

## Молекулярная диагностика онихомикозов: опыт внедрения отечественной ПЦР-системы обнаружения возбудителей дерматофитии ногтей

В.Ю. Сергеев

Московская медицинская академия имени И.М. Сеченова

## Molecular diagnosis of onychomycosis: clinical experience with Russian PCR system for direct detection of tinea unguium agents

V.Y. Sergeev

I.M. Sechenov Moscow Medical Academy

### Аннотация

В 2004 г. в России была разработана новая система молекулярно-генетической (ПЦР) диагностики онихомикозов, по своим параметрам опередившая зарубежные аналоги и успевшая пройти клиническую апробацию. Проведенные слепое и первое многоцентровое (2004-2005 гг.) исследования подтвердили высокую общую точность нового метода (94%), позволяющего за 1 сутки подтверждать диагноз дерматофитии ногтей, и, по совокупности характеристик претендующего на место золотого стандарта лабораторной диагностики онихомикозов. Наше исследование (2005-2006 гг.) с проведением массовой ПЦР-диагностики в стандартных клинических условиях (изучено 2045 образцов материала из ногтей) подтвердило высокую прогностическую ценность ПЦР при поражениях ногтей в целом (88,07%), с учетом случаев недерматофитного (ПЦР-негативного) онихомикоза. Анализ результатов молекулярно-генетических исследований указывает на необходимость пересмотра существующих подходов к диагностике и оценке этиологии онихомикоза. Внедрение новой отечественной ПЦР-системы позволяет сформулировать новые алгоритмы лабораторной диагностики онихомикоза, повысить общую эффективность и существенно сократить сроки ее проведения.

### Ключевые слова

Полимеразная цепная реакция, ПЦР, молекулярно-генетические методы, лабораторная диагностика, микология, онихомикоз, дерматофиты, заболевания ногтей

Недостатки световой КОН-микроскопии и культивирования, долгие годы остававшихся единственными методами лабораторной диагностики онихомикозов, осознали давно [1, 2, 3, 4]. В последние годы субоптимальная эф-

### Summary

In 2004, the new Russian system of molecular diagnosis of onychomycosis (multiplex PCR for *T. rubrum* and *T. mentagrophytes*) was developed and successfully tested. Single-blinded (2004) and first multicenter (2005) studies have proven the high (94%) overall diagnostic accuracy of 24-hour PCR test of onychomycosis, placing the method as new gold standard of diagnosis for this condition. The new study of PCR in routine dermatological practice (2005-2006, number of nail samples studied 2045) had shown high diagnostic value of this system, exceeding 88% in all cases of onychomycosis, including non-dermatophytic (PCR-negative) samples. The study results anticipate significant changes in our common views on onychomycosis etiology and principles of mycological diagnosis. Introduction of new PCR system allows formulating new algorithm of laboratory investigations for onychomycosis, making them rapid and more effective.

### Keywords

Polymerase chain reaction, PCR, molecular diagnostics, laboratory diagnosis, mycology, onychomycosis, dermatophyte, nail disease

фективность классических методов лабораторной диагностики в подтверждении клинического диагноза онихомикоза дополняется теми погрешностями, которые они вносят в исследование этиологии и эффективности терапии, в ча-

стности – в определение критерия микологического излечения [5]. Поэтому поиск и внедрение новых, более эффективных и, вместе с тем, пригодных для повседневного использования методов лабораторного подтверждения диагноза, наряду с установлением этиологии инфекции, стал задачей для многих исследовательских коллективов. Как показал опыт использования генодиагностики в венерологии и диагностике ряда контагиозных инфекций человека, вызванных облигатно-патогенными возбудителями, наибольшей степени этим требованиям удовлетворяют молекулярно-генетические методики, в частности – ПЦР [6]. Вместе с тем, в клинической микологии использование молекулярно-генетических методов после 2000 г. еще находилось в фазе становления [7, 8].

### Предыстория молекулярной диагностики дерматофитии

Активные поиски методов генодиагностики дерматофитии начались в конце 1990-х гг. Им предшествовали работы в области генетики и геносистематики дерматофитов, позволившие во многом переоценить взгляды на таксономию семейства *Arthrodermataceae*, филогенез, номенклатуру и видовой состав родов *Trichophyton* и *Microsporum*. Пионерами в разработке молекулярных методов идентификации дерматофитов стали коллективы европейских (Германия, Нидерланды, Франция) и японских исследователей, а сами методы исходно базировались на тех же технологиях (RFLP, анализ ITS-последовательностей и др.), которые использовались в работах этих авторов по молекулярной систематике, имевших не прикладной, а фундаментальный характер [9, 10, 11].

Одной из первой попыток создать метод для клинической диагностики онихомикоза стала работа Machouart-Dubach M. и соавт. [12], сообщивших о возможности быстрой дифференциации между видами дерматофитов и других грибов с использованием ПЦР-RFLP (restricted fragment length polymorphism, методика, в ходе которой продукты ПЦР-амплификации обрабатываются специфичными ферментами-эндонуклеазами). Был использован ген, кодирующий гипервариабельный домен V4 малой субъединицы рибосомы 18S, последовательности были взяты для 9 видов дерматофитов, 2 видов *Scytalidium* и еще 6 плесневых и 2 дрожжевых грибов, и на этой основе изготовлены наборы праймеров и методика для их обработки в ходе RFLP. Всего

было изучено 75 клинических образцов от больных дерматомикозами, и в 74 случаях результат исследования совпал с данными культивирования. Несмотря на то, что процесс ПЦР-RFLP у авторов занял 24 часа, сама технология RFLP доступна в немногих медицинских лабораториях мира (обычно в судебной медицине), требует особых организационных мероприятий и весьма трудоемка. Кроме того, авторы указывают на важность специальной подготовки материала [12].

Относительная неудача постигла турецких исследователей, у 52 пациентов использовавших ПЦР без RFLP с похожими последовательностями и получивших 38% положительных результатов в ПЦР при 77% положительных результатов микроскопии [13].

Для идентификации видов дерматофитов R. Gutzmer и соавт. [14] использовали ПЦР-систему LightCycler с 7 наборами праймеров для 21 вида грибов, параллельно также применяли RFLP. Для определения вида дерматофитов и плесневых грибов требовалось не менее 2 реакций ПЦР в системе LightCycler. Использование системы для исследования образцов от 38 с дерматомикозами дало 23,7% прирост числа положительных результатов по сравнению с классическими методами диагностики. Несмотря на возможную перспективность метода, стоимость исследования на такой системе (в настоящее время системы LightCycler обеспечивают ПЦР в режиме реального времени и гибридизацию) исключает его применение в дерматомикологии [14].

Последним (к концу 2005 г.) достижением европейских научных коллективов в разработке клинически-значимых методов генодиагностики онихомикозов стал совместный проект немецких, греческих, болгарских и голландских ученых, результаты которого обещают диагноз онихомикоза в двухдневный срок [15]. В его разработке приняли участие известные исследователи дерматофитов Y. Grdser и R. Summerbell. Использовали видоспецифичные пары праймеров и микросателлитные маркеры T1, основанные на GT-повторах, позволяющие диагностировать *T. rubrum*. Для диагностики онихомикоза, вызванного другими видами, использовали ITS-область гДНК. Помимо диагностики онихомикоза, авторы ставили задачу типирования недавно открытых штаммов *T. rubrum*, для чего применялась сепарация T1-продуктов ПЦР на полиакриламидном геле. Всего изу-

чили 195 образцов и 66 выделенных в культуре видов от 261 пациента из Болгарии и Греции. Чувствительность ПЦР составила 77% при 22% для посева, при этом чувствительность микроскопии оказалась выше, а специфичность ПЦР достигла 100%. Отказавшись от типирования и расширенных исследований этиологии, авторы предложили сократить время диагностики до 24 ч [15].

Японские исследователи [16] предложили использовать в качестве генетического маркера для диагностики онихомикоза ген хитин-синтазы (CHS1), ранее примененный ими для изучения филогенетических взаимоотношений в родах *Microsporium* и *Trichophyton*. Однако данная методика не получила развития на практике.

Китайские исследователи [17] применили метод гнездовой (nested) ПЦР для определения генетического материала дерматофитов в кожных чешуйках. Были использованы пары праймеров с ITS1/ITS5 и ITS2/ITS4. От 112 пациентов были получены 196 культур, при этом чувствительность посева составила 22%, а ПЦР – 50% [17].

Новое направление в изучении дерматофитов – использование в идентификации видов *Trichophyton*, *Microsporium* и *Epidermophyton* ген ДНК-топоизомеразы II. Развитие этого метода другими исследователями позволило использовать ПЦР-RFLP уже в лабораторной диагностике дерматофитии, применяя различные наборы праймеров. Авторы сообщили о совпадении результатов ПЦР-RFLP и культивирования [16].

### Создание генетических зондов для диагностики онихомикозов в России

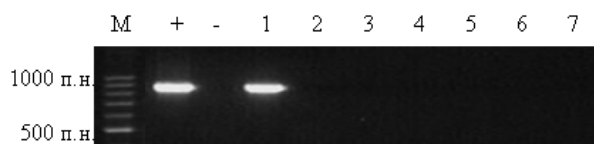
В 2004 г. в России были разработаны и успешно применены в клинических условиях первые генетические зонды для прямой диагностики дерматофитии кожи, волос и ногтей [18]. Данный проект был инициирован в 2003 г. Национальной академией микологии, с целью изучения возможности применения ПЦР в выявлении *Trichophyton rubrum* в клинических образцах. Затем был создан аналогичный метод для *Trichophyton mentagrophytes* [18].

В рамках данного проекта работы по созданию праймеров выполнялись совместно с НПФ «Гентех» и Институтом молекулярной генетики РАН. За основу была взята методика, использующая последовательности ДНК-топоизомеразы II, специфичные для отдель-

ных видов дерматофитов. Выделение ДНК из клинических образцов для ПЦР-анализа проводили на наборе «Реамикс» с предварительной инкубацией в течение 2 ч при 37°C в лизирующем растворе. Амплификацию проводили на диагностическом наборе «ТрифАм» НПФ «Гентех» (Москва) с праймерами, специфичными для *Trichophyton rubrum* (ген ДНК топоизомеразы II, размер амплифицируемого фрагмента – 925 п.н.).

Культуры дерматофитов были выделены от пациентов с различными формами дерматофитии, идентифицированы и предоставлены лабораториями Московского городского микологического центра КВКД №1 и МЦ УДП РФ.

Методом ПЦР были проверены культуры дерматофитов следующих видов: *Trichophyton rubrum* (1), *Microsporium canis* (2), *Epidermophyton floccosum* (3), *Trichophyton violaceum* (4), *Trichophyton tonsurans* (5), *Trichophyton mentagrophytes var. gypseum* (6), *Trichophyton mentagrophytes var. interdigitale* (7). Для постановки положительного контроля были сконструированы плазмиды, содержащие искомые последовательности *T. rubrum*. Результаты тестирования данного метода представлены на рис. 1.



**Рис. 1. Видоспецифичность маркеров для определения *T. rubrum***

Примечания. М маркер молекулярного веса от 500 п.н. до 1000 п.н. с шагом 100 п.н.; + положительный контроль; – отрицательный контроль; 1–7 культуры дерматофитов.

Затем такое же исследование было выполнено для *T. mentagrophytes*. Подтвержденная видоспецифичность полученных меток позволила приступить к первичному тестированию чувствительности и специфичности в клинических условиях.

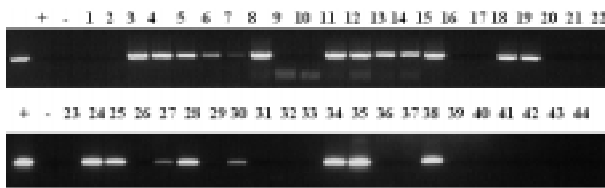
К началу 2004 г. было завершено первое исследование, изучавшее точность нового метода диагностики в клинических условиях. Клинический материал был получен от больных онихомикозами в нескольких дерматологических и микологических центрах г. Москвы.

Всего в исследовании приняли участие 44 пациента. Среди изучавшихся образцов 23 представляли собой фрагменты ногтевых пластинок от пациентов с клинической картиной дерматофитии и 21 образец – здоровые ногтевые пластинки (без клинического диагноза и с отрицательным результатом лабораторного исследования).

Для каждого из образцов были выполнены микроскопия и посев на среду Сабуро с дальнейшей идентификацией. Аналогичные исследования выполнялись и для образцов материала, полученных от лиц без онихомикоза.

Изучаемые образцы направлялись в НПФ «Гентех» с условной маркировкой без указания диагноза и результатов микроскопии и культурального исследования (слепой метод).

Из 21 образца из ногтевых пластинок здоровых лиц все показали отрицательные результаты при микроскопии и посеве. В ПЦР-анализе 20 образцов данной из группы были отрицательными и 1 образец (проба №8) показал слабо-положительный результат (рис. 2). Из 23 образцов с клинической картиной дерматофитии 17 показали положительные результаты на *T. rubrum* всеми тремя методами исследования, 3 образца (№№ 7, 27, 30) были положительны в ПЦР-анализе и при посеве на среду Сабуро и отрицательны в микроскопии. У 3 образцов из данной группы, имевших клиническую картину онихомикозов, *T. rubrum* не был выявлен ни одним из методов, но в культуре был выделен *T. mentagrophytes*.



**Рис. 2. Результаты слепого тестирования генодиагностики руброфитии ногтей**

По результатам проведенного исследования, чувствительность изученного метода ПЦР-диагностики дерматофитного онихомикоза составила 94,4%, а специфичность – 95,2%. Общая расчетная точность диагностической методики составила 94,8%. В качестве положительного контроля использовали культуру *T. rubrum*.

На основе полученных данных был разработан парный (дуплекс) тест для диагностики онихомикоза, использующий 2 праймера, специфичные для *T. rubrum* и *T. mentagrophytes*. Необходимость создания данного теста была обусловлена тем, что оба этих вида вместе обуславливают не менее 95% дерматофитии ногтей. В ходе работ по клиническому внедрению метода была усовершенствована также методика выделения ДНК дерматофитов из ногтей [19].

### **Ключевые преимущества ПЦР-диагностики онихомикозов**

Создание генетических зондов для скорого определения ДНК возбудителей непосредственно в патологическом материале представляется большим шагом вперед и единственным на сегодня методом, позволяющим усовершенствовать лабораторную диагностику онихомикозов в повседневной практике. Точность описанного выше метода уже по предварительным данным (94%) существенно превысила отдельную и совокупную чувствительность микроскопии и культивирования (до 90%). Это главное достоинство ПЦР при онихомикозах, выводящее ее на место золотого стандарта диагностики.

Значительным достоинством созданного в России метода ПЦР-диагностики онихомикозов является быстрое установление этиологического диагноза (дерматофитии), что сразу указывает на подход к лечению и необходимость профилактики – по сравнению с несколькими неделями ожидания роста культуры *Trichophyton spp.*

ПЦР-диагностика позволяет ставить диагноз онихомикоза уже на следующий день после направления материала в лабораторию. Использование одношагового подхода к диагностике (только ПЦР), доступного во многих лабораториях нашей страны и не требующего специальной подготовки персонала, не нуждающегося в дополнительной обработке материала или особых предосторожностях по сбору образцов, делает новую методику перспективной в клинической практике дерматолога.

### **Точность ПЦР-диагностики при онихомикозе: первый год внедрения**

Перспективы ПЦР как нового золотого стандарта в диагностике онихомикозов были бы далеки от реализации без достаточного количества исследований, подтвердивших эффективность использования метода в клинической практике. Однако изучение всех пред-

ложенных методик генодиагностики онихомикозов за рубежом до настоящего времени ограничивалось материалом не более чем от 100-200 пациентов, причем внутри этих групп оценивались разные методики.

С целью изучения клинической эффективности нового отечественного метода генодиагностики онихомикозов, в 2004-2005 гг. было проведено многоцентровое исследование, в котором приняли участие 4 клинических центра, 2 микробиологических лаборатории и 1 центр молекулярной диагностики г. Москвы. Материал – фрагменты ногтевых пластин и соскобы от больных с подозрением на онихомикоз собирали 8 врачей дерматологов. Всего было обследовано 1358 пациентов с изменениями ногтей. С помощью световой КОН-микроскопии исследовали 1006 образцов, двойного ПЦР-теста на *T. rubrum* и *T. mentagrophytes* – у 941, посева материала – 258. Сочетания результатов микроскопии, посева и ПЦР-теста использовались для оценки точности исследования. При этом для определения чувствительности и специфичности мы использовали разные критерии: в качестве истинно положительных результатов брали как положительные результаты только микроскопии (1), так и сочетания микроскопии и посева (2), любого из этих методов (3), или микроскопии и посева с выделением культуры дерматофитов (4). Разные критерии оценки использовались как в связи с неоптимальной точностью референтных классических методов лабораторной диагностики, так и благодаря разным взглядам на использование этих методов в клинических исследованиях.

Всего было получено 51,7% положительных результатов микроскопии, 40,7% – посевов, 55,5% – в ПЦР. Оценка точности метода на основе данных результатов установила, что с использованием 1 критерия чувствительность метода составила 79%, а специфичность – 71%, 2 – 81 и 85%, 3 – 94 и 86%, 4 – 91 и 64% соответственно. Достоверность совпадения результатов микроскопии и ПЦР отмечалась при  $p < 0,001$ . Чувствительность определения дерматофитии ногтей составила 93,5% (положительная прогностическая ценность 90,1%).

Таким образом, на достаточно крупной выборке в многоцентровом исследовании была подтверждена достоверная точность нового метода генодиагностики онихомикозов, превосходящая отдельную и совокупную точность микроскопии и посева. Более того, несовершенство классических методов несколько ограни-

чили оценку показателей чувствительности и особенно – специфичности ПЦР (положительные результаты ПЦР наблюдались в клинически ясных случаях онихомикоза на фоне отрицательных результатов микроскопии и посева). Для более точной оценки специфичности ПЦР могут потребоваться повторные или множественные исследования, или катamnестические наблюдения (эффект от лечения).

Помимо определения точности двойного ПЦР-теста, было установлено, что его результаты, в отличие от результатов микроскопии, не имеют достоверной зависимости от врача, собиравшего материал для исследования.

### **Точность ПЦР-диагностики на «потоке»: опыт 2005-2006 гг.**

В 2005-2006 г. нами была проанализирована вторая «волна» результатов одновременного использования классических методик КОН-микроскопии и посева наряду с ПЦР в условиях «потока», то есть повседневной однократной диагностики, проводимой практичными врачами в условиях массового притока пациентов с подозрением на онихомикоз при единовременном сборе материала. Всего за 2 года было получено 2045 образцов материала из ногтей, причем в каждом случае выполнялась и ПЦР-диагностика, и микроскопия (однократно в большинстве случаев, повторные исследования были проанализированы в особой подгруппе). Полученные результаты представлены в табл. 1.

Всего из представленного за указанный период материала было получено 1297 (63,4%) положительных результатов микроскопии, 1023 (50,02%) положительных результата ПЦР, 748 отрицательных результатов микроскопии и 1022 отрицательных результата ПЦР.

При анализе чувствительности микроскопии и ПЦР следует учитывать случаи онихомикоза, вызванные грибами-недерматофитами, то есть отрицательные ПЦР на фоне положительной микроскопии (около 30,5% случаев). Это затрудняет установления критериев чувствительности, поскольку группа ложноотрицательных результатов размывается. Вместе с тем, при использовании однократной микроскопии как референтного метода диагностики чувствительность ПЦР составила 69,5%, а специфичность 83,7%, положительная прогностическая ценность ПЦР для онихомикоза в целом составила 88,07%. Выигрыш в чувствительности и положительной прогностической ценности ПЦР для

**Таблица 1**  
**Результаты ПЦР и КОН-микроскопии**

Результат		n	%
Микроскопия +	ПЦР +	901	69,5%
	ПЦР -	396	30,5%
Микроскопия -	ПЦР +	122	16,3%
	ПЦР -	626	83,7%

Примечания: + положительный результат, - отрицательный, n – число образцов

онихомикоза в целом позиционирует данный метод как средство принятия лечебного-профилактического решения: поскольку только дерматофития ногтей является заразным вариантом онихомикоза в России, ПЦР позволяет выделять приоритетную группу больных для профилактики инфекции, выбирать подход к лечению (в частности, тербинафин), проводить контроль излеченности.

Учитывая долю дрожжевых и плесневых грибов в этиологической структуре онихомикоза, оцениваемую как 10-25% [20], можно рассчитать чувствительность микроскопии, используя ПЦР как более чувствительный референтный метод диагностики именно дерматофитии ногтей. В этом случае ложно-отрицательными станут те отрицательные результаты микроскопии, при которых одновременно получены положительные результаты ПЦР. В таком случае соотношение чувствительность/специфичность поменяется, и чувствительность микроскопии составит 88%, а положительная прогностическая ценность – 69,4%. Эти показатели гораздо ближе к расчетной чувствительности микроскопии (80%), установленной в 2002 г. [5] при использовании посевов, чем простой процент положительных результатов микроскопии в данном исследовании (63,4).

Вместе с тем, по данным зарубежных авторов, процент положительных результатов микроскопии почти никогда не превышает 60% [21]. По данным исследования Lilly и соавт., чувствительность однократной микроскопии, оцененная параллельно с помощью 5 методик, при анализе врачом-дерматологом или лаборантом составляет 87,8-90,9%, что вплотную приближает эти показатели к полученным нами. Это свидетельствует о приемлемости ПЦР как референтного метода и в перспективе - нового золотого стандарта диагностики онихомикозов.

### **Новые концепции и алгоритмы диагностики онихомикозов**

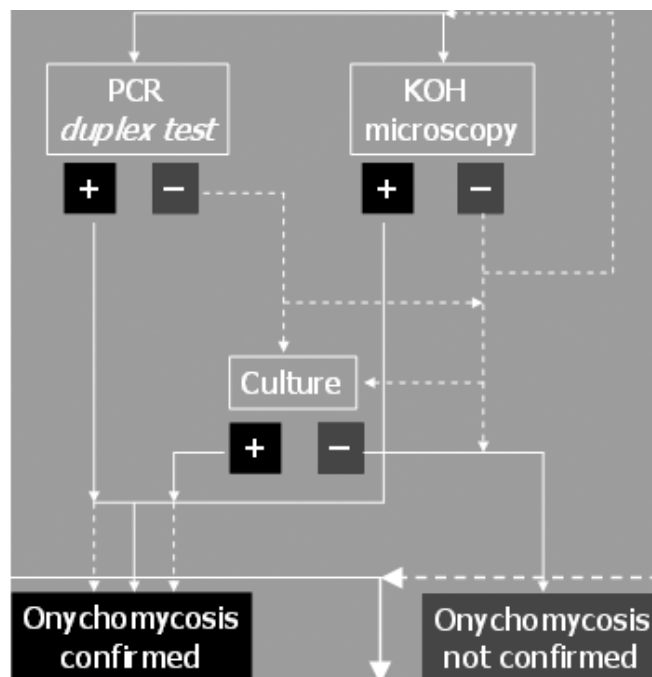
Появление эффективного метода генодиагностики дерматофитии ногтей открывает перед клиницистами новые перспективы: прежде всего, высокочувствительной экспресс-диагностики онихомикозов. Однако внедрение ПЦР неизбежно сталкивается с вопросом этиологии: что делать с онихомикозом, который вызывают не *T. rubrum* и *T. mentagrophytes*, а другие виды грибов? «За бортом» нового метода остаются 2-5% других видов дерматофитов, плесневые грибы и *Candida spp.*, вместе составляющие до 20-25% случаев заболевания. Создание двойного теста ПЦР-диагностики онихомикозов формирует и новые категории: ПЦР-положительного и ПЦР-негативного онихомикоза. К ПЦР-положительному онихомикозу относятся наиболее распространенные в популяции случаи классической дерматофитии ногтей с предсказуемыми механизмами заражения. Поэтому выявление ПЦР-положительного онихомикоза однозначно подтверждает диагноз заболевания, требует своевременного лечения и профилактики. ПЦР-негативный онихомикоз – собирательное название более сложных случаев, сразу не дающих однозначного ответа и требующих дополнительных мероприятий клинической и лабораторной диагностики.

Закономерный вопрос, связанный с появлением ПЦР-диагностики онихомикозов, заключается в том, сможет ли она заменить традиционные микроскопию и посев, и в какой степени? Вероятность ПЦР-негативного онихомикоза указывает на то, что в настоящее время ПЦР, скорее всего, не сможет заменить сразу оба этих метода в качестве однократного диагностического теста, для онихомикоза в целом: по крайней мере, до тех пор, пока недерматофитный онихомикоз не перестанет считать само-

стоятельным заболеванием. Для определения такой вероятности потребуются дополнительные исследования. Однако уже имеющиеся данные указывают на то, что ПЦР может быть использована вместе с микроскопией в качестве однократного диагностического теста при большинстве случаев онихомикоза. В нашей работе чувствительность однократного одновременного исследования (микроскопия и ПЦР) составила 98%. При этом ложноотрицательных результатов ПЦР, по сравнению с микроскопией или обоими классическими методами, практически не наблюдалось (0 в микро-

скопии, и всего 9 при посеве). Отрицательная прогностическая ценность теста составила 96,3%. Это указывает на то, что однократного отрицательного результата и в микроскопии, и в ПЦР может быть достаточно для исключения диагноза «онихомикоз» – то есть, необходимость в повторной микроскопии отпадает. Это повышает экономическую эффективность ПЦР по сравнению с классическими методами диагностики онихомикозов.

Новый алгоритм лабораторной диагностики онихомикозов сегодня может сочетать все три метода: микроскопии, ПЦР и посева (рис. 3).



**Рис. 3.** Новый алгоритм лабораторной диагностики онихомикозов

Мы рекомендуем начинать исследование, направляя материал сразу на ПЦР и микроскопию. Положительный результат микроскопии подтверждает диагноз «онихомикоз», положительный результат ПЦР свидетельствует о дерматофитии ногтей, требуя начать лечение и профилактические мероприятия. При наличии характерной клинической картины и/или анамнеза положительный результат любого из этих методов достаточен для установления диагноза и принятия терапевтического решения. Отрицательный результат в обоих тестах без нали-

чия характерной клинической картины и анамнеза позволяет отвергнуть диагноз «онихомикоз», в сомнительных случаях требуется повторное исследование. Посев показан в случаях ПЦР-негативного онихомикоза (при положительном результате только в микроскопии), а также в сомнительных случаях при отрицательном результате сразу в микроскопии и ПЦР. Приведенная схема позволяет ограничить сроки лабораторной диагностики большинства случаев онихомикоза 1 сутками и исключить затраты на посев и выделение культуры.

## Литература

1. Ариевич А. М., Шецирули Л. Т. Патология ногтей. Тбилиси, «Мецниереба», 1976.
2. Лещенко В. М. Лабораторная диагностика грибковых заболеваний. М., Медицина, 1977
3. English M. P. Nails and fungi. Br J Dermatol 1976, 94: 697-701
4. Elewski B. Diagnostic techniques for confirming onychomycosis. J Am Acad Dermatol 1996 Sep 35:3 Pt 2 S6
5. Сергеев А.Ю., Сергеев Ю.В., Маликов В.Е., Жарикова Н.Е. Насколько точна «классическая» лабораторная диагностика ониомикозов? Успехи медицинской микологии., 2006 - Т. VIII - сс. 87-89
6. Feuilhade de Chauvin M. New diagnostic techniques. J Eur Acad Dermatol Venereol 2005; 19 Suppl 1:20-4.
7. Mennink-Kersten MA, Verweij PE. Non-culture-based diagnostics for opportunistic fungi. Infect Dis Clin North Am 2006; 20 (3):711-27, viii.
8. Reiss E, Obayashi T, Orle K et al. Non-culture based diagnostic tests for mycotic infections. Med Mycol 2000; 38 Suppl 1:147-59.
9. Kano R, Nakamura Y, Watari T et al. Species-specific primers of chitin synthase 1 gene for the differentiation of the Trichophyton mentagrophytes complex. Mycoses 1999; 42 (1-2):71-4.
10. Makimura K, Tamura Y, Mochizuki T et al. Phylogenetic classification and species identification of dermatophyte strains based on DNA sequences of nuclear ribosomal internal transcribed spacer 1 regions. J Clin Microbiol 1999; 37 (4):920-4.
11. Graser Y, el Fari M, Presber W et al. Identification of common dermatophytes (Trichophyton, Microsporum, Epidermophyton) using polymerase chain reactions. Br J Dermatol 1998; 138 (4):576-82.
12. Machouart-Dubach M, Lacroix C, de Chauvin MF et al. Rapid discrimination among dermatophytes, Scytalidium spp., and other fungi with a PCR-restriction fragment length polymorphism ribotyping method. J Clin Microbiol 2001; 39 (2):685-90.
13. Arca E, Saracli MA, Akar A et al. Polymerase chain reaction in the diagnosis of onychomycosis. Eur J Dermatol 2004; 14 (1):52-5.
14. Gutzmer R, Mommert S, Kuttler U et al. Rapid identification and differentiation of fungal DNA in dermatological specimens by LightCycler PCR. J Med Microbiol 2004; 53 (Pt 12):1207-14.
15. Kardjeva V, Summerbell R, Kantardjiev T et al. Forty-eight-hour diagnosis of onychomycosis with subtyping of Trichophyton rubrum strains. J Clin Microbiol 2006; 44 (4):1419-27.
16. Kano R, Hirai A, Muramatsu M et al. Direct detection of dermatophytes in skin samples based on sequences of the chitin synthase 1 (CHS1) gene. J Vet Med Sci 2003; 65 (2):267-70.
17. Yang CY, Lin TL, Tzung TY et al. Direct identification of dermatophyte DNA from clinical specimens by a nested polymerase chain reaction assay. Arch Dermatol 2007; 143 (6):799-800.
18. Сергеев А.Ю., Богуш П.Г., Земляная Н. Ю., Щербо С.Н., Лещенко В.М., Жарикова Н.Е., Мокина Е.В. Первый опыт прямой ПЦР диагностики дерматофитии ногтей. Успехи медицинской микологии. М.: 2004; Т. 3: 339-342
19. Сергеев А.Ю., Щербо С.Н., Богуш П.Г., Сергеев В.Ю., Кудрявцева Е.В., Савченко Н.В., Мокина Е.В., Чернявская М.Г., Сергеев Ю.В., Макова Г.Н. Исследование точности нового метода ПЦР-диагностики ониомикозов. Проблемы медицинской микологии 2006; Т. 8; № 2: 84-85
20. Сергеев А.Ю., Иванов О.Л., Сергеев Ю.В., Маликов В.Е., Жарикова Н.Е., Крючков М.И. Исследование современной этиологии ониомикозов в России Российский журнал кожных и венерических болезней 2002; № 5: 42-46.
21. Lilly KK, Koshnick RL, Grill JP et al. Cost-effectiveness of diagnostic tests for toenail onychomycosis: a repeated-measure, single-blinded, cross-sectional evaluation of 7 diagnostic tests. J Am Acad Dermatol 2006; 55 (4):620-6.