pm 8,36$ ) και το πρωτόκολλο 3 (Prot3,  $70,57 \pm 2,82$ ),  $p < 0,001$ . Επίσης, στατιστικά σημαντικά αυξημένη συγκέντρωση του DNA βρέθηκε στο πρωτόκολλο 1 (Prot1) σε σύγκριση με το πρωτόκολλο 3 (Prot3),  $p < 0,001$ . Στη συγκεκριμένη παράμετρο η κατάταξη των πρωτοκόλλων ήταν: (Prot2) > (Prot1) > (Prot3). Σύγκριση της συγκέντρωσης του DNA μεταξύ των τριών πρωτοκόλλων πραγματοποιήθηκε και ξεχωριστά για τα θετικά και τα αρνητικά δείγματα. Η στατιστική ανάλυση έδειξε ότι η συγκέντρωση του DNA ήταν σημαντικά μεγαλύτερη στο Prot2 σε σύγκριση με το Prot1 και Prot3, τόσο στα θετικά όσο και στα αρνητικά δείγματα, επιβεβαιώνοντας τα παραπάνω αποτελέσματα,  $p < 0,001$ . Στα θετικά δείγματα, η συγκέντρωση του DNA στο Prot1 βρέθηκε ότι ήταν σημαντικά μεγαλύτερη από αυτή του Prot3,  $p < 0,01$ , ενώ αντίθετα η διαφορά αυτή δεν ήταν σημαντική στα αρνητικά δείγματα,  $p > 0,05$ . (Σχήμα 2, Παράρτημα 2, σελ. 62)

### **3.4. Η ανάκτηση σε γενετικό υλικό (DNA), στο συνολικό όγκο του δείγματος, ανά γραμμάριο ιστού (yield/gr ιστού).**

Ο προσδιορισμός της ανάκτησης (yield) του γενετικού υλικού του δείγματος έγινε βάσει της συγκέντρωσης και του συνολικού όγκου του τελικού προϊόντος της εκχύλισης. Στο πρωτόκολλο 1 (Prot1) ο όγκος του τελικού προϊόντος της εκχύλισης ήταν 50μl, στο πρωτόκολλο 2 (Prot2) ήταν 200μl, ενώ στο πρωτόκολλο 3 (Prot3) ήταν 70μl. Με βάση τη συγκέντρωση και τον συνολικό όγκο του δείγματος υπολογίστηκε η ανάκτηση του γενετικού υλικού του κάθε δείγματος, το οποίο είχε συγκεκριμένες και μετρημένες διαστάσεις και βάρος. Έτσι, στη συνέχεια έγινε αναγωγή στο 1gr ιστού, με αποτέλεσμα την ανάκτηση του γενετικού υλικού ανά γραμμάριο ιστού. Από τη στατιστική ανάλυση προέκυψε ότι στο σύνολο των δειγμάτων η ανάκτηση του DNA/gr ιστού ήταν σημαντικά υψηλότερη στο πρωτόκολλο 2 (Prot2) ( $4040,58 \pm 1354,62$ ), σε σχέση με το πρωτόκολλο 1 (Prot1) ( $670,63 \pm 190,66$ ) και το πρωτόκολλο 3 (Prot3) ( $145,68 \pm 23,55$ )  $p < 0,001$ . Αντίθετα, αν και πλησίαζε το επίπεδο σημαντικότητας, η διαφορά μεταξύ του πρωτοκόλλου 1 (Prot1) και του πρωτοκόλλου 3 (Prot3) δε βρέθηκε να είναι στατιστικά σημαντική,  $p = 0,065$ . Στη συγκεκριμένη παράμετρο η κατάταξη των πρωτοκόλλων ήταν: (Prot2) > (Prot1) και (Prot2) > (Prot3) (Σχήμα 3). Η σύγκριση της ανάκτησης του DNA/gr ιστού μεταξύ των τριών πρωτοκόλλων ξεχωριστά για τα θετικά

και τα αρνητικά δείγματα επιβεβαίωσε τα παραπάνω αποτελέσματα. Βρέθηκε ότι το Prot2 εμφάνισε σημαντικά υψηλότερη τιμή ανάκτησης DNA/gr ιστού σε σύγκριση με τα πρωτόκολλα Prot1 και Prot3 τόσο στα θετικά όσο και στα αρνητικά δείγματα,  $p < 0.001$ . (Σχήμα 3, Παράρτημα 2, σελ. 63)

### 3.5. Χρόνος και κόστος εκτέλεσης κάθε πρωτοκόλλου

Όπως προκύπτει από τον πίνακα 3 (Παράρτημα 1, σελ 60), το πρωτόκολλο 2 (Prot2) ήταν το περισσότερο οικονομικό (0,10€/δείγμα) και το λιγότερο χρονοβόρο (1 ώρα και 20 λεπτά). Για το πρωτόκολλο 1 (Prot1) και το πρωτόκολλο 3 (Prot3) και οι δύο αυτές παράμετροι ήταν υψηλότερες και με σημαντική διαφορά συγκριτικά με το πρωτόκολλο 2 (Prot2). Τα πρωτόκολλα 1 (Prot1) και 3 (Prot3) εμφάνισαν μεταξύ τους ελάχιστη διαφορά στην παράμετρο του χρόνου, καθώς το πρωτόκολλο 1 (Prot1) είχε διάρκεια 23 ώρες, ενώ το πρωτόκολλο 3 (Prot3) 20 ώρες και 30 λεπτά. Αντίθετα, σε ότι αφορά την παράμετρο του κόστους φάνηκε ότι το πρωτόκολλο 1 (Prot1) ήταν περισσότερο οικονομικό σε σχέση με το πρωτόκολλο 3 (Prot3), καθώς κόστισε 7,54 ευρώ/δείγμα, σχεδόν τη μισή τιμή του κόστους του πρωτοκόλλου 3 (Prot3) (13,57€). Στις συγκεκριμένες παραμέτρους η κατάταξη των πρωτοκόλλων ήταν: (Prot2) > (Prot1) > (Prot3). (Πίνακας 3, Παράρτημα 1, σελ. 61)

### 3.6. Υπολογισμός μέσης τιμής των διάμεσων τιμών για κάθε παράμετρο

Στην προσπάθεια να αξιολογηθεί συνολικά η απόδοση των τριών πρωτοκόλλων, υπολογίστηκε για την κάθε παράμετρο (καθαρότητα, συγκέντρωση και ανάκτηση/g ιστού) η διάμεση τιμή, χωριστά για το κάθε πρωτόκολλο στο σύνολο των δειγμάτων. Η τιμή εκφράστηκε σε πολλαπλάσια της μέσης τιμής των διάμεσων (mean of medians) όλων των πρωτοκόλλων για την κάθε παράμετρο. Οι τρεις τιμές (μία για κάθε παράμετρο) αθροίστηκαν για το κάθε πρωτόκολλο και βρέθηκε ότι το πρωτόκολλο 1 (Prot1) είχε την τιμή 1,94, το πρωτόκολλο 2 (Prot2) την τιμή 5,34 και το πρωτόκολλο 3 (Prot3) την τιμή 1,89. Σύμφωνα με τον υπολογισμό αυτό υπερέτρησε το πρωτόκολλο 2 (Prot2) στη συνέχεια το πρωτόκολλο 1 (Prot1) και τέλος το πρωτόκολλο 3 (Prot3), δηλαδή (Prot2) > (Prot1) > (Prot3). (Πίνακας 4, Παράρτημα 1, σελ. 61)

### **3.7. Αποτελέσματα της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR)**

Ενδεικτικά, μετά την εκχύλιση ακολούθησε πανμυκητιακή PCR (panfungal PCR), βασισμένη στο γονίδιο της 18S περιοχής του ριβοσωμικού DNA. Η πανμυκητιακή PCR εφαρμόστηκε σε 10 δείγματα ονύχων (8 θετικά και 2 αρνητικά), ξεχωριστά για κάθε πρωτόκολλο, δηλαδή 30 αντιδράσεις. Από τα αποτελέσματα της εφαρμογής αυτής φάνηκε ότι στη συντριπτική πλειοψηφία των περιπτώσεων, επιτεύχθηκε όχι μόνο η εκχύλιση του γενετικού υλικού του δείγματος (όνυχα), αλλά και η εκχύλιση μυκητιακού DNA. Παραδείγματα φαίνονται στις εικόνες 1,2,3.( Εικόνα 1,2,3, Παράρτημα 2, σελ. 63-64)

#### 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Οι ονυχομυκητιάσεις, αν και μη απειλητικές για τη ζωή του ανθρώπου, αποτελούν σημαντικό πρόβλημα υγείας, ιδίως αυτές που προκαλούνται από τους δερματοφυτικούς νηματοειδείς μύκητες, λόγω του υψηλού επιπολασμού (περίπου 10% του πληθυσμού των Η.Π.Α. και 2% έως 8% της Ευρώπης εμφανίζει νοσηρότητα) καθώς και της δυσκολίας αντιμετώπισής της (Kemna and Elewski, 1996).

Οι ονυχομυκητιάσεις είναι επίμονες και χρόνιες λοιμώξεις, οι οποίες έχουν σημαντική επίπτωση στην καθημερινή και επαγγελματική ζωή του ασθενούς. Η ψυχοκοινωνική λειτουργία του πάσχοντα επηρεάζεται άμεσα και μπορεί να οδηγεί σε μείωση της ποιότητας ζωής του (Friedlander et al., 2010). Επίσης σε ασθενείς με καταστολή του ανοσοποιητικού συστήματος μπορεί να προκαλεί σημαντικότερα προβλήματα οδηγώντας σε σοβαρές λοιμώξεις. (Siegfried and Korting, 1990).

Με δεδομένο λοιπόν τις πολλαπλές επιπτώσεις των ονυχομυκητιάσεων, η ειδική διαγνωστική προσέγγιση (κλινική και εργαστηριακή) και ταυτόχρονα η εξειδικευμένη και παρατεταμένη φαρμακευτική θεραπεία θεωρείται αναγκαία. Η ακριβής διάγνωση της ονυχομυκητιάσης είναι σημαντική προϋπόθεση για τη σωστή και επιτυχή αντιμετώπισή της.

Η κλασική εργαστηριακή προσέγγιση είναι χρονοβόρα και μπορεί να υπολείπεται σε ευαισθησία. (Summerbell et al, 2005). Η προσπάθεια εφαρμογής ταχύτερης, πιο ευαίσθητης και πιο ειδικής μεθοδολογίας, έχει οδηγήσει την έρευνα σε εντατικότερη μελέτη για την εφαρμογή των μοριακών μεθόδων διάγνωσης και ταυτοποίησης.

Στη διαγνωστική μοριακή προσέγγιση ένα αρχικό πρόβλημα που πρέπει να αντιμετωπιστεί είναι ο τρόπος εκχύλισης του DNA. Η αποτελεσματικότητα ενός αξιόπιστου πρωτοκόλλου μοριακής διάγνωσης ή ταυτοποίησης, προϋποθέτει την ύπαρξη ενός κατάλληλου πρωτοκόλλου εκχύλισης του γενετικού υλικού του μύκητα. Στη μυκητολογία σημαντικό παράδειγμα είναι η PCR Ασπεργίλλου, όπου φαίνεται στα τελευταία δημοσιευμένα συμπεράσματα, ότι η εκχύλιση του γενετικού υλικού είναι σημαντικότερη από την ίδια την PCR (Friedlander et al., 2012).

Για να επιτευχθεί μια υψηλής ευαισθησίας δοκιμασία PCR είναι αναγκαία η εφαρμογή πρωτοκόλλων εκχύλισης υψηλής ποιότητας.

Οι δυσκολίες στις ονυχομυκητιάσεις εστιάζονται στο ότι ο όνυχας είναι ένα σκληρό και ανθεκτικό υλικό. Η ονυχαία πλάκα αποτελείται από αλληλοσυνδεόμενα κερατινοκύτταρα που στερούνται πυρήνων και οργανιδίων. Τα άλατα του ασβεστίου είναι σημαντικά συστατικά της ονυχαίας πλάκας καθώς και οι ινιδώδεις και σφαιρικές πρωτεΐνες που περιέχουν θείο. Η σκληρότητα των ονύχων οφείλεται στις πρωτεΐνες της θεμέλιας ουσίας με υψηλή περιεκτικότητα σε θείο.

Επίσης υπάρχει έλλειψη τυποποιημένων μοριακών μεθοδολογιών για την ανίχνευση του μυκητιακού DNA απευθείας από το κλινικό δείγμα, με σκοπό τη διάγνωση των μυκητιακών λοιμώξεων των ονύχων.

Ο σκοπός της διπλωματικής αυτής εργασία ήταν η συγκριτική μελέτη τριών διαφορετικών πρωτοκόλλων εκχύλισης και η επιλογή του καταλληλότερου προκειμένου να χρησιμοποιηθεί σε μελλοντικά πρωτόκολλα μοριακής διάγνωσης των ονυχομυκητιάσεων. Η επιλογή των τριών πρωτοκόλλων πραγματοποιήθηκε μετά από προσπάθεια εύρεσης αντιπροσωπευτικών πρωτοκόλλων, σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία.

Το πρώτο πρωτόκολλο (Prot 1) που επιλέχθηκε, βασίστηκε στο εξειδικευμένο πρωτόκολλο εκχύλισης DNA, το οποίο εφαρμόστηκε από τους Tahir & Watson το 1995, τροποποιημένο από το πρωτόκολλο που χρησιμοποιούσε το Ομοσπονδιακό Γραφείο Ερευνών των Ηνωμένων Πολιτειών (FBI -Federal Bureau of Investigation) για την απομόνωση γενετικού υλικού τριχών (Wilson et al., 1995). Σύμφωνα με το πρωτόκολλο εκχύλισης DNA των Tahir & Watson, γίνεται βρασμός του όνυχα σε απεσταγμένο νερό για πέντε λεπτά, πριν τον τεμαχισμό του, με σκοπό την πιο εύκολη διάσπαση του ιστού από τη δράση των πεπτικών ενζύμων, κυρίως σε ότι αφορά τα σκληρότερα τμήματα του όνυχα. Το στάδιο αυτό της εκχύλισης δεν εφαρμόστηκε στις μετέπειτα ερευνητικές εργασίες, πιθανόν εξαιτίας του αυξημένου κινδύνου υποβάθμισης του γενετικού υλικού, λόγω αυξημένης θερμοκρασίας ( Brillowska-Dabrowska, 2006).

Το παραπάνω πρωτόκολλο εκχύλισης DNA των Tahir & Watson συνδυάστηκε με ένα επιπλέον στάδιο καθαρισμού (με χρήση στηλών εμπορικού κιτ), μετά την ενζυματική διάσπαση με πρωτεϊνάση K και DTT (dithiothreitol), (Arabatzis et al, 2007), με σκοπό την απόκτηση καθαρότερου μυκητιακού DNA. Έτσι χαρακτηριστικά του πρώτου (Prot 1) όπως και του τρίτου πρωτοκόλλου (Prot 3) είναι η διάσπαση των πρωτεϊνών του DNA με πρωτεολυτικά ένζυμα όπως η πρωτεϊνάση K. Επίσης η χρήση στηλών, ως επιπλέον στάδιο καθαρισμού στο πρώτο πρωτόκολλο, καθώς και η χρήση

του μαγνητικού διαχωρισμού με κατάλληλη τροποποίηση στο τρίτο πρωτόκολλο ( Prot 3).

Η δεύτερη μέθοδος εκχύλισης (Prot 2), που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη και η οποία έχει αποκτήσει διεθνή πατέντα έχει προταθεί από τη Μονάδα Μυκητολογίας και Παρασιτολογίας του Ινστιτούτου Statens της Κοπεγχάγης της Δανίας και περιλαμβάνει τη χρήση ρυθμιστικού διαλύματος εκχύλισης και σταθεροποιητικού διαλύματος BSA-λευκωματίνης βόειου ορού. (Brillowska-Dabrowska A et al, 2007).

Σύμφωνα με τους Brillowska-Dabrowska A. και συν, εναλλακτική μέθοδος εκχύλισης του δεύτερου πρωτοκόλλου (Prot 2) αποτελούν τα ρυθμιστικά διαλύματα εμπορικών κιτ (Red Extract-N- Amp Plant Kit) και (Extract-N- Amp Plant Kit) της εταιρείας Sigma-Aldrich Co, USA. Και τα δύο χρησιμοποιούν ίδια ρυθμιστικά διαλύματα με τη διαφορά προσθήκης μίας ερυθρής χρωστικής στο πρώτο κιτ, χρήσιμη στην εφαρμογή σε πηκτή (gel).

Στη τρίτη μέθοδο εκχύλισης (Prot3) που εφαρμόστηκε στην παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε κατεργασία με πρωτεΐνωση K, όπως και στο πρώτο πρωτόκολλο 1 με συνοδή χρήση του εμπορικού κιτ μαγνητικού διαχωρισμού, μετά από σχετική κατάλληλη τροποποίηση. Η τροποποίηση αυτή περιλάμβανε αρχική ομογενοποίηση του δείγματος του όνυχα με πρωτεΐνωση K, με τη βοήθεια γυάλινων σφαιριδίων και ισχυρής ανάδευσης (White et al., 2006).

Κατά την εκχύλιση, η απομόνωση μίας ουσίας από ένα μίγμα γίνεται με τη στενή επαφή του μίγματος με ένα διαλυτικό μέσο, το οποίο διαλύει εκλεκτικά την ουσία. Για την επιλογή της τεχνικής εκχύλισης καλό είναι να λαμβάνονται υπόψη ορισμένες παράμετροι οι οποίοι παίζουν καθοριστικό ρόλο στην αποτελεσματικότητά της, όπως η επιλογή του ρυθμιστικού διαλύματος, το κατάλληλο pH ή η χρήση πρωτεϊνών ή ενζύμων. Η βέλτιστη καταλυτική δράση των ενζύμων εξαρτάται από την περιοχή του pH. Σημαντικό ρόλο παίζει στη δράση αυτή η επιλογή του ρυθμιστικού διαλύματος μέσω του οποίου καθορίζονται τα όρια του pH (Gavrieli Y et al, 1992).

Το ρυθμιστικό διάλυμα εκχύλισης του πρωτοκόλλου 2 (  $\text{NaHCO}_3$  , KCL και Trizma) παρουσιάζει μεγάλη διαλυτότητα στο νερό, ελάχιστη διαπερατότητα στις βιολογικές μεμβράνες και, ελάχιστη επίδραση της ιοντικής ισχύος επί του pH. Επίσης παρουσιάζει ελάχιστη αλληλεπίδραση με τη θερμοκρασία καθώς και ελάχιστη αλληλεπίδραση με ανόργανα κατιόντα (Brillowska – Dabrowska, 2007).

Η BSA-λευκωματίνη βόειου ορού που χρησιμοποιήθηκε στο δεύτερο πρωτόκολλο (Prot 2) είναι κατάλληλη ως σταθεροποιητής κατά τον καθαρισμό ή την

αραιώση των ενδονουκλεασών περιορισμού και των ενζύμων τροποποίησης του DNA. Οι ενδονουκλεάσες περιορισμού με τη σειρά τους αναγνωρίζουν ειδικές αλληλουχίες του DNA. Το γονιδίωμα έχει την ιδιότητα μέσω των νουκλεασών περιορισμού να κοπεί σε πολλά κομμάτια, τα οποία στη συνέχεια είναι δυνατόν να εντοπισθούν και να μελετηθούν (Devliotou- Panagiotidou et al., 1996).

Τα ένζυμα όπως η πρωτεϊνάση K, που χρησιμοποιήθηκε στο πρώτο και στο τρίτο πρωτόκολλο (Prot1, Prot3), είναι ιδανικά αντιδραστήρια για τη χαρτογράφηση του DNA, αφού κάθε αναγνωρισμένη αλληλουχία παίζει ρόλο ορόσημου πάνω στο DNA. Με την εφαρμογή των ενζυμικών πέψεων επιτυγχάνεται η χαρτογράφηση των περιοριστικών θέσεων στο δείγμα που προσδιορίζεται. Ειδικότερα η πρωτεόλυση με πρωτεϊνάση K διευκολύνει την πρόσβαση στο DNA, επειδή διασπά τους διασταυρούμενους δεσμούς που δημιουργούνται κατά τη μονιμοποίηση στις πυρηνικές πρωτεΐνες. Η επεξεργασία με πρωτεϊνάση K είναι αποτελεσματικότερη για την αύξηση της ευαισθησίας σε ιστούς, οι οποίοι έχουν παραμείνει στο μέσο μονιμοποίησης για μεγάλο χρονικό διάστημα (Gavrieli Y et al, 1992).

Επίσης η πρωτεϊνάση K αποτελεί μια πρωτεάση σερίνης, η οποία χρησιμοποιείται κυρίως στην απομόνωση του DNA για την αποικοδόμηση των πρωτεϊνών. Το ένζυμο αναγνωρίζει και διασπά τον πεπτιδικό δεσμό δίπλα στην καρβοξυλομάδα των αλειφατικών και αρωματικών αμινοξέων. Επίσης αδρανοποιεί άμεσα τις νουκλεάσες που ενδεχομένως να δημιουργήσουν πρόβλημα στα μόρια του DNA κατά την απομόνωση (Kawai J and Hayashizaki Y, 2003).

Ο τρόπος εκχύλισης του γενετικού υλικού και το παραγόμενο προϊόν όσο αναφορά στην ποσότητα και ποιότητα του DNA, δηλαδή τη συγκέντρωση, την καθαρότητα καθώς και την ύπαρξη αναστολέων, αποτελούν σημαντικούς παράγοντες για την αποτελεσματικότητα της εφαρμοζόμενης PCR (Kanbe, 2008).

Η αξιολόγηση των τριών διαφορετικών πρωτοκόλλων εκχύλισης γενετικού υλικού έγινε με βάση τις παρακάτω παραμέτρους: την καθαρότητα του παραγόμενου προϊόντος (DNA purity), τη συγκέντρωσή του (DNA concentration), την ανάκτηση του γενετικού υλικού (DNA) στο συνολικό όγκο του δείγματος, ανά γραμμάριο ιστού (DNA yield mg/gr tissue) καθώς και τη χρονική διάρκεια και το κόστος εκτέλεσης κάθε πρωτοκόλλου.

Κατά την ανάλυση των αποτελεσμάτων η καθαρότητα του παραγόμενου προϊόντος φάνηκε ότι στο τρίτο πρωτόκολλο (Prot3) υπερτερεί σε σχέση με τα άλλα

δύο, πρωτόκολλο 1 (Prot 1) και πρωτόκολλο 2 (Prot 2), με τελική κατάταξη: (Prot3)>(Prot1)>(Prot2).

Η καθαρότητα του DNA αποτελεί ένα κρίσιμο βήμα για τις περισσότερες μεθόδους μοριακής βιολογίας και κλινικής έρευνας. Ιδιαίτερα αποτελεσματικά θεωρούνται τα εμπορικά κιτ, τα οποία είναι σε θέση να απομονώσουν και να καθαρίσουν DNA από μια σειρά κυτταρικών πηγών όπως οι ανθρώπινοι ιστοί. Η ποσότητα του DNA θα πρέπει να είναι επαρκής για το επόμενο στάδιο, ενώ η υψηλή καθαρότητα ελαχιστοποιεί τα προβλήματα από μη στοχευμένες περιοχές του DNA και άλλες προσμίξεις, όπως πρωτεΐνες και μικρά μόρια. Επιπλέον η υψηλή καθαρότητα του DNA αυξάνει τη σταθερότητά του σε μακροχρόνια αποθήκευση (Alteras and Cojacobu, 1973).

Για τον καθαρισμό του DNA είναι σημαντικό να αναμιχθούν τα διαλύματα αποτελεσματικά. Η ταχύτερη ανάμιξη οδηγεί σε αυξημένες αποδόσεις DNA καθώς και σε καλύτερο καθαρισμό αυτού. Η καθαρότητα του αρχικού δείγματος DNA είναι ιδιαίτερα σημαντική, καθώς η ύπαρξη τυχόν προσμίξεων του DNA με άλλους οργανισμούς θα δημιουργούσε πολλαπλά προβλήματα σε επόμενα στάδια (Roe B. A et al, 1996). Η μέθοδος εκχύλισης, η οποία εφαρμόζεται κάθε φορά επηρεάζει σημαντικά την ποιότητα της καθαρότητας του DNA.

Η μέθοδος εκχύλισης του πρώτου πρωτοκόλλου (Prot 1) παρουσίασε την υψηλότερη καθαρότητα, ενώ στη δεύτερη μέθοδο εκχύλισης (Prot 2) η συγκέντρωση του DNA ήταν σημαντικά υψηλότερη από την πρώτη (Prot 1) και την τρίτη μέθοδο εκχύλισης (Prot 3). Στη συγκεκριμένη παράμετρο η κατάταξη των πρωτοκόλλων ήταν: (Prot2)>(Prot1)>(Prot3). Η ανάκτηση του DNA/g ιστού ήταν επίσης σημαντικά υψηλότερη στη δεύτερη μέθοδο (Prot2) σε σχέση με την πρώτη (Prot 1) και τρίτη μέθοδο (Prot 3). Στη συγκεκριμένη παράμετρο η κατάταξη των πρωτοκόλλων ήταν επίσης: (Prot2)>(Prot1) και (Prot2)> (Prot3), ενώ η διαφορά μεταξύ του πρωτοκόλλου 1 (Prot1) και του πρωτοκόλλου 3 (Prot3) δε βρέθηκε να είναι στατιστικά σημαντική.

Υπάρχει ιδιαίτερη συσχέτιση μεταξύ της ποσότητας και της ποιότητας του DNA με το μέγεθος και την ακρίβεια της ανάλυσης που πραγματοποιείται. Το DNA θα πρέπει να είναι ομοιογενές, καθαρό, απαλλαγμένο από πρωτεΐνες και άλατα διαλυτοποιημένα. Χαμηλή συγκέντρωση DNA έχει ως αποτέλεσμα αδύνατο σήμα. Αυτό έχει ως συνέπεια να μη γίνεται σωστή ανάγνωση των υπό μελέτη αλληλουχιών (Dhib et al., 2014).

Επίσης η ποσότητα και η ποιότητα του DNA παίζει ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο στα επόμενα στάδια που ακολουθεί η μέθοδος προσδιορισμού του παθογόνου



παράγοντα. Η έννοια της ποσότητας απορρέει από τη φύση της δειγματοληψίας. Συνήθως χρειάζεται το DNA τουλάχιστο τριών κυττάρων για τη λήψη αξιόπιστων αποτελεσμάτων. Επίσης το δείγμα θα πρέπει να είναι καλής ποιότητας έτσι ώστε να επιτρέψει το σωστό πολλαπλασιασμό του DNA (Gavrieli et al., 1992).

Όπως προκύπτει από την ανάλυση των αποτελεσμάτων σχετικά με τη χρονική διάρκεια και το κόστος εκτέλεσης κάθε πρωτοκόλλου, το πρωτόκολλο 2 (Prot2) ήταν το περισσότερο οικονομικό (0,10€/δείγμα) και το λιγότερο χρονοβόρο (1 ώρα και 20 λεπτά). Στις συγκεκριμένες παραμέτρους η κατάταξη των πρωτοκόλλων ήταν: (Prot2)> (Prot1)> (Prot3).

Το υψηλό κόστος των μοριακών μεθόδων σε σχέση με τις συμβατικές αποτελεί έναν περιοριστικό παράγοντα. Παρόλο το υψηλό κόστος η ευαισθησία τους είναι μεγάλη σε σχέση με τις συμβατικές, καθώς μπορεί να ανιχνεύσει 6-14% περισσότερα θετικά δείγματα (Arabatzis et al., 2007).

Στη δεύτερη μέθοδο εκχύλισης (Prot2), η εφαρμογή δύο σταδίων εκπόνησης συνολικού χρόνου μόνο 15 λεπτών, η διαδικασία εκχύλισης του γενετικού υλικού, απευθείας από το δείγμα όνυχα, σε συνδυασμό με μία πολυπλεκτική PCR για τη διάγνωση δερματοφυτικών μυκήτων, εμφανίζει αυξημένη ευαισθησία σε σχέση με τις συμβατικές διαγνωστικές διαδικασίες (Brilowska-Dabrowska et al., 2007).

Με αυτό τον τρόπο η μέθοδος αυτή επιτρέπει την ενσωμάτωση μιας μοριακής μεθόδου, γρήγορης, ειδικής και χαμηλού κόστους στη ρουτίνα εξέτασης των ονυχομυκητιάσεων.

Σχετικά με τη χρονική διάρκεια εκτέλεσης της μεθόδου εκχύλισης (Prot3), αναφέρεται ότι η εκχύλιση γενετικού υλικού από καλλιέργειες μυκήτων μπορεί να πραγματοποιηθεί μέσα σε μία ώρα χρησιμοποιώντας για το μαγνητικό διαχωρισμό το αυτοματοποιημένο σύστημα MagNa Pure LC technology, ενώ ο μαγνητικός διαχωρισμός με το εμπορικό κιτ, χωρίς το αυτοματοποιημένο σύστημα που αναφέρθηκε, χρειάζεται τουλάχιστον τρεις ώρες (χωρίς την προετοιμασία των αντιδραστηρίων), (Loeffler et al., 2002).

Μετά την ολοκλήρωση της πειραματικής διαδικασίας της παρούσας μελέτης, η δεύτερη μέθοδος παρουσίασε υψηλή συγκέντρωση και ανάκτηση DNA/g ιστού. Η διάρκεια και το κόστος ήταν επίσης πολύ ευνοϊκά. Ωστόσο η καθαρότητα του DNA ήταν χαμηλή. Αν απαιτείται υψηλής καθαρότητας DNA για ειδικές μοριακές εφαρμογές, η τρίτη και η πρώτη μέθοδος εκχύλισης, η τελευταία είναι και οικονομικότερη, είναι πιθανώς καταλληλότερες.

Στη διεθνή βιβλιογραφία υπάρχουν αρκετές μελέτες που αναφέρονται σε μοριακές μεθόδους εντοπισμού του παθογόνου μύκητα στις ονυχομυκητιάσεις. Οι περισσότερες από αυτές δεν δίνουν ιδιαίτερη βαρύτητα στις μεθόδους εκχύλισης, αλλά κυρίως συγκρίνουν τις συμβατικές μεθόδους με τις μοριακές (PCR). Σύμφωνα με τους Luck και συν. (2012), οι οποίοι χρησιμοποίησαν το ίδιο πρωτόκολλο εκχύλισης με τη δεύτερη μέθοδο εκχύλισης (Prot2), της παρούσας εργασίας, κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι με τις μοριακές μεθόδους υπάρχουν υψηλότερα ποσοστά θετικών δειγμάτων και μικρότερα ποσοστά αρνητικών, συγκριτικά με την άμεση μικροσκόπηση και τις καλλιέργειες (40% θετικά δείγματα με την PCR έναντι 10% με τις καλλιέργειες). Εικάζουν ότι τα αρνητικά αποτελέσματα με τις μοριακές μεθόδους, οφείλονται σε αναστολές στο μίγμα της αντίδρασης ή στο ισχυρό κυτταρικό μυκητιακό τοίχωμα, το οποίο αποτρέπει την απελευθέρωση του γενετικού υλικού (Luck et al., 2012).

Θεωρήθηκε ότι σε όλες τις μεθόδους υπάρχει πιθανότητα δειγματοληπτικού σφάλματος. Ακόμη μια ερευνητική εργασία που συγκρίνει τις συμβατικές με τις μοριακές μεθόδους, αλλά χρησιμοποιεί ως μέθοδο εκχύλισης το πρώτο πρωτόκολλο της παρούσας εργασίας (Prot1), είναι των I. Dabrowska και συν, που εμφανίζει αντιφατικά αποτελέσματα PCR σε σχέση με την άμεση μικροσκόπηση και την καλλιέργεια των δειγμάτων. Όπως και στην παρούσα εργασία, κάθε όνυχας κόπηκε σε τεμαχίδια, τα οποία χρησιμοποιούνταν για την εφαρμογή των κλασικών μεθόδων διάγνωσης, με άμεση μικροσκόπηση και καλλιέργεια. Ταυτόχρονα, τρία τεμαχίδια των ονύχων χρησιμοποιήθηκαν για τις τρεις μεθόδους εκχύλισης. Παρόλο που τα δείγματα ήταν από τον ίδιο ασθενή, είναι πιθανό να μην υπήρχε ο παθογόνος μύκητας στο υλικό που χρησιμοποιήθηκε για τις μοριακές ή συμβατικές μεθόδους (Dabrowska et al., 2014).

Μετά από σύντομη ανασκόπηση της διεθνούς βιβλιογραφίας, παρατηρήθηκε ότι είναι λίγες οι μελέτες που συγκρίνουν μεθόδους εκχύλισης γενετικού υλικού στις ονυχομυκητιάσεις, έστω και συμπληρωματικά με τις PCR. Σύμφωνα με τους F. Pankewitz και συν, η σύγκριση δύο πρωτοκόλλων εκχύλισης με εμπορικά κιτ, δείχνει ότι η βελτιστοποίηση της εκχύλισης του DNA, είναι μία από τις βασικές παραμέτρους για την απόκτηση χαμηλού ορίου ανίχνευσης γενετικού υλικού. Ακόμη στην εργασία αυτή θεωρήθηκε πολύ σημαντική η επίδραση των μεθόδων εκχύλισης στην ευαισθησία των μοριακών δοκιμασιών (Pankewitz et al., 2013).

Επιπλέον, σύμφωνα με τους Rasmus H. Jensen και συν, η επιτυχής εκχύλιση DNA απαιτεί μία διαδικασία ικανή να διαταράξει το άκαμπτο κυτταρικό τοίχωμα των μυκήτων και να συναγωνιστεί τους αναστολές της PCR που συνδέονται με τα κλινικά

δείγματα. Στη μελέτη αυτή συγκρίθηκαν δώδεκα διαφορετικά πρωτόκολλα μαζί με διαφορετικές PCR. Οι μέθοδοι εκχύλισης που συγκρίνονται αφορούν χειροκίνητη ομογενοποίηση κλινικών δειγμάτων, επεξεργασία ψύξης- απόψυξης, έντονη μηχανική ανακίνηση, όπως του τρίτου πρωτοκόλλου της παρούσας εργασίας (Prot3), χρήση φαινολογλωροφορμίου καθώς και εμπορικά κιτ εκχύλισης. Από τις εκχυλίσεις ξεχωρίζει αυτή που χρησιμοποιήθηκε στο δεύτερο πρωτόκολλο εκχύλισης της παρούσας εργασίας (Prot2), για την απόδοση και τα αποτελέσματά της, καθώς και την ταχύτερη εξαγωγή γενετικού υλικού. Το συμπέρασμα της συγκεκριμένης μελέτης συμφωνεί με τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας, σχετικά με την υψηλή συγκέντρωση και την ανάκτηση γενετικού υλικού καθώς και τη σύντομη χρονική διάρκεια εκτέλεσης του συγκεκριμένου πρωτοκόλλου (Rasmus et al., 2010).

Στη διπλωματική αυτή εργασία συγκρίθηκαν τρεις μέθοδοι εκχύλισης. Αν και το αντικείμενο μελέτης ήταν οι μέθοδοι εκχύλισης γενετικού υλικού κι όχι η μελέτη των τεχνικών PCR, ενδεικτικά μετά την εκχύλιση και για την απόδειξη της ύπαρξης μυκυτιακού DNA, ακολουθούσε πανμυκητιακή PCR (panfungal PCR) βασισμένη στο γονίδιο της 18S περιοχής του ριβοσωμικού DNA(rDNA) (Einsele et al., 1997).

Η μέθοδος PCR (Polymerase Chain Reaction, Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης) συνήθως διαρκεί δύο έως τρεις ώρες και το παραγόμενο DNA μπορεί να τοποθετηθεί αμέσως σε αντιδράσεις προσδιορισμού αλληλουχίας ή να κλωνοποιηθεί. Επίσης μέσω της μεθόδου αυτής το DNA μπορεί να πολλαπλασιαστεί σε πολύ υψηλά επίπεδα δίνοντας τη δυνατότητα μελέτης του από πολύ μικρά δείγματα (McPherson M, 2001).

Η PCR μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση του γενετικού υλικού ενός μικροοργανισμού που έχει προσβάλλει τον άνθρωπο. Αποτελεί γρήγορη και εναλλακτική λύση, η οποία μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να ανιχνεύσει ένα μικρό ποσοστό κυττάρων που έχουν μολυνθεί από κάποιο μύκητα. Στη συνέχεια μετά τον ειδικό πολλαπλασιασμό του γονιδιακού τόπου και την ηλεκτροφόρηση, η παρουσία ενός προϊόντος PCR αναμενόμενου μεγέθους σηματοδοτεί την παρουσία της προς μελέτη αλληλουχίας. Η ανιχνευτική ικανότητα της PCR είναι τόσο μεγάλη ώστε είναι δυνατόν να ληφθούν αποτελέσματα ακόμη και από δείγματα DNA τα οποία έχουν σχεδόν καταστραφεί και πολύ συχνά και από ένα μόνο κύτταρο (Bloom et al., 1996).

Τελευταία γίνεται προσπάθεια για τη δημιουργία μεθόδων PCR που ανιχνεύουν ταυτόχρονα περισσότερα από ένα γένος μυκήτων. Μελέτες αναφέρουν την ανάπτυξη

και αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας πολυπλεκτικών PCR που μπορούν να ανιχνεύουν ταυτόχρονα και τις τρεις κατηγορίες μυκήτων: δερματοφυτικούς νηματοειδείς μύκητες, ζυμομύκητες και μη δερματοφυτικούς νηματοειδείς μύκητες. Τα αποτελέσματα μπορεί να αποκτηθούν σε λίγες ώρες και η ευαισθησία να είναι συγκρίσιμη με την ευαισθησία της άμεσης μικροσκοπησης, ενώ η ειδικότητα συγκρίσιμη με αυτήν της καλλιέργειας (Li XF et al, 2011).

Παρόλα τα πλεονεκτήματα των μοριακών μεθόδων πρέπει να επισημανθεί η διαφορά των παραπάνω με τις παραδοσιακές διαγνωστικές δοκιμασίες, οι οποίες μπορούν να ανιχνεύσουν είτε μικροσκοπικά, είτε καλλιεργητικά, κάποιο παθογόνο μικροοργανισμό, ενώ η ανίχνευση μέσω μιας μοριακής μεθόδου είναι συνήθως στοχευόμενη σε συγκεκριμένο παθογόνο αίτιο κάποιας λοίμωξης (Gupta et al., 2013).

Τα μικροβιολογικά εργαστήρια θα συνεχίσουν να βασίζονται για πολλά χρόνια ακόμα στη μορφολογική αναγνώριση και ταυτοποίηση των μυκήτων που εμπλέκονται στις επιφανειακές μυκητιάσεις. Η πολύ καλή γνώση και εκπαίδευση στις κλασικές μικροβιολογικές αρχές και τεχνικές, η τυποποίηση υλικών και μεθοδολογιών και η εξοικείωση με τις καινούργιες μοριακές και άλλες τεχνικές είναι σημαντικά βοηθήματα για την εργαστηριακή προσέγγιση των ονυχομυκητιάσεων (Βυζαντιάδης, 2010).

Οι μελλοντικές προοπτικές που ανοίγονται σε αυτή την επιστημονική περιοχή είναι ευρείες και η συνέχιση της έρευνας είναι ιδιαίτερης σημασίας. Η εφαρμογή της PCR, με τη βοήθεια του κατάλληλου πρωτοκόλλου εκχύλισης, θα αποτελέσει συμπληρωματικό εργαλείο των κλασικών μεθοδολογιών στη διαγνωστική προσέγγιση ασθενών με υποψία ονυχομυκητίασης και στην περισσότερο άμεση θεραπευτική τους αντιμετώπιση. Γίνεται σαφής η αναγκαιότητα συνέχισης της ερευνητικής προσπάθειας για την πρόληψη και τη βελτίωση της ποιότητας ζωής των ασθενών με ονυχομυκητίαση.

## **BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

### **Ξενόγλωσση**

- 1) **Aljabre S.H.M, Richardson M.D, Scott E.M, Rashid A.** (1993). “Adherence of arthroconidia and germ lings of anthrophilic and zoophilic varieties of *Trichophyton mentagrophytes* to human coenocytes as an early event in the pathogenesis of dermatophytosis”. **Clinical and Experimental Dermatology**, 18, 231-235.
- 2) **Allevato MA,** (2010), “Diseases mimicking onychomycosis”. **Clinics in Dermatology**, 28, 2, 164-177
- 3) **Alteras I, Cojacorui I.** (1973). “A short review on tinea pedis caused by dermatophytes”. **Mycoses**, 16, 229-237.
- 4) **Andre, J and Achetn G.** (1987). “Onychomycosis”. **International Journal of Dermatology**, 26, 481-490.
- 5) **Arabatzi M, Bruijnesteijn L, Kuijper E.J. de Hoog, S, Lavrijsen. A.P.M., Templeton K, van der Raaij-Helmer, E.M.H, Belegraki A, Graser Y, Summerball RC.** (2007). “Diagnosis of common dermatophytes infections by a novel multiplex real-time PCR detection/identification scheme”. **British Journal of Dermatology**, 157;4, 681-689.
- 6) **Arabatzi M, L.E.S. Bruijnesteijn van Coppenraet** (2007). “Diagnosis of common dermatophytes infections by a novel multiplex real-time PCR detection/identification scheme”. **British Journal of Dermatology**, 157, 681-689.
- 7) **Baran R, Hay JR, Tosti A, Haneke E.** (1998). “A new classification of onychomycosis”. **British Journal of Dermatology**;139, 567-571
- 8) **Baran R, Hay R, Haneke E and Tosti A.** (2006). *Onychomycosis: The Current Approach to Diagnosis and Therapy*. London: Taylor & Francis Publishers.
- 9) **Blanz P, Buzina W, Ginter G.** (2000). “Molecular biological methods in taxonomy and diagnostics of dermatophytes”, **Mycoses**, 43, 11-16.
- 10) **Bloom, M. V. Freyer, G.A. and Micklos, D.A.**(1996). *Laboratory DNA science* New York. Benjamin Cummings Publishers.
- 11) **Borman, A., Campbell, C.K., Fraser, M. and Johnson, E.M.** (2005). “Analysis of the dermatophytes species isolated in the British Isles between 1980 and 2005 and review of worldwide dermatophyte trends over the last three decades”. **Medical Mycology**, 45,131-141.
- 12) **Brillowska – Dabrowska, A., Saunte, D.M., and Arendrup M.C.** (2007). “Rapid Diagnosis of Dermatophytes nails infections. Unit of Mycology and

Parasitology” States Serum Institute, Copenhagen, Denmark. **Journal of Clinical Microbiology**, 45 ,1200-1204.

13) **Brillowska-Dabrowska Anna, Ditte Marie Saunte and Maiken Cavling.** (2007). “Arendrup. Rapid Diagnosis of Dermatophytes nail infections. Unit of Mycology and Parasitology”, States Serum Institute, Copenhagen, Denmark, **Journal of Clinical Microbiology**, 45, No 4, 1200-1204.

14) **Burke J.** (1996). *PCR: essential techniques*. New Jersey. Wiley & Sons Publishers.

15) **Cafardi J.** (2012). *The Manual of Dermatology*. New York. Springer Publishers.

16) **Campbell AW, Anyanwu EC, Morad M.** (2004). “Evaluation of the drug treatment and persistence of onychomycosis”. **Scientific World Journal**; 4, 760-767.

17) **Carney C, Tosti A, Daniel. R, Scher R, Rich P, DeCoster J and Elewski B** (2011). “A new classification system for grading the severity of onychomycosis”. **Archives of Dermatology**,; 147; 11, 1277-1282.

18) **Cathcart S, Cantrell W, Elewski B.** (2009). “Onychomycosis and diabetes”. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**; 23, 1119-1122

19) **Davies RR** (1998), “Mycological tests and onychomycosis”. **Journal of Clinical Pathology**, 21, 6, 729-30.

20) **Denning D W, Evans E G V, Kibbler C C, Richardson M D, Roberts M M, Rogers T R, Warnock D W, Warren R E** (1995). “Fungal nail disease: a guide to good practice” (report of a Working Group of the British Society for Medical Mycology) **BMJ**, 311,1277-1281

21) **Devliotou- Panagiotidou D, Koussidou- Eremondi T, Karakatsanis G** (1992). « Dermatophytosis due to *Trichophyton rubrum* in northern Greece during the decade 1981-1990”. **Mycoses**, 3, :375-380

22) **Dhib I, Fathallah A, Yaacoub A, Slama H, Saidi M.B. and Zemni R.** (2014). “Multiplex PCR assay for the detection of common dermatophytes nail infection” **Mycoses**; 57, 19-26.

23) **Dorak T.** (2006). *Real-Time PCR*. New York. Taylor and Francis Publishers.

24) **Effendy I, Lecha M, Fenilhade de Chauvin M, Chiacchio N, Baran R** (2005) “Epidemiology and clinical classification of onychomycosis”. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, 19, 8-12

- 25) Einsele H., Hebart, H., Roller G. (1997). "Detection and Identification of Fungal Pathogens in Blood by using Molecular Probes". **Journal of Clinical Microbiology**, 3, :1353-1360.
- 26) Elewski B. (1993), "Clinical Pearl: Proximal white subungual onychomycosis in AIDS". **Journal of the American Academy of Dermatology**. 29:631.
- 27) Elewski B. (1998). "Onychomycosis: Pathogenesis, Diagnosis and Management". **Clinical Microbiology Reviews**, 11, 3, 415-429.
- 28) English, M. (1976)/ "Nails and fungi". **British Journal of Dermatology**, 94 : 697-701
- 29) Foster KW Ghannonm MA, Elewski BE. (2004) "Epidemiologic surveillance of cutaneous fungal infection in the United States from 1999-2002". **Journal of the American Academy of Dermatology**, 5, 748-752.
- 30) Frankel, D. (2006). *Field Guide to Clinical Dermatology*. Philadelphia. Lippincott Williams & Wilkins Publishers.( *Trichophyton rubrum*)
- 31) Friedlander, S.F., Chan, Y.C., Chan, Y.H., Eichenfield, L.F. (2012). "Onychomycosis Does Not Always Require Systemic Treatment for Cure: A Trial Using Topical Therapy". **Pediatric Dermatology**, 30, 3, 316-322.
- 32) Gavrieli Y, Sherman Y and Ben-Sasson S.A. (1992). "Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation". **Journal of Cell Biology**, 119, 493-501.
- 33) Gianni C, Romano C. (2004). "Clinical and histological aspects of toenail onychomycosis caused by *Aspergillus* spp: 34 cases treated with weekly intermittent terbinafine" .**Dermatology**, 209, 104-110.
- 34) Gow NA. (1997), "Germ tube growth of *Candida albicans*" .**Curr Top Medical Mycology**, 8, 1-2, 43-55
- 35) Grover C. and Khurana A. (2012). "Onychomycosis: Newer insights in pathogenesis and diagnosis". **Indian Journal of Dermatology, Venereology and Nephrology**, 78, 3, 263-270.
- 36) Gupta AK Gupta MA, Summebell RC (2000). "The epidemiology of onychomycosis: Possible role of smoking and peripheral arterial disease". **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, 14, 466-467.
- 37) Gupta A.K. and Simpson F. (2013) "Diagnosing onychomycosis". **Clinics in Dermatology**, 31, 540-543.
- 38) Habif T.P. (2010). *Clinical Dermatology*. San Francisco. Elsevier Publishers.

- 39) **Haneke, E.** (1991). "Fungal infections of the nail". **Seminars in Dermatology**. 10, 41-53.
- 40) **Harmsen D, Schwinn A, Broker EB** (1999). "Molecular differentiation of dermatophytes fungi". **Mycoses**; 42, 67–70.
- 41) **Hay RJ, Baran R, Haneke E. Fungal** (2001). (*Onychomycosis*) and other infections involving the nail apparatus. In: *Baran R, Dawber RPR. Diseases of the nails and their management*. 3<sup>rd</sup> Ed. London:Blackwell Science, 129-155
- 42) **Hermann Einsele, Holger Hebart, Gottfried Roller** (1997). "Detection and Identification of Fungal Pathogens in Blood by using Molecular Probes". **Journal of Clinical Microbiology**, 35, 1353-1360.
- 43) **Iorizzo M, Piraccini B.M. and Tosti A.** *New fungal nail infections*. Current Opinion in Infectious Diseases. (2007) 20, 2: 142-145.
- 44) **Iwona Dabrowska, Bozena Dworecka-Kaszak and Anna Brillowska-Dabrowska** (2014). "The use of a one-step PCR method for the identification of *Microsporium canis* and *Trichophyton mentagrophytes* infection of pets". **University of Technology, Department of Act ABP**, 61, 2, 375-378.
- 45) **Jiaravuthisan MM, Sasseville D, Vender RB,** (2007), "Psoriasis of the nail: anatomy, pathology, clinical presentation, and a review of the literature on therapy". **Journal of American Academy of Dermatology**, 1, 1-27
- 46) **Jose Cano, Antonio Rezusta, Maria Sole** (2004), **Journal of Dermatological Science**, 34, 35-48.
- 47) **Kanbe T.** (2008). "Molecular approaches in the diagnosis of dermatophytes". **Mycopathologia**; 166, 307-317.
- 48) **Kang D, Son GH, Park HM, Kim J,** (2013) "Culture condition-dependent metabolite profiling of *Aspergillus fumigatus* with antifungal activity". **Fungal Biology**, 117, 211-219.
- 49) **Kardjeva V, Summerbell R, Kantardjiev T, Devliotou – Panagiotidou D, Sotiriou E, Graser Y.** (2007). "Forty-eight- hour diagnosis of onychomycosis with subtyping of *Trichofyton rubrum*". **Journal of Clinical Microbiology**; 45(4), 1419-1427.
- 50) **Kaur R, Kashyap B, Bhalla P.** (2008). "Onychomycosis- epidemiology, diagnosis and management". **Indian Journal of Medical Microbiology**, 26, 108-116
- 51) **Kemna M.E, Elewski B.E.** (1996). "Epidemiologic survey of superficial fungal diseases", **Journal of American Academy of Dermatology**, 35, 4, 539-542.



- 52) **Larone DH**, (2002), *medically important fungi. A guide to identification*. 4<sup>th</sup> ed. Washington, DC.
- 53) **Li XF, Tian W, Wang H**, et al. (2011). Direct detection and differentiation of causative fungi of onychomycosis by multiplex polymerase chain reaction-based assay. **Journal of the European Academy of Dermatology**. 21, (1), 37-42.
- 54) **Liu D, Coloe S, Bairid R and J. Pedersen**. (2000), “Application of PCR to the identification of dermatophyte fungi”, **Journal of Medical Microbiology**, 49, 493-497.
- 55) **Loeffler J, Schmidt K, Hebart H, Schumacher U and Einsele H**. (2002). “Automated Extraction of Genomic DNA from Medically Important Yeast Species and Filamentous Fungi by Using the MagNa Pure LC System”. **Journal of Clinical Microbiology**, 40, 6, 2240-2243.
- 56) **Luck N.M, M. Hui, T. S. Cheng, L. S. Tang and K. M. Ho**. (2012). “Evaluation of PCR for the diagnosis of dermatophytes in nail specimens from patients with suspected onychomycosis”. **British Association of Dermatologists. Clinical and Experimental Dermatology**, 37, 230-234.
- 57) **M. R. Wilson, D. Polanskey, J. Butler, J. Bulter, J.A. Dizinno, J. Replogle, B. Budowle**. (1995). *Extraction PCR amplification and sequencing of mitochondrial DNA from human hair shafts. Bio techniques*;. **FBI Academy**, Quantico, VA, USA. 18(4), 662-9.
- 58) **Madigan M.T, Martinko J. M and Parker J. Brock**. (2012). *Biology of Microorganisms*. San Francisco. Pearson Publishers.
- 59) **McPherson M, Taylor G.R. and Quirke P**. (2006). *PCR a practical approach*. Oxford University Press. New York. Taylor and Francis Publishers.
- 60) **Ogawa H, Summerbell R.C, Clemons K.V, Koga T**. (1998). “Dermatophytes and host defense in cutaneous mycoses”. **Medical Mycology**, 1, 166-173.
- 61) **P. Lewis White, Richard Barton, Malcom Guiver**. (2006). “A Consensus on Fungal Polymerase Chain Reaction Diagnosis?” **Journal of Molecular Diagnostics**, 8, 3.
- 62) **Pankewitz F, Nenoff P, Uhrlab S, Bezold G, Winter I and Gräser Y**. (2013) “Development of a novel PCR –enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of *Trichophyton rubrum* onychomycosis”. **British Journal of Dermatology** 168, 1236-1242.
- 63) **Petrini B and M. L.von Rosen**. (2002). “Optimal dermatophyte diagnosis requires both microscopy and culture”. **Lakartidningen**, 99, 4084.

- 64) **Piraccini B.M.** (2013). *Nails Disorders. A practical Guide to Diagnosis and Management*. New York. Springer Publishers.
- 65) **Ralph D.** (1996). *Diagnosis of Onychomycosis and Other Nail Disorders*. New York. Springer Publishers.
- 66) **Rasmus H. Jensen, Maiken C.** (2012). *Arendrup. Molecular of dermatophytes infections*. Wolters Kluwer Health, 25.
- 67) **Robert R, Pihet M.** (2008). "Conventional methods for the diagnosis of dermatophytosis". **Mycopathologia**, 166, 295-306
- 68) **Roberts, D.T.** (1992) "Prevalence of dermatophyte onychomycosis in the United Kingdom. Results on an omnibus survey". **British Journal of Dermatology**. 126, 39, 23-27.
- 69) **Roujeau JC, Sigurgeirsson B, Korting HC** (2004). ."Chronic dermatomycoses of the foot as risk factors for acute bacterial cellulitis of the leg: a case-control study". **Dermatology**; 209, 301-307.
- 70) **Seebacher C, Brasch J, Abeck I, Cornely O, Effendy I, Ginter-Hanselmayer G** (2007). "Onychomycosis". **Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft**, 5, 61-6.
- 71) **Segal R, Kimchi A, Kritzman A,** (2000). "The frequency of *Candida parapsilosis* in onychomycosis. An epidemiological survey in Israel". **Mycoses**. 43, 349-5.
- 72) **Shaw JW, Joish VN, Coons SJ.** (2002). "Onychomycosis: health-related quality of the life considerations". **Pharmacoeconomics**, 20, 1, 23-36.
- 73) **Shemer A, Davidovici B, Grunwald MH, Trau H, Amichai B.**(2009) "Comparative study of nail sampling techniques in onychomycosis". **Journal of Dermatological Treatment**, 36, 410-4.
- 74) **Sher, R.K., Ackerman, A.B.** (1980) "Subtle clues to diagnosis from biopsies nails". **American Journal of Dermatological Pathology**, 2, 225-227.
- 75) **Siegfried, N. and Korting, H.C.**(1990) *Onychomycoses*. New York. Springer Publishers.
- 76) **Smith KJ, Neafle RC, Skelton HG, Barret TL, Graham JH, Lupton GP.** (1991). "Majocchi's granuloma". **Journal of Cutaneous Pathology**, 18, 28-35.
- 77) **Summerbell RC, Cooper E, Bunn U** (2005). "Onychomycosis: a critical study of Techniques and criteria for confirming the etiologic significance of nondermatophytes", **Medical Mycology**, 43, 39-59.

- 78) Szepietowski JC, Reich A, Garlowska E, Kulig M, Baran E, (2006).** “Onychomycosis Epidemiology Study Group. Factors influencing coexistence of toenail onychomycosis with tinea pedis and other dermatomycoses: a survey of 2761 patients”. , **Archives of Dermatological Research**, 142, 1279-1284
- 79) Tahir M.A and Watson N. (1995),** “Typing of DNA HLA-DQa Alleles Extracted from Human Nail Material Using Polymerase Chain Reaction”. **Journal of Forensic Sciences, JFSCA**, 40, 4, 634-636.
- 80) Tamaki Z, Asano Y, Hatano M (2012),** “Efficacy of low-dose imatinib mesylate for cutaneous involvement in systemic sclerosis: a preliminary report of three cases”, **Journal: Modern Rheumatology**, 22, 1, 94-99
- 81) Tan CS, Hoekstra ES, Samson RA. (1994).** *Fungi that cause superficial mycoses*. Baam: The Netherlands.
- 82) Tosti A, Piraccini BM, Lorenzi S, Iorizzo M. (2003).** “Treatment of nondermatophyte mold and candida onychomycosis”. **Dermatologic Clinics**, 21, 491-497.
- 83) Trofa, D., Gacser, A. and Nosanchuk, J. (2008).** “*Candida parapsilosis*, an Emerging Fungal Pathogen”. **Clinical Microbiology Reviews**. 21, 4, 606-625.
- 84) Weitzman I, Summerbell R. (1995).** “The Dermatophytes”. **Journal of Clinical Microbiology**, 8, 240-259.
- 85) Weller, R., Hunter, J. and Dahl, S.M. (2008),** *Clinical Dermatology*. Massachussets Blackwell Publishing.
- 86) Zabawski EJ Jr, Washak RV, Cohen JB (2001).** “Squamous cell carcinoma of the nail bed: is finger predominance another clue to etiology? A report of 5 cases” .**Cutis**, 67, 1, 59-64.
- 87) Zaias, N. (1972)** “Onychomycosis”. **Archives of Dermatology**; 105, 267-274.

## Ελληνική

- 1. Abraham L. Kierszenbraum- Laura L. Tresg (2012),** *Ιστολογία με Στοιχεία Κυτταρικής Βιολογίας- Εισαγωγή στην Ιστοπαθολογία* .Γενική επιμέλεια Ελληνικής έκδοσης Β. Γοργούλης. Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης. Κεφ18: 499.
- 2. Luiz Carlos Junqueira-Jose Carneiro, (2004)** *Βασική Ιστολογία II* Γενική επιμέλεια Ελληνικής έκδοσης Κίττας Χρήστος. Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης. 262.

3. **William K. Ovalle-Patrick C. Nahirney** (2008), *Ιστολογία*, Γενική επιμέλεια Ελληνικής έκδοσης Λ. Ανδριοπούλου-Οικονόμου. Αθήνα 2012. Εκδόσεις Π.Χ.Πασχαλίδης. 448-449.
4. **Αραμπατζής, Μ. & Βελεγράκη, Α.** (2009) *1910-2009. Ένας αιώνας trichophyton rubrum. Εφαρμοσμένη Κλινική Μικροβιολογία και Εργαστηριακή Διαγνωστική*. Περίοδος Β', Τόμος 14; 1: 9-20.
5. **Βυζαντιάδης, Τ.Α.** (2010). *Διεισδυτικές ασπεργιλλώσεις. Εργαστηριακή διάγνωση και παρακολούθηση. Εφαρμοσμένη Κλινική και Εργαστηριακή Διαγνωστική Περίοδος Β' 15; 4 : 174-188.*
6. **Μιχαήλογλου-Φραγκούλη Έφη.** (2009). *Επιπολής Μυκητιάσεις. Εργαστηριακή Διάγνωση*. Αθήνα: Κάφκας.
7. **Μπίμπαση –Τσουμπλέκη** (2010), *Στοιχεία Ιατρικής Μυκητολογίας*. University studio press
8. **Ρηγόπουλος Δημήτριος** (2006) *Άτλας Φυσιοπαθολογίας-Ονχοκομίας*,. Πρώτη έκδοση. Ιατρικές Εκδόσεις Β. Παρισιάνος.
9. **Σωτηριάδης Δ, Πατσατσή Α.**(2005), *Ελληνική Επιθεώρηση Δερματολογίας-Αφροδισιολογίας*. 16, 57-62

## Παράρτημα 1

**Πίνακας 1. Δημογραφικά στοιχεία θετικών δειγμάτων**

αριθ. δείγμα	ηλικία	φύλο	επάγγελμα	κατοικίδιο	είδος δείγματος	κλινική εικόνα	αποτέλεσμα καλλιέργειας
150	75	θήλυ	υπάλ.φαρμακαποθήκης	όχι	ριν.ονυχ.ποδιού	πιθανή σκληροδερμία, ιστορικό δερματίτιδας.	<i>T.rubrum</i>
151	76	θήλυ	συνταξιούχος	όχι	ριν.ονυχ.χεριού	τραυματική ονυχία,υπερκεράτωση	<i>C. tropicalis</i>
153	57	θήλυ	δημόσιος υπάλληλος	όχι	ριν.ονυχ.χεριού	ονυχόλυση,παρωνυχία	<i>C. guilliermondii</i>
154	25	άρρεν	άνεργος	όχι	ριν.ονυχ.ποδιού	τραυματική ονυχία,υπερκεράτωση	<i>T.rubrum</i>
155	57	θήλυ	άγνωστο	όχι	ριν.ονυχ.ποδιού	πάχυνση,υπερκεράτωση	<i>T.terrestre</i>
192	58	θήλυ	οικιακά	όχι	ριν.ονυχ.χεριού	ονυχία όλων των δακτύλων χεριών-ποδιών	<i>C. parapsilosis</i>
217	31	θήλυ	ιδιωτικός υπάλληλος	σκύλος-γάτα	ριν.ονυχ.ποδιού	υπονύχια υπερκεράτωση,ονυχόλυση,σκληρύνηση	<i>T.interdigitale</i>
236	39	θήλυ	ιδιωτικός υπάλληλος	όχι	ριν.ονυχ.ποδιού	παρωνυχία, δευτεροπαθής ονυχία,καντιντιακή ονυχία	<i>C. tropicalis</i>
149	59	άρρεν	γυμναστής	όχι	ριν.ονυχ.ποδιού	ονυχόλυση, υπονύχια υπερκεράτωση	<i>T.rubrum</i>
157	44	θήλυ	δασκάλα	όχι	ριν.ονυχ.χεριού	ονυχία δείκτη αρ.χεριού	<i>C. parapsilosis</i>
159	55	άρρεν	δημόσιος υπάλληλος	όχι	ριν.ονυχ.ποδιού	τραυματική ονυχία κατά την άθληση	<i>T.rubrum</i>
160α	76	άρρεν	συνταξιούχος	όχι	ριν.ονυχ.χεριού	τραυματική ονυχία αντίχειρα	<i>Trichophyton sp.</i>
160β	76	άρρεν	συνταξιούχος	όχι	ριν.ονυχ.ποδιού	τραυματική ονυχία μεγάλων δακτύλων ποδών	<i>Trichophyton sp.</i>
163	74	θήλυ	συνταξιούχος	όχι	ριν.ονυχ.χεριού	ονυχία χεριού	<i>C. lambica</i>
170α	66	θήλυ	άγνωστο	όχι	ριν.ονυχ.χεριού	ονυχία χεριού	<i>C. guilliermondii</i>
185	75	άρρεν	συνταξιούχος	όχι	ριν.ονυχ.ποδιού	ονυχία δακτύλων ποδιών	<i>Trichophyton</i>
192α	57	θήλυ	οικιακά	όχι	ριν.ονυχ.χεριού	ονυχία δακτύλων ποδιών και χεριών	<i>C. parapsilosis</i>
193α	74	άρρεν	συνταξιούχος ηλ.μηχ.	όχι	ριν.ονυχ.χεριού	ονυχία χεριού	<i>Trichophyton sp.</i>

**Πίνακας 1 (Συνέχεια). Δημογραφικά στοιχεία θετικών δειγμάτων**

193β	74	άρρεν	συνταξιούχος ηλ.μηχ.	όχι	ριν.ονυχ.ποδιού		<i>T.rubrum</i>
198α	53	θήλυ	άγνωστο	όχι	ριν.ονυχ.χεριού	έκζεμα υπερκερατωσικό στα χέρια, ονυχοδυστροφία	<i>C. tropicalis</i>
198β	53	θήλυ	άγνωστο	όχι	ριν.ονυχ.ποδιού	ονυχία ποδιών	<i>C. guilliermondii</i>
206	30	θήλυ	νοσηλεύτρια	όχι	ριν.ονυχ.ποδιού	έκζεμα ποδών ,πιθανή ψωρίαση πελμάτων, τραυματική ονυχία	<i>T.rubrum</i>

207α	32	άρρεν	άγνωστο	όχι	ριν.ονυχ.ποδιού	σκλήρυνση ονύχων ποδιών, υπονύχια υπερκεράτωση	<i>Scopulariopsis</i>
209β	42	θήλυ	άγνωστο	σκύλος	ριν.ονυχ.ποδιού	υπερκεράτωση πελμάτων, ονυχία	<i>T.rubrum</i>
212	57	θήλυ	αγρότισσα	όχι	ριν.ονυχ.ποδιού	ιστορικό μυκητίασης, υπερκεράτωση, αλλαγή χροιάς	<i>T.rubrum</i>
216	53	άρρεν	δημόσιος υπάλληλος	όχι	ριν.ονυχ.ποδιού	ονυχία, αλλαγή χροιάς	<i>T.rubrum</i>
220	32	άρρεν	ιδιωτικός υπάλληλος	όχι	ριν.ονυχ.ποδιού	ονυχόλυση	<i>T.rubrum</i>
226	70	θήλυ	συνταξιούχος	όχι	ριν.ονυχ.ποδιού	αλλαγή χροιάς, υπερκεράτωση ,εικόνα εγγύς υπονύχιας ονυχ. αλλαγή χροιάς, υπονύχια, υπερκεράτωση, πάχυνση	<i>Acremonium sp.</i>
230	72	άρρεν	συνταξιούχος εργάτης	όχι	ριν.ονυχ.ποδιού	ονύχ.ποδιών	<i>Acremonium sp.</i>
231β	79	άρρεν	αγρότης	όχι	ριν.ονυχ.ποδιού	ιστορικό εγκαύματος ποδιών, ονυχοδυστροφία	<i>C. parapsilosis</i>
239	73	θήλυ	συνταξιούχος δ/υ	όχι	ριν.ονυχ.ποδιού	ονυχόλυση, αλλαγή χροιάς	<i>T.rubrum</i>

**Πίνακας 2. Δημογραφικά στοιχεία αρνητικών δειγμάτων**

Αριθ. δείγματος	ηλικία	φύλο	επάγγελμα	κατοικίδιο	είδος δείγματος	πάθηση	αποτέλεσμα καλλιέργειας
203	30	άρρεν	ιδιωτικός υπάλληλος	όχι	ρινίσματα ονύχων ποδιών	μυρμηγκίες, ονυχία	αρνητικό
218	54	θήλυ	λογίστρια	όχι	ρινίσματα ονύχων ποδιών	σκλήρυνση, ονυχία	αρνητικό
142	32	άρρεν	ιδιωτικός υπάλληλος	όχι	ρινίσματα ονύχων ποδιών	πάχυνση ονύχων, αλλαγή χροιάς, ονυχόλυση	αρνητικό
143	40	θήλυ	άγνωστο	όχι	ρινίσματα ονύχων ποδιών	ονυχόλυση, αλλαγή χροιάς, πάχυνση ονύχων, πιθανή τραυματική ονυχία	αρνητικό
152β	48	θήλυ	οικιακά	όχι	ρινίσματα ονύχων ποδιών	Υπερκεράτωση, πάχυνση ονύχων, αλλαγή χροιάς	αρνητικό
161	72	θήλυ	αγρότισσα	όχι	ρινίσματα ονύχων ποδιών	πιθανή τραυματική ονυχία	αρνητικό
162	65	θήλυ	άγνωστο	όχι	ρινίσματα ονύχων ποδιών	πιθανή ψωριασική ονυχία	αρνητικό
170β	66	θήλυ	άγνωστο	όχι	ρινίσματα ονύχων ποδιών	ονυχία ποδιών	αρνητικό
196	49	θήλυ	άγνωστο	όχι	ρινίσματα ονύχων ποδιών	ιστορικό τραυματικής ονυχίας	αρνητικό
204	71	άρρεν	άγνωστο	όχι	ρινίσματα ονύχων ποδιών	ονυχία ποδιών	αρνητικό
205	25	θήλυ	πωλήτρια	όχι	ρινίσματα ονύχων ποδιών	πιθανή τραυματική ονυχία	αρνητικό
211	44	θήλυ	άγνωστο	όχι	ρινίσματα ονύχων ποδιών	ιστορικό εκζέματος και τραυματικής ονυχίας	αρνητικό
215	46	θήλυ	δημόσιος υπάλληλος	όχι	ρινίσματα ονύχων ποδιών	ιστορικό εκζέματος, σκλήρυνση και ονυχόλυση	αρνητικό
232	76	θήλυ	συνταξιούχος γεωργός	όχι	ρινίσματα ονύχων ποδιών	αλλαγή χροιάς, υπονύχια υπερκεράτωση, πάχυνση	αρνητικό

**Πίνακας 3. Αποτελέσματα χρόνου και κόστους εκτέλεσης κάθε πρωτοκόλλου**

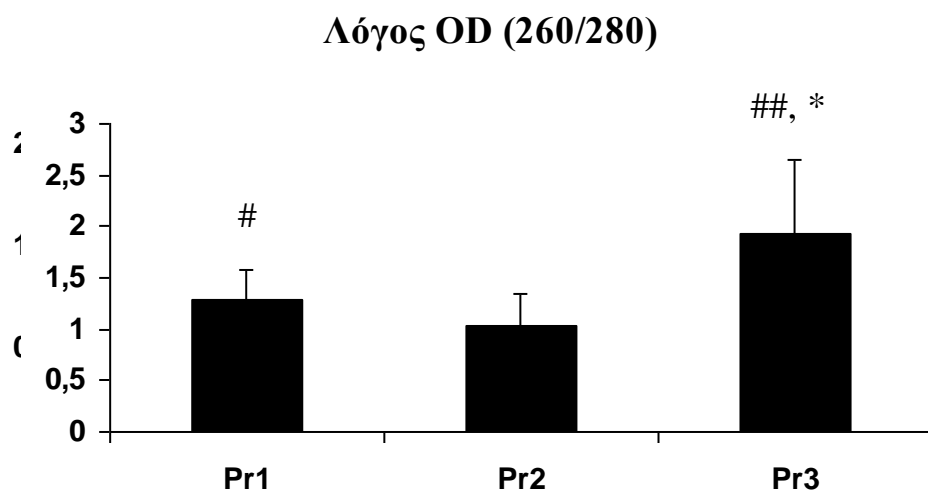
	Πρωτόκολλο 1 (Pr1)	Πρωτόκολλο 2 (Pr2)	Πρωτόκολλο 3 (Pr3)	
<b>Χρόνος εκτέλεσης πρωτοκόλλου/δείγματος</b>	23 ώρες	1 ώρα κ 20 λεπτά	19 ώρες κ 83 λεπτά	
<b>κόστος πρωτοκόλλου/δείγματος</b>	7,54 ευρώ	0,101 ευρώ	13,5 ευρώ	

**Πίνακας 4. Υπολογισμός μέσης τιμής των διαμέσων τιμών κάθε παραμέτρου**

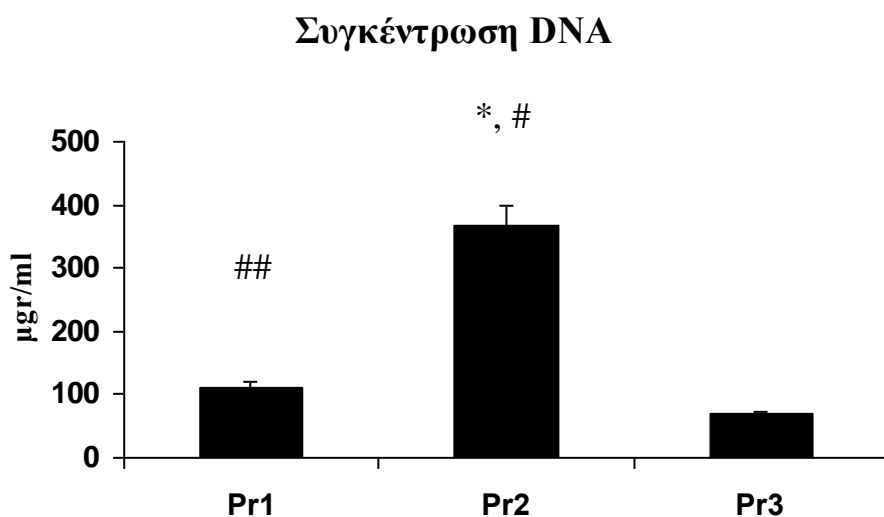
πρωτόκολλο	MT (±)TA
<b>Pr1</b>	<b>1,94±0,25</b>
<b>Pr2</b>	<b>5,34±0.92</b>
<b>Pr3</b>	<b>1,89±0,7</b>



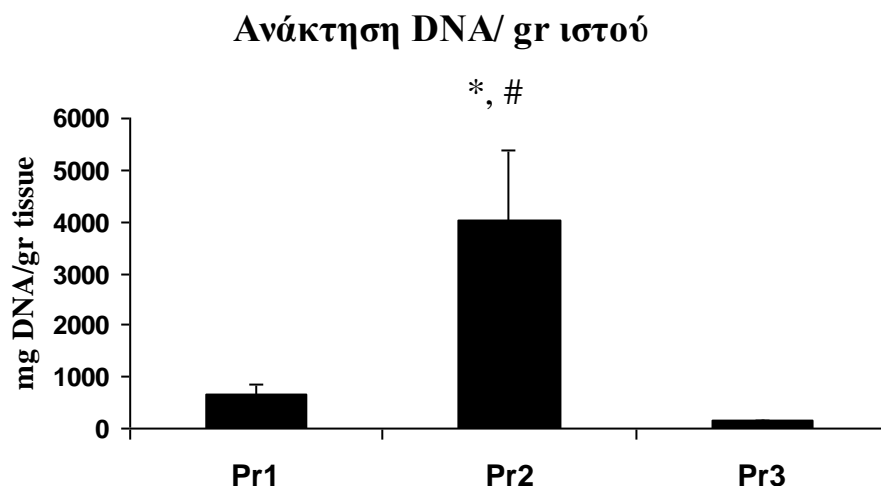
## Παράρτημα 2



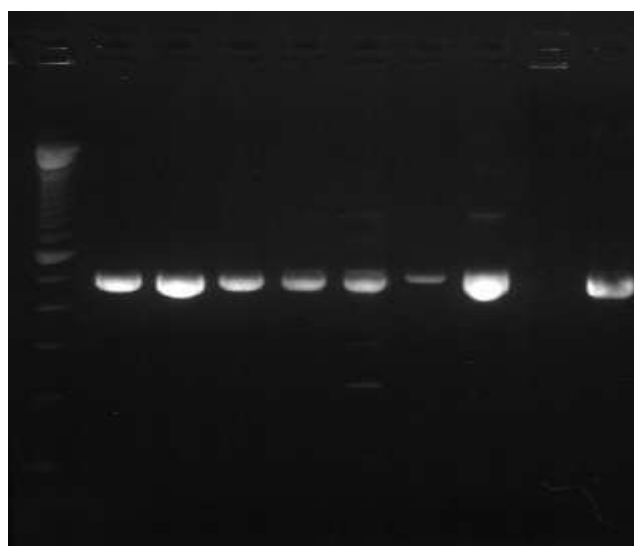
**Σχήμα 1.** Ο λόγος OD 260/280 στο σύνολο των δειγμάτων στα τρία εξεταζόμενα πρωτόκολλα. Μέση τιμή±SEM. Στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα, # Pr1 και Pr2, ## Pr3 και Pr1, \* Pr3 και Pr2



**Σχήμα 2.** Η συγκέντρωση του DNA στο σύνολο των δειγμάτων, στα τρία εξεταζόμενα πρωτόκολλα. Μέση τιμή±SEM. Στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα: # Pr2 και Pr3, \* Pr2 και Pr1, ## Pr1 και Pr3



**Σχήμα 3.** Η ανάκτηση του DNA ανά γραμμάριο ιστού, στο σύνολο των δειγμάτων, στα τρία εξεταζόμενα πρωτόκολλα. Μέση τιμή±SEM. Στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα: # Pr2 και Pr1, \* Pr2 και Pr3.

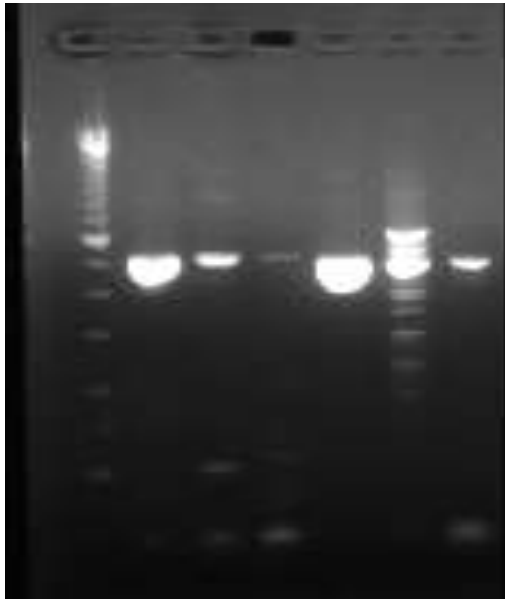


#### 18S πανμυκητιακή PCR στήλη

1. 100 bp DNA ladder
2. Prot1, θετικό δείγμα για *C. quilliermondii*
3. Prot2, “
4. Prot3, “
5. Prot1, θετικό δείγμα για *Trichophyton sp.*
6. Prot2, “
7. Prot3, “
8. Prot1, θετικό δείγμα για *Trichophyton sp.*
9. Prot2, θετικό δείγμα σε κ/α (*Trichophyton sp.*)
10. Prot3, θετικό δείγμα για *Trichophyton sp.*

DNA: 13 µg/mL

**Εικόνα 1.** LL, 198 B (1, 2, 3), 159 (1, 2, 3), 160 A (1, 2, 3).



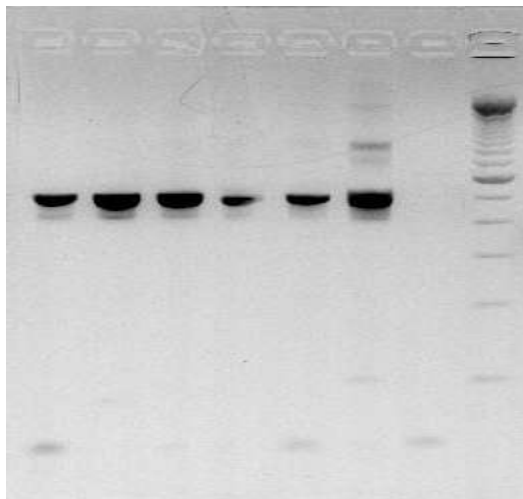
### 18S πανμυκητιακή PCR

στήλη

1. 100 bp DNA ladder
2. Prot1, θετικό δείγμα για *T. rubrum*.
3. Prot2, “
4. Prot3, “
5. Prot1, θετικό δείγμα για *C. tropicalis*
6. Prot2, “
7. Prot3. “

DNA: 13 μg/mL

**Εικόνα 2.** LL, 220-1, 2, 3, 236-1, 2, 3.



### 18S πανμυκητιακή PCR

στήλη

1. Prot1, θετικό δείγμα για *Trichophyton sp.*
2. Prot2, “
3. Prot3, “
4. Prot1, θετικό δείγμα για *C. parapsilosis*
5. Prot2, “
6. Prot3, “
7. αρνητικό δείγμα
8. 100 bp DNA ladder

DNA: 13 μg/mL

**Εικόνα 3.** 185 (1, 2, 3), 231 (1, 2, 3), (-), LL.