



**POLITECHNIKA
GDAŃSKA**

WYDZIAŁ CHEMICZNY



Imię i nazwisko autora rozprawy: **Natalia Kobylak**

Dyscyplina naukowa: **Nauki chemiczne - Biotechnologia**

ROZPRAWA DOKTORSKA

Tytuł rozprawy w języku polskim:

System do diagnostyki dermatofitowych zakażeń powierzchniowych oparty na technice Real-Time PCR

Tytuł rozprawy w języku angielskim:

Diagnostic system of dermatophytes superficial infections based on Real-Time PCR

Promotor

podpis

dr hab. inż. Anna Brillowska-Dąbrowska, prof. uczelni

Gdańsk, rok 2021


WYDZIAŁ CHEMICZNY
OŚWIADCZENIE

Autor rozprawy doktorskiej: **Natalia Kobylak**

Ja, niżej podpisany(a), wyrażam zgodę na bezpłatne korzystanie z mojej rozprawy doktorskiej zatytułowanej:
System do diagnostyki dermatofitowych zakażeń powierzchniowych oparty na technice Real-Time PCR
do celów naukowych lub dydaktycznych.¹

Gdańsk, dnia

Świadomy(a) odpowiedzialności karnej z tytułu naruszenia przepisów ustawy z dnia 4 lutego 1994 r. o prawie autorskim i prawach pokrewnych (Dz. U. z 2006 r., nr 90, poz. 631) i konsekwencji dyscyplinarnych określonych w ustawie Prawo o szkolnictwie wyższym (Dz. U. z 2012 r., poz. 572 z późn. zm.),² a także odpowiedzialności cywilno-prawnej oświadczam, że przedkładana rozprawa doktorska została napisana przeze mnie samodzielnie.

Oświadczam, że treść rozprawy opracowana została na podstawie wyników badań prowadzonych pod kierunkiem i w ścisłej współpracy z promotorem Anną Brillowską-Dąbrowską.

Niniejsza rozprawa doktorska nie była wcześniej podstawą żadnej innej urzędowej procedury związanej z nadaniem stopnia doktora.

Wszystkie informacje umieszczone w ww. rozprawie uzyskane ze źródeł pisanych i elektronicznych, zostały udokumentowane w wykazie literatury odpowiednimi odnośnikami zgodnie z art. 34 ustawy o prawie autorskim i prawach pokrewnych. Potwierdzam zgodność niniejszej wersji pracy doktorskiej z załączoną wersją elektroniczną.

Gdańsk, dnia

Ja, niżej podpisany(a), wyrażam zgodę na umieszczenie ww. rozprawy doktorskiej w wersji elektronicznej w otwartym, cyfrowym repozytorium instytucjonalnym Politechniki Gdańskiej, Pomorskiej Bibliotece Cyfrowej oraz poddawania jej procesom weryfikacji i ochrony przed przywłaszczeniem jej autorstwa.

Gdańsk, dnia

¹ Zarządzenie Rektora Politechniki Gdańskiej nr 34/2009 z 9 listopada 2009 r., załącznik nr 8 do instrukcji archiwalnej PG.

² Ustawa z dnia 27 lipca 2005 r. Prawo o szkolnictwie wyższym: Rozdział 7 Odpowiedzialność dyscyplinarna doktorantów, Art. 226.



Chciałabym podziękować tym wszystkim, bez pomocy których praca ta nie mogłaby powstać.

W pierwszej kolejności pragnę podziękować Promotor mojej pracy dr hab. inż. Annie Brillowskiej-Dąbrowskiej prof. uczelni za całą wiedzę przekazaną mi przez te lata, ogromne pokłady cierpliwości oraz wsparcie w życiu zawodowym i prywatnym. Dziękuję za liczne poprawki, za krytykę oraz uwagi dotyczące mojej pracy, za naukę dobrej praktyki laboratoryjnej oraz stworzenie cudownej atmosfery do pracy. Nie mogę nie wspomnieć w tym miejscu, iż spotkanie Pani Profesor na mojej drodze było ogromnym zaszczytem. Dziękuję.

Szczególne podziękowania należą się również prof. dr hab. Romanowi Nowickiemu oraz dr n. med. Barbarze Bykowskiej z Katedry i Kliniki Dermatologii, Wenerologii i Alergologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego bez których stworzenie kolekcji izolatów wykorzystanych w niniejszej pracy nie byłoby możliwe.

Dziękuję również moim koleżankom z 017ChA – dr inż. Ewelinie Kurzyk oraz dr inż. Martynie Mroczyńskiej. Ich gotowość do pomocy, w każdej chwili, była nieoceniona, a wsparcie, gdy przychodziło zwątpienie, zawsze podnosiło mnie na duchu.

Nie mogę zapomnieć o wszystkich pracownikach Katedry Biotechnologii Molekularnej i Mikrobiologii oraz Katedry Technologii Leków i Biochemii. Dziękuję za przyjazną atmosferę pracy oraz udostępnianie potrzebnych aparatów i sprzętów, bez których nie byłabym w stanie ukończyć tej pracy.

Na koniec pragnę podziękować mojej Rodzinie oraz Przyjaciółom, a w szczególności mojemu Mężowi oraz Rodzicom. Za umożliwienie mi rozwoju naukowego, za cierpliwość oraz wsparcie zawsze wtedy, gdy tego potrzebowałam. Bez Was ta praca by nie powstała.

Dziękuję!





Spis treści

Spis tabel.....	8
Spis rysunków.....	10
STRESZCZENIE.....	14
SUMMARY.....	15
1. Wstęp teoretyczny	17
1.1. Charakterystyka.....	19
1.1.1. Charakterystyka rodzaju <i>Epidermophyton</i>	19
1.1.2. Charakterystyka rodzaju <i>Microsporum</i>	19
1.1.3. Charakterystyka rodzaju <i>Nannizzia</i>	21
1.1.4. Charakterystyka rodzaju <i>Trichophyton</i>	22
1.1.5. Charakterystyka rodzaju <i>Arthroderma</i>	26
1.2. Dermatofitozy.....	27
1.2.1. Czynniki predysponujące do rozwoju dermatofitoz	27
1.2.2. Czynniki wirulencji - proteazy i lipazy dermatofitów	27
1.2.3. Patomechanizm zakażeń grzybami chorobotwórczymi.....	28
1.2.4. Leczenie.....	29
1.2.5. Rodzaje dermatofitoz.....	30
1.2.6. Antymykotyki – lekooporność	34
1.3. Diagnostyka.....	36
1.3.1. Pobieranie próbek do badań.....	36
1.3.2. Diagnostyka klasyczna	36
1.3.3. Diagnostyka molekularna	38
1.3.4. Cele molekularne.....	38
1.3.5. Przygotowanie DNA.....	40
1.3.6. Technika PCR w diagnostyce dermatomikoz.....	41
1.3.7. Genotypowanie	43
2. Cel i zakres pracy	45
3. Materiały.....	46
3.1. Izolaty.....	46
3.2. Odczynniki, materiały oraz aparatura	47
3.2.1. Hodowla dermatofitów	47
3.2.2. Izolacja DNA.....	47



3.2.3.	Zaprojektowane w ramach doktoratu sekwencje starterów Pan-dermatofitowy Real-Time PCR	47
3.2.4.	Przygotowanie fragmentów DNA do sekwencjonowania	47
3.2.5.	<i>Trichophyton rubrum</i> -specyficzny Real-Time PCR.....	48
3.2.6.	<i>Epidermophyton floccosum</i> -specyficzny Real-Time PCR.....	48
3.2.7.	Identyfikacja gatunków kompleksu <i>A. otae</i>	48
3.2.8.	Genotypowanie	49
3.2.9.	Identyfikacja gatunków kompleksu <i>T. mentagrophytes</i>	50
3.2.10.	Nowa metoda izolacji DNA.....	50
4.	Metody.....	51
4.1.	Izolacja DNA.....	51
4.2.	Real-Time PCR	51
4.3.	Pan-dermatofitowy Real-Time PCR	51
4.4.	Genotypowanie.....	52
4.4.1.	Genotypowanie <i>M. canis</i>	53
4.4.2.	Genotypowanie <i>E. floccosum</i>	53
4.4.3.	Genotypowanie <i>T. rubrum</i>	53
4.4.4.	Genotypowanie <i>T. mentagrophytes</i>	54
4.5.	Sekwencjonowanie.....	54
4.6.	<i>Trichophyton rubrum</i> -specyficzny Real-Time PCR	54
4.7.	Identyfikacja izolatów gatunku <i>E. floccosum</i>	55
4.7.1.	Gatunkowo-specyficzny PCR.....	58
4.7.2.	Gatunkowo-specyficzny Real-Time PCR.....	58
4.8.	Identyfikacja gatunków należących do kompleksu <i>Arthroderma otae</i>	59
4.8.1.	Gatunkowo-specyficzny PCR.....	61
4.8.2.	Gatunkowo-specyficzny Real-Time PCR.....	62
4.9.	Identyfikacja gatunków należących do kompleksu <i>T. mentagrophytes</i>	63
4.9.1.	Gatunkowo-specyficzny PCR.....	66
4.9.2.	Gatunkowo-specyficzny Real-Time PCR.....	66
4.10.	Nowa metoda izolacji DNA	67
4.10.1.	Dobór najbardziej efektywnych parametrów przygotowania DNA przeprowadzanych nową metodą.....	67
4.10.2.	Pan-dermatofitowy PCR oraz Real-Time PCR.....	67
4.10.3.	Sprawdzenie stabilności DNA	67
5.	Wyniki i wnioski	69

5.1.	Szybka metoda izolacji DNA	69
5.1.1.	Pan-dermatofitowy Real-Time PCR	69
5.1.2.	<i>Trichophyton rubrum</i> -specyficzny Real-Time PCR	79
5.1.3.	Użyteczność szybkiej metody izolacji w reakcji Real-Time PCR	82
5.2.	Identyfikacja gatunku <i>E. floccosum</i>	82
5.2.1.	Projektowanie starterów	82
5.2.2.	Gatunkowo-specyficzny PCR	82
5.2.3.	Gatunkowo-specyficzny Real-Time PCR	83
5.3.	Identyfikacja gatunków kompleksu <i>A. otae</i>	85
5.3.1.	Projektowanie starterów	85
5.3.2.	Gatunkowo-specyficzny PCR	86
5.3.3.	Gatunkowo-specyficzny Real-Time PCR	87
5.4.	Genotypowanie	91
5.4.1.	Genotypowanie izolatów gatunku <i>E. floccosum</i>	91
5.4.2.	Genotypowanie gatunku <i>T. rubrum</i>	92
5.4.3.	Genotypowanie gatunku <i>T. mentagrophytes</i>	93
5.5.	Identyfikacja izolatów kompleksu <i>T. mentagrophytes</i>	94
5.5.1.	Gatunkowo-specyficzny PCR	95
5.5.2.	Gatunkowo-specyficzny Real-Time PCR	96
5.6.	Nowa metoda przygotowania DNA bezpośrednio z hodowli z próbek klinicznych reakcji PCR	98
5.6.1.	Opracowanie metody przygotowania DNA reakcji PCR oraz Real-Time PCR	98
5.6.2.	PCR oraz Real-Time PCR z zastosowaniem DNA wyizolowanego nową metodą	100
5.6.3.	Stabilność DNA wyizolowanego nową metodą	100
5.7.	Wstępne sprawdzenie użyteczności testu na próbkach klinicznych	102
6.	Dyskusja	104
7.	Podsumowanie	110
8.	Bibliografia	112
	SPIS OSIĄGNIĘĆ	120



Spis tabel

Tabela 1. Zestawienie izolatów wykorzystanych w niniejszej pracy.....	46
Tabela 2. Skład mieszaniny reakcyjnej do Real-Time PCR	51
Tabela 3. Profil temperaturowo-czasowy reakcji Real-Time PCR zastosowany przy wyborze gotowej mieszaniny reakcyjnej.....	52
Tabela 4. Profil temperaturowo-czasowy reakcji pan-dermatofitowego Real-Time PCR.....	52
Tabela 5. a) Profil temperaturowo-czasowy PCR zastosowany technice RAPD. b) Profil temperaturowo-czasowy PCR w technice RAPD zastosowany do genotypowania gatunku <i>E. floccosum</i> z użyciem startera RAPD1254	53
Tabela 6. Skład mieszaniny reakcyjnej stosowanej w technice RAPD z zastosowaniem gotowej mieszaniny	53
Tabela 7. Profil temperaturowo-czasowy reakcji <i>T. rubrum</i> -specyficznego Real-Time PCR.....	54
Tabela 8. Profil temperaturowo-czasowy zastosowany w <i>E. floccosum</i> -specyficznym PCR.....	58
Tabela 9. Profil temperaturowo-czasowy reakcji <i>E. floccosum</i> -specyficznego Real-Time PCR	59
Tabela 10. Profil temperaturowo-czasowy zastosowany jako wyjściowy w optymalizacji <i>M. audouinii</i> / <i>M. ferrugineum</i> -specyficznego oraz <i>M. canis</i> -specyficznego PCR	61
Tabela 11. Profil temperaturowo-czasowy zastosowany w <i>M. audouinii</i> / <i>M. ferrugineum</i> -specyficznym PCR.....	61
Tabela 12. Profil temperaturowo-czasowy zastosowany w <i>M. canis</i> -specyficznym PCR	62
Tabela 13. Profil temperaturowo-czasowy od którego rozpoczynano dobór najbardziej efektywnych parametrów reakcji <i>M. audouinii</i> -specyficznego oraz <i>M. canis</i> -specyficznego Real-Time PCR.....	62
Tabela 14. Profil temperaturowo-czasowy reakcji <i>M. audouinii</i> -specyficznego oraz <i>M. canis</i> -specyficznego Real-Time PCR.....	63
Tabela 15. Profil temperaturowo-czasowy reakcji PCR od której rozpoczęto optymalizację identyfikacji kompleksu <i>T. mentagrophtes</i>	66
Tabela 16. Profil temperaturowo-czasowy reakcji PCR zastosowany w identyfikacji kompleksu <i>T. mentagrophtes</i>	66
Tabela 17. Profil temperaturowo-czasowy reakcji <i>E. floccosum</i> -specyficznego Real-Time PCR ..	67
Tabela 18. Wyniki ustalone podczas optymalizacji pan-dermatofitowego Real-Time PCR.....	73
Tabela 19. Zbiorcze wyniki pan-dermatofitowego Real-Time PCR wraz z podanymi temperaturami topnienia specyficzných produktów	74
Tabela 20. Zbiorcze wyniki genotypowania gatunku <i>M. canis</i> . (-) oznacza, że dany szczep nie został przebadany.....	77



Tabela 21. Wyniki identyfikacji gatunkowej z użyciem sekwencjonowania z zastosowaniem starterów ITS1 oraz ITS4.....	79
Tabela 22. Wyniki <i>T. rubrum</i> -specyficznego Real-Time PCR.....	81
Tabela 23. Wyniki <i>E. floccosum</i> -specyficznego PCR oraz Real-Time PCR.....	85
Tabela 24. Porównanie sekwencji starterów służących do identyfikacji gatunkowej <i>M. canis</i> oraz <i>M. audouinii</i> / <i>M. ferrugineum</i>	86
Tabela 25. Zbiorcze wyniki gatunkowo-specyficznego PCR oraz gatunkowo-specyficznego Real-Time PCR dla DNA wyizolowanego ze szczepów dermatofitowych oraz szczepów nie-dermatofitowych.....	91
Tabela 26. Zbiorcze wyniki genotypowania gatunku <i>E. floccosum</i>	92
Tabela 27. Wyniki PCR oraz Real-Time PCR dla kompleksu <i>T. mentagrophytes</i>	97
Tabela 28. Temperatury topnienia produktów reakcji Real-Time PCR wykrywającej pan-dermatofitowe DNA z zastosowaniem matryc DNA wyizolowanych testowanymi wariantami nowej metody oraz metodą opublikowaną jako kontrolą (litery A-D wskazują na użytą ilość proteiny oraz parametry warunków inkubacji próbki).....	99
Tabela 29. Zbiorcze wyniki PCR oraz Real-Time PCR z użyciem starterów wykrywających dermatofitowe DNA przy zastosowaniu DNA przygotowanego nową metodą.....	100
Tabela 30. Zestawienie wyników reakcji PCR oraz Real-Time PCR z zastosowaniem DNA wyizolowanego nową i opublikowaną metodą natychmiast po izolacji DNA oraz po 28 dniach, 3 i 6 miesiącach po jego izolacji.....	101
Tabela 31. Zestawienie wyników pan-dermatofitowego Real-Time PCR oraz <i>T. rubrum</i> -specyficznego Real-Time PCR z wykorzystaniem matryc DNA uzyskanych bezpośrednio z próbek klinicznych.....	103

Spis rysunków

Rys 1. Kolonia <i>E. floccosum</i> . Wzrost na podłożu SGA (A) oraz obraz mikroskopowy prezentujący makrokonidia (B) i chlamydiokonidia (C).....	19
Rys 2. Kolonia <i>M. audouinii</i> . Wzrost na podłożu SGA (A) i obraz mikroskopowy prezentujący chlamydokonidia (B).....	20
Rys 3. Kolonia <i>M. canis</i> . Wzrost na podłożu SGA (A) i obraz mikroskopowy prezentujący typowe makrokonidia (B).....	21
Rys 4. Kolonia <i>N. gypsea</i> . Wzrost na podłożu SGA (A) i obraz mikroskopowy przedstawiający makrokonidia (B).....	22
Rys 5. Kolonia <i>T. mentagrophytes</i> . Wzrost na podłożu SGA (A) oraz obraz mikroskopowy na którym znajduje się strzępka spiralna (B) oraz liczne makrokonidia (C).....	23
Rys 6. Kolonia <i>T. interdigitale</i> Wzrost na podłożu SGA (A) oraz obraz mikroskopowy (B).....	23
Rys 7. Kolonia <i>T. rubrum</i> . Wzrost na podłożu SGA (A) oraz obraz mikroskopowy prezentujący mikrokonidia (B).....	24
Rys 8. Kolonia <i>T. schoenleinii</i> . Wzrost na podłożu SGA (A) oraz obraz mikroskopowy prezentujący chlamydospory (B).....	24
Rys 9. Kolonia <i>T. tonsurans</i> . Wzrost na podłożu SGA (A, B) oraz obraz mikroskopowy przedstawiający mikrokonidia (C).....	25
Rys 10. Kolonia <i>T. verrucosum</i> . Wzrost na podłożu SGA (A) oraz obraz mikroskopowy z charakterystycznymi makrokonidiami (B) oraz chlamydospory układające się w łańcuchy (C).....	26
Rys 11. Kolonia <i>A. insingulare</i> . Wzrost przypominający <i>T. mentagrophytes</i> na podłożu SGA (A) oraz obraz mikroskopowy (B).....	27
Rys 12. <i>Tinea barbae</i> wywołana <i>T. verrucosum</i>	30
Rys 13. <i>Tinea capitis</i> wywołana przez <i>M. canis</i>	30
Rys 14. <i>Tinea corporis</i> wywołana przez <i>M. canis</i>	31
Rys 15. <i>Tinea faciei</i> wywołana przez <i>T. interdigitale</i>	31
Rys 16. <i>Tinea favosa</i>	32
Rys 17. <i>Tinea pedis</i> wywołana przez <i>T. interdigitale</i>	32
Rys 18. <i>Tinea unguium</i> wywołana przez <i>T. rubrum</i>	32
Rys 19. <i>Tinea capitis</i> wywołana <i>M. canis</i> oświetlona Lampą Wooda.....	37
Rys 20. Porównanie sekwencji regionu ITS różnych gatunków dermatofitów. Pogrubieniem zaznaczono obszar, w którym znajduje się sekwencja startera (A) EFFor (B) EFRev.....	57



- Rys 21.** Porównanie sekwencji regionu β -tubuliny różnych gatunków dermatofitów. Pogrubieniem zaznaczono obszar, w którym znajduje się sekwencja startera (A) MCFor i MATubFor, (B) MCRev i MARev.60
- Rys 22.** Porównanie sekwencji regionu ITS różnych gatunków dermatofitów. Pogrubieniem zaznaczono obszar, w którym znajduje się sekwencja startera (A) TMFor, (B) TMRev.65
- Rys 23.** Krzywa topnienia produktów amplifikacji pan-dermatofitowego Real-Time PCR. (zastosowane mieszaniny reakcyjne: SybrA, SybrB i SybrC).70
- Rys 24.** Krzywa topnienia produktów amplifikacji pan-dermatofitowego Real-Time PCR, Zastosowane mieszaniny reakcyjne HotStart i EvaGreen.71
- Rys 25.** Elektroforegram produktów amplifikacji pan-dermatofitowego Real-Time PCR. Produkty PCR uzyskano na matrycach: 1 - kontrola ujemna, 2 - *E. floccosum*, 3 - *T. rubrum*, 4 - kontrola ujemna, 5 - M 100-500 pz.72
- Rys 26.** Krzywa topnienia produktów amplifikacji pan-dermatofitowego Real-Time PCR. Produkty PCR uzyskane w reakcji z DNA wyizolowanym z: 1 -*M. audouinii*, 2 - *A. insingulare*, 3 - *E. floccosum*, 4 - *T. mentagrophytes*, 5 - *T. rubrum*, 6 - *T. verrucosum*, 7 - *T. violaceum*, 8 - kontrola ujemna.72
- Rys 27.** Profile elektroforetyczne uzyskane w wyniku zastosowania startera GACA w reakcji RAPD przy zastosowaniu matryc DNA *M. canis*.77
- Rys 28.** Profile elektroforetyczne uzyskane w wyniku zastosowania startera OPE18 w reakcji RAPD przy zastosowaniu matryc DNA *M. canis*.77
- Rys 29.** Profile elektroforetyczne uzyskane w wyniku zastosowania startera OPZ10 w reakcji RAPD przy zastosowaniu matryc DNA *M. canis*.78
- Rys 30.** Krzywa topnienia produktów amplifikacji *T. rubrum*-specyficznego Real-Time PCR. Produkty PCR uzyskane w reakcji z DNA wyizolowanym z 1 - *T. rubrum*, 2 - *T. tonsurans*, 3 - *T. mentagrophytes*, 4 - *A. insingulare*, 5 - kontrola ujemna.80
- Rys 31.** Krzywa topnienia produktów amplifikacji *T. rubrum*-specyficznego Real-Time PCR. Kolorem szarym zaznaczono krzywe topnienia produktów reakcji uzyskanych na matrycach: *T. mentagrophytes* (TM 2 do TM 10) oraz *A. insingulare* (AI1) oraz *T. tonsurans* (TTo3).81
- Rys 32.** Elektroforegram produktów amplifikacji *T. rubrum*-specyficznego Real-Time PCR. Produkty PCR uzyskane przy zastosowaniu matryc: K₁ - kontrola ujemna, TR13 - *T. rubrum* nr 13, M - 100-500 pz.82
- Rys 33.** Elektroforegram produktów amplifikacji *E. floccosum*. 1 - M 100-500 pz, Produkty PCR uzyskane w reakcji z DNA wyizolowanym: 1- *E. floccosum* (1), 2 - *E. floccosum* (2), 4 - *M. canis*, 5 - *T. mentagrophytes*, 6 - *T. rubrum*.83



- Rys 34.** Krzywa topnienia produktów amplifikacji *E. floccosum*-specyficznego Real-Time PCR. Produkty PCR uzyskane w reakcji z DNA wyizolowanym z: 1 - *E. floccosum* (1), 2 - *E. floccosum* (2), 3 - *M. canis*, 4 - *T. interdigitale*, 5 - *T. mentagrophytes*, 6 - *T. rubrum*, 7 - *T. tonsurans*, 8 – kontrola ujemna.84
- Rys 35.** Elektroforegram produktów amplifikacji *M. audouinii* (A) oraz *M. canis* (B). 1 – M 100-700 pz, Produkty PCR uzyskane w reakcji z DNA wyizolowanym z: 2 - *M. audouinii*, 3 – *M. canis*, 4 – *N. gypsea*, 5 – *T. rubrum*, 6 – *T. mentagrophytes*, 7 – *T. interdigitale*, 8 – *A. insingulare*, 9 – *T. tonsurans*, 10 – *E. floccosum*.87
- Rys 36.** Krzywa topnienia produktów amplifikacji *M. audouinii*-specyficznego Real-Time PCR. Produkty PCR uzyskane w reakcji z DNA wyizolowanym z: 1 – *M. audouinii* (1), 2 – *M. audouinii* (2), 3 – *M. canis*, 4 – *E. floccosum*, 5 – *A. insingulare*, 6 – *T. interdigitale*, 7 – kontrola ujemna (1), 8 – kontrola ujemna (2).88
- Rys 37.** Krzywa topnienia produktów amplifikacji *M. canis*-specyficznego Real-Time PCR. Produkty PCR uzyskane w reakcji z DNA wyizolowanym z: 1 – *M. canis* (1), 2 – *M. canis* (2), 3 – *M. audouinii*, 4 – *E. floccosum*, 5 – *A. insingulare*, 6 – *T. interdigitale*, 7 – kontrola ujemna (1), 8 – kontrola ujemna (2).90
- Rys 38.** Profile elektroforetyczne uzyskane w wyniku zastosowania startera GACA w reakcji PCR przy zastosowaniu matryc DNA *E. floccosum*.92
- Rys 39.** Profile elektroforetyczne reakcji genotypowania gatunku *T. rubrum* z zastosowaniem starterów (A) OPE18 oraz (B) RAPD1254.93
- Rys 40.** Profile elektroforetyczne reakcji genotypowania gatunku *T. mentagrophytes* z zastosowaniem starterów (A) GACA oraz (B) RAPD1254.94
- Rys 41.** Zestawienie porównywanych sekwencji regionu ITS dla gatunków *T. mentagrophytes* oraz *T. interdigitale*, w obrębie których zaprojektowano startery specyficzne dla kompleksu *T. mentagrophytes*. Pogrubieniem zaznaczono obszar, w którym znajduje się sekwencja startera (A) TMFor, (B) TMRev95
- Rys 42.** Elektroforegram produktów amplifikacji kompleksu *T. mentagrophytes*. 1 – M 100-500 pz, Produkty PCR uzyskane w reakcji z DNA wyizolowanym z: 2 – *T. interdigitale*, 3 – *T. rubrum*, 4 – *M. canis*, 5 – *M. canis*, 6 – *T. mentagrophytes*, 7 – *T. mentagrophytes*, 8 – *T. terrestre*, 9 – *T. tonsurans*, 10 – *E. floccosum*.96
- Rys 43.** Krzywa topnienia produktów amplifikacji kompleksu *T. metagrophytes*-specyficznego Real-Time PCR.97
- Rys 44.** Wyniki reakcji PCR wykrywającej pan-dermatofitowe DNA z zastosowaniem matryc DNA wyizolowanych testowanymi wariantami nowej metody oraz metodą porównawczą (MP) jako



kontrolą. Litery A-D wskazują na użytą ilość proteiny oraz parametry warunków inkubacji próbki.

.....99

Rys 45. Porównanie stabilności DNA przygotowanego opublikowaną (starą) metodą (próbki 1-18) z DNA przygotowanego nową metodą (próbki 19-36). Próbki 1, 2, 3, 10, 11, 12, 19, 20,21 gatunek *T. mentagrophytes*, próbki 4, 5, 6, 13, 14, 15, 22, 23, 24, 31, 32, 33 gatunek *T. rubrum*, próbki 7, 8, 9, 16, 17, 18, 25, 26, 27, 34, 35, 36 gatunek *M. canis*, 37 – kontrola negatywna. PCR wykonany (A) natychmiast, (B) 28 dni, (C) 3 miesiące oraz (D) 6 miesięcy po izolacji DNA.102



STRESZCZENIE

Dermatofity należą do blisko spokrewnionej grupy grzybów, które wykazują wysokie powinowactwo do skeratynizowanych tkanek. Cecha ta czyni je odpowiedzialnymi za powierzchniowe grzybice skóry, paznokci oraz włosów. Szacuje się, iż nawet do 20% ludzi na całym świecie dotkniętych jest infekcjami powodowanymi przez dermatofity. Ich leczenie wymaga długotrwałego zastosowania leków przeciwgrzybiczych. W celu dobrania odpowiedniego leczenia należy zapewnić prawidłową diagnozę, która przy zastosowaniu konwencjonalnych metod jest nie tylko długotrwała, ale również kosztowna, jak i wymaga wieloletniego doświadczenia diagnosty. Biorąc powyższe pod uwagę, niezmiernie istotne jest stworzenie szybkiego i prostego testu diagnostycznego, opartego na metodach molekularnych, który zapewni identyfikację gatunkową.

Celem badań prowadzonych w ramach niniejszej pracy doktorskiej było opracowanie testu diagnostycznego, który w pierwszym etapie wykrywałby dermatofity, a w drugim etapie zapewniłby identyfikację gatunkową oraz co wydawało się największym wyzwaniem opracowanie jednoetapowej metody przygotowania DNA, które mogłoby być stosowane w technice Real-Time PCR.

W pierwszym etapie pracy wykazano możliwość zastosowanie DNA wyizolowanego szybką, dwuetapową w reakcjach Real-Time PCR przy użyciu starterów wykrywających DNA wszystkich dermatofitów oraz starterów wykrywających DNA gatunku *Trichophyton rubrum*. Następnie, zostały zaprojektowane startery umożliwiające wykrycie DNA gatunków *Epidermophyton floccosum*, *Microsporum canis*, *Microsporum audouinii*/*Microsporum ferrugineum* oraz kompleksu *Trichophyton mentagrophytes*. Zaprojektowane układy przetestowano na 246 izolatach oraz wstępnie potwierdzono możliwość ich zastosowania z użyciem próbek klinicznych. Na sam koniec opracowano nową metodę szybszej izolacji DNA dermatofitów, charakteryzującą się mniejszym ryzykiem kontaminacji w porównaniu z istniejącymi metodami.



SUMMARY

Dermatophytes are comprised of closely related group of fungi, which has high affinity to keratinized tissues. This feature makes them responsible for superficial mycoses of the skin, hair and nails. It is estimated that up to 20% worldwide population is affected by infections caused by them. Dermatophytosis treatment requires long-term use of antifungal drugs. In order to select the appropriate treatment, it is necessary to provide an appropriate approach to diagnostics, which is time consuming in case of slowly growing species, moreover it is also expensive and requires many years of experience of the diagnostician. Thus, it is very important to provide molecular-based rapid and simple diagnostic procedure, in order to ensure species-specific identification.

The aim of the presented research in this doctoral dissertation was to develop diagnostic test that would detect dermatophytes in the first stage, to ensure species identification in the second stage and what was most challenging to establish rapid DNA isolation method, which will be more convenient to use in microbiology laboratories than existing ones, so that it can be used in Real-Time PCR.

In the first part of the work, the possibility of using two-step DNA extraction method followed by Real-Time PCR using primers detecting DNA all dermatophytes and primers detecting *Trichophyton rubrum* DNA was proved. Next, primers enabling DNA detection of *Epidermophyton floccosum*, *Microsporum canis*, *Microsporum audouinii*/*Microsporum ferrugineum* and *Trichophyton mentagrophytes* complex were successfully designed. Designed procedures were tested on 246 isolates and their applicability was confirmed with the use of clinical samples. Finally, the new method of DNA isolation faster, characterized by decreased risk of contamination comparing to existing methods, was developed

Lista najważniejszych symboli i skrótów

ABC	Transporter wiążący ATP (<i>ang. ATP-binding cassette transporter</i>)
<i>ang.</i>	Z angielskiego
BSA	Albumina surowicy krwi bydlęcej (<i>ang. Bovine Serum Albumin</i>)
<i>chsI</i>	Gen kodujący syntazę chitynową
DTT	Ditiotreitol 1,4-dithio-DL-threitol)
FDA	Agencja Żywności i Leków (<i>ang. Food and Drug Administration</i>)
His	Histydyna
ITS	Wewnętrzny region niekodujący (<i>ang. Internal Transcribed Spacer</i>)
Leu	Leucyna
MDR	Wielolekooporność (<i>ang. Multidrug Resistance</i>)
MIC	Minimalne stężenie hamujące (<i>ang. Minimal Inhibitory Concentration</i>)
OM	Opublikowana metoda
PCR	Reakcja łańcuchowej polimerazy (<i>ang. Polymerase Chain Reaction</i>)
PCR	Reakcja łańcuchowej polimerazy „wykorzystująca” profil topnienia (<i>ang. Polymerase Chain Reaction</i>)
MP	<i>Melting Profiles</i>)
NM	Nowa metoda
Phe	Fenyloalanina
RAPD	Losowa amplifikacja polimorficznego DNA (<i>ang. Random Amplification of Polymorphic DNA</i>)
RFLP	Polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych (<i>ang. Restriction fragment length polymorphism</i>)
SGA	Podłoże Sabouraud
<i>SQLE</i>	Gen kodujący epoksydazę skwalenu
<i>spp</i>	Gatunki (<i>ang. species</i>)

1. Wstęp teoretyczny

Dermatofity należą do grupy blisko spokrewnionych grzybów, które są keratynofilne i keratynoliyczne. Ich wysokie powinowactwo do tkanek skeratynizowanych czyni je odpowiedzialnymi za powierzchniowe grzybice skóry, włosów i paznokci zarówno ludzi, jak i zwierząt. Szacuje się, iż nawet 10-20% ludzi jest dotkniętych przez infekcje spowodowane dermatofitami (Pfaller i Sutton, 2006). Pomimo, iż zakażenia dermatofitowe są ograniczone do obszarów naskórka, włosów i paznokci, w przypadku pacjentów o obniżonej odporności mogą być inwazyjne i powodować poważne rozległe infekcje z rozwojem ziarniaków. W takim przypadku nie jest to już dermatofitoza powierzchniowa i sięga głębszych warstw skóry właściwej, powodując ziarniakowe zmiany (Peres *et al.*, 2010). Dermatofitozy wymagają długoterminowej terapii lekami przeciwgrzybicznymi, które mogą wywołać skutki uboczne, dlatego identyfikacja czynnika etiologicznego zmian jest bardzo ważna jest prawidłowa diagnoza (Hainer, 2003).

Dermatofity należą do królestwa grzybów i są organizmami saprofitycznymi lub pasożytniczymi, a ich pełna systematyka przedstawiona jest poniżej:

<i>Królestwo:</i>	Grzyby
<i>Podkrólestwo:</i>	Ascomycota
<i>Typ:</i>	Grzyby (Eumycetes)
<i>Klasa:</i>	Fungi imperfecta (Deuteromycetes)
<i>Rodzina:</i>	Arthodermataceae
	<i>Trichophyton</i>
	<i>Epidemophyton</i>
	<i>Nannizzia</i>
<i>Rodzaj:</i>	<i>Paraphyton</i>
	<i>Lophophyton</i>
	<i>Microsporum</i>
	<i>Arthroderma</i>
	<i>Guarromyces</i>

Dermatofity występują w postaci anamorficzej, jak i telomorficzej. Anamorficzne rodzaje utraciły zdolność do płciowej reprodukcji, a rozmnażanie następuje poprzez sporulację artro, mikro- oraz makrokonidiów. Na podstawie podobieństw między gatunkami, przede wszystkim w morfologii konidiów, dermatofity anamorficzne zostały podzielone na trzy rodzaje: *Epidemophyton*, *Microsporum* oraz *Trichophyton*. Jednakże, w ostatnim czasie, w celu ułatwienia identyfikacji gatunkowej, zaproponowano inne nazewnictwo dermatofitów, które zostało ustalone na podstawie



sekwencjonowania takich regioów jak rybosomalne 60S, rDNA fragmentu ITS czy też fragmentów genu kodującego β -tubulinę (de Hoog *et al.*, 2017, Dworecka-Kaszak i Dąbrowska, 2017). W wyniku tych badań wyróżniono następujące rodzaje:

- *Trichophyton* (klad A)
- *Epidemophyton* (klad B)
- *Nannizzia* (klad C)
- *Paraphyton* (klad D)
- *Lophophyton* (klad E)
- *Microsporum* (klad F)
- *Arthroderma* (klad G)
- *Guarromyces*

Eliminacja procesów płciowych u tych organizmów najprawdopodobniej wiąże się z ich wysoką specjalizacją i przystosowaniem do pasożytniczego trybu życia. Wynika to z faktu, iż rozmnażanie wegetatywne pozwala na tworzenie zarodników, które mają takie same właściwości fizjologiczne jak osobnik rodzicielski. Gatunki zdolne do reprodukcji, posiadające zarodnie wraz z zarodnikami, najczęściej spotyka się wśród gatunków zoofilnych i określa się je jako telomorficzne i zalicza do rodzaju *Arthroderma* (Weitzmann i Summerbell, 1995, Metin i Heitman, 2017).

W klasyfikacji dermatofitów stosuje się również kryteria ekologiczne, w których korzysta się z preferencji wykorzystania keratyny oraz środowiska, z którego zazwyczaj są izolowane. Przedstawiciele wszystkich trzech grup mogą powodować infekcje u ludzi. Wyróżniamy trzy rodzaje dermatofitów zgodnie z tą klasyfikacją (Georg, 1960):

- dermatofity antropofilne, które wywołują zakażenia u ludzi i są przekazywane z człowieka na człowieka - *M. audouinii*, *T. interdigitale*, *T. rubrum*, *T. schoenleinii*, *T. soudanese*, *T. tonsurans*, *T. violaceum* oraz *E. floccosum*.
- dermatofity zoofilne, które wywołują zakażenia u zwierząt, a w niektórych przypadkach mogą być przekazywane na człowieka - *M. canis*, *T. mentagrophytes* oraz *T. verrucosum*.
- dermatofity geofilne, które mogą powodować zakażenia zarówno u ludzi, jak i u zwierząt - *N. gypsea* oraz *A. insingulare*.

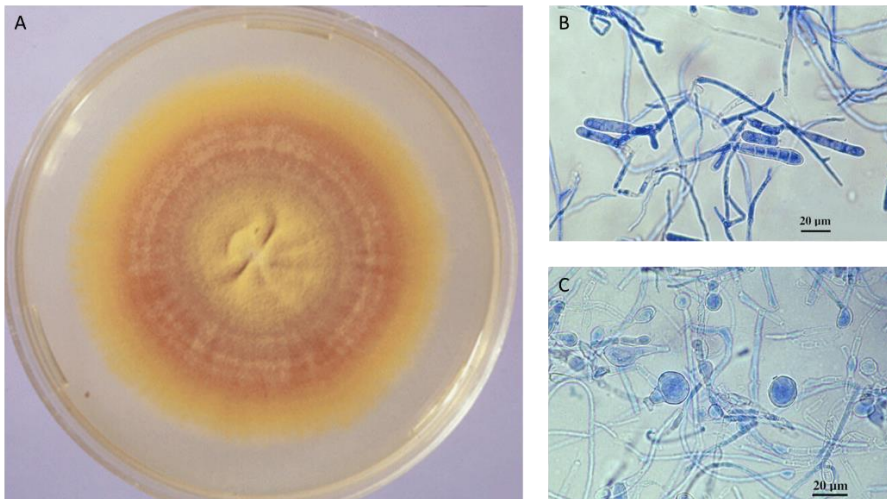


1.1. Charakterystyka

W niniejszym rozdziale opisano gatunki, które najczęściej powodują infekcje u ludzi.

1.1.1. Charakterystyka rodzaju *Epidermophyton*

Rodzaj *Epidermophyton* jest reprezentowany przez jeden patogeny gatunek – *Epidermophyton floccosum*, który jest gatunkiem antropofilnym i występuje zazwyczaj w krajach tropikalnych. U ludzi powoduje infekcję pachwin, ale również opisano przypadki, w których powoduje grzybicę skóry gładkiej, stóp oraz paznokci (Kalinowska *et al.*, 2010). Kolonie na podłożu SGA są pudrowate przechodzące w wełniaste, lekko pofałdowane w kolorze od jasnożółtego do zielonożółtego. W morfologii mikroskopowej makrokonidia występują w skupiskach, są maczugowate, tępo zakończone o typowej gładkiej i cienkiej ścianie, rzadziej zdarzają się cylindryczne z zaokrąglonym bądź wrzecionowatym zakończeniem, zazwyczaj składają się z 2 do 6 komór. Chlamydospory i artrokonidia występują w starszych hodowlach, a makrokonidia nie są obecne (Rys 1). *E. floccosum* daje pozytywny wynik w teście ureazowym oraz ujemny wynik w teście perforacji włosa. (Krzyściak *et al.*, 2011).



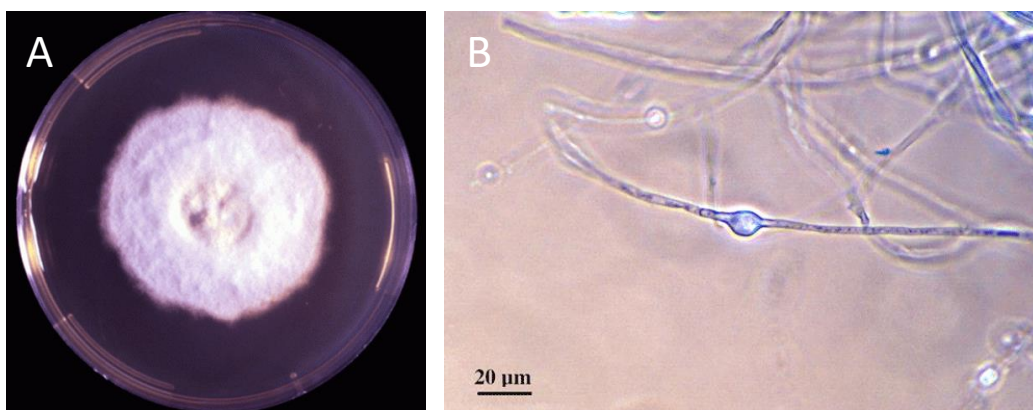
Rys 1. Kolonia *E. floccosum*. Wzrost na podłożu SGA (A) oraz obraz mikroskopowy prezentujący makrokonidia (B) i chlamydiokonidia (C) (<http://www.mycology.adelaide.edu.au/>).

1.1.2. Charakterystyka rodzaju *Microsporium*

Grzyby z rodzaju *Microsporium* są blisko spokrewnionymi dermatofitami. Obecnie, w skład tego rodzaju, wchodzi jedynie 3 gatunki (de Hoog *et al.*, 2017). Do identyfikacji grzybów z tego rodzaju stosowane są metody makro- i mikroskopowe. Stosowany jest również test perforacji włosa oraz test Christensena (ureazowy). W celu różnicowania gatunków *M. audouinii* i *M. canis* można wykorzystać pożywkę ryżową. Pierwszy z nich wykazuje na takiej pożywce słaby wzrost, wytwarza brązowy barwnik oraz nie wytwarza konidiów, natomiast *M. canis* rośnie na niej obficie, wytwarza

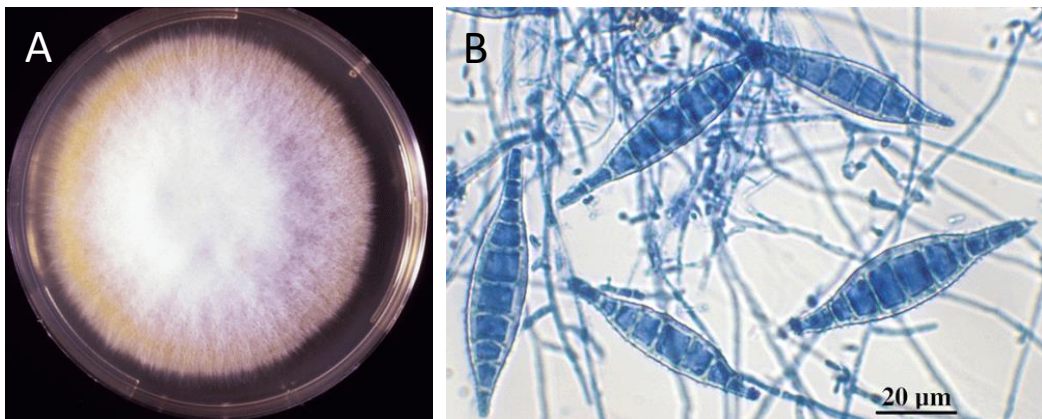
żółty barwnik oraz konidia. *Microsporium* powoduje grzybicę skóry głowy oraz grzybicę skóry gładkiej (Kalinowska *et al.*, 2010).

Microsporium audouinii należy do gatunków antropofilnych o szerokim zasięgu geograficznym. Częstość zachorowań na grzybicę wywołanych tym patogenem jest jednak niewielka poza Afryką i Azją. Wywołuje grzybicę skóry owłosionej oraz gładkiej i występuje zazwyczaj u dzieci (Kalinowska *et al.*, 2010). Kolonie rosną wolno, są płaskie, aksamitne oraz wełniaste, w kolorze białawym, szarym lub różowo-płowym. W obrazie mikroskopowym makrokonidia występują bardzo rzadko i są nieregularne, wrzecionowate, przewężone w środku i dziobate. Mikrokonidia również występują rzadko i są gruszkowate do maczugowatych ze ściętą podstawą, zazwyczaj jednokomórkowe. Okazyjnie obserwowane są grubościennie chlamydokonidia (Krzyściak *et al.*, 2011) (Rys 2).



Rys 2. Kolonia *M. audouinii*. Wzrost na podłożu SGA (A) i obraz mikroskopowy prezentujący chlamydokonidia (B) (<http://www.mycology.adelaide.edu.au/>).

Microsporium canis jest gatunkiem zoofilnym, najczęściej powodującym grzybicę powierzchniową u kotów. Kolonie tego grzyba są cienkie, wełniaste, silnie promieniste w kolorze srebrzystobiałym. Spód kolonii jest żółty bądź pomarańczowy. Makrokonidia są wrzecionowate z lekko zakrzywionym, dziobatym, brodawkowatym końcem. Złożone są z 6 do 12 komórek otoczonych grubą ścianą komórkową. Mikrokonidia są rzadko wytwarzane, posiadają kształt maczugowaty do gruszkowatego oraz są gładkościennie (Krzyściak *et al.*, 2011) (Rys 3).

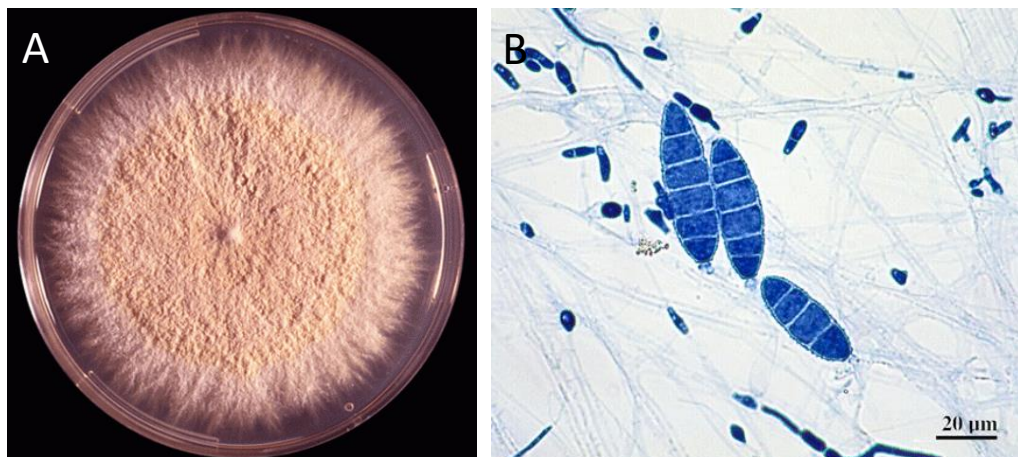


Rys 3. Kolonia *M. canis*. Wzrost na podłożu SGA (A) i obraz mikroskopowy prezentujący typowe makrokonidia (B) (Krzyściak *et al.*, 2011).

1.1.3. Charakterystyka rodzaju *Nannizzia*

Obecnie w skład rodzaju *Nannizzia* wchodzi 9 gatunków grzybów. Wytwarzają głównie kolonie bawełniane i pudrowe, w kolorze od białego poprzez kremowy do brązowego czy też czerwonego. Strzępki cienkościenne, szkliste (de Hoog *et al.*, 2017).

Nannizzia gypsea, we wcześniejszej nomenklaturze znane jako *Microsporum gypseum*, jest gatunkiem geofilnym, rozpowszechnionym na całym świecie, jednakże rzadko występującym w Ameryce Północnej i Europie (Krzyściak *et al.*, 2011). U ludzi wywołuje grzybicę skóry owłosionej oraz gładkiej. Najbardziej narażeni na infekcję tym patogenem są ludzie uprawiający ziemię (Kalinowska *et al.*, 2010). Kolonie należą do szybko rosnących, są płaskie, pudrowate o kolorze cynamonowym z białą obwódką grzybni. W obrazie mikroskopowym grubościenne makrokonidia występują w dużych skupiskach. Są wrzecionowate, z zaokrąglonym końcem lub owalne, składają się z 3 do 8 komórek. Mikrokonidia występują na szypułkach, ich ściany są gładkie i cienkie, maczugowate (Krzyściak *et al.*, 2011) (Rys 4).



Rys 4. Kolonia *N. gypsea*. Wzrost na podłożu SGA (A) i obraz mikroskopowy przedstawiający makrokonidia (B) (<http://www.mycology.adelaide.edu.au/>).

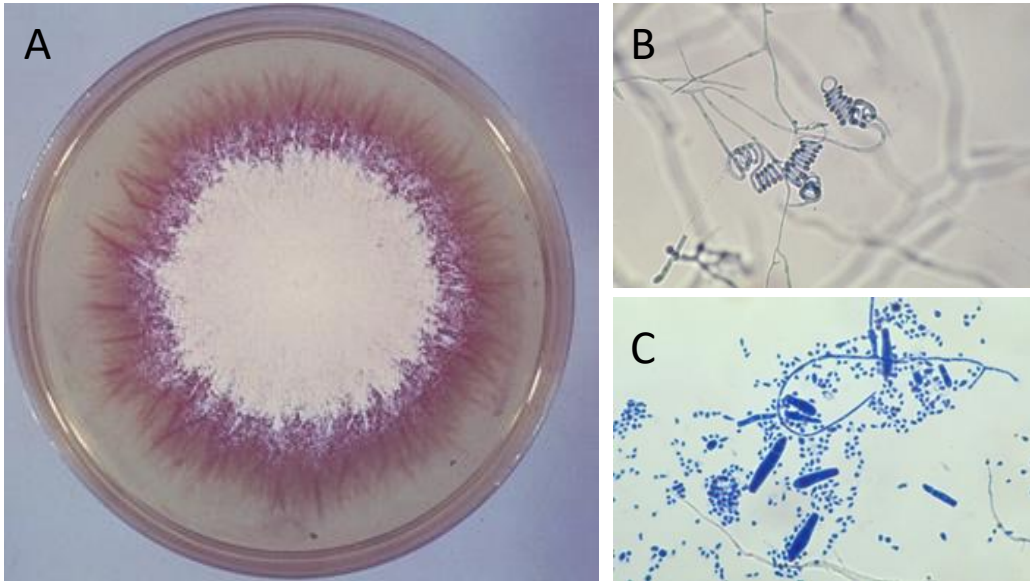
1.1.4. Charakterystyka rodzaju *Trichophyton*

Rodzaj *Trichophyton* jest reprezentowany przez 16 gatunków dermatofitów (de Hoog *et al.*, 2017). W latach 2003-2007 na Śląsku prowadzono badania, które wykazały, iż grzyby z rodzaju *Trichophyton* stanowiły aż 92% wszystkich hodowli dermatofitowych. Dostępne są podłoża, które teoretycznie umożliwiają odróżnienie poszczególnych gatunków z tego rodzaju, jednakże z powodu występowania zjawiska pleomorfizmu, często trudno jest odróżnić je od siebie. Zjawisko to polega na transformacji grzybni ze wzrostu od dzikiego typu do postaci białej, puszystej grzybni, izolaty w takiej formie nie produkują makro- i mikrokonidiów. Opracowane zostały różne testy, które umożliwiają różnicowanie takich szczepów (Kalinowska *et al.*, 2009, Krzyściak *et al.*, 2011):

- posiew na płynne podłoże Sabouraud: umożliwia określenie czy grzyb rośnie w postaci osadu czy kożucha;
- test Christensena (ureazowy): pozwala na stwierdzenie czy dany izolat rozkłada mocznik;
- test perforacji włosa: umożliwia określenie czy dany gatunek wytwarza organy perforacyjne;
- test witaminowy: pozwala na ustalenie wymagań żywieniowych;
- posiew na podłoże Sabouraud z 3% lub 5% NaCl: umożliwia określenie preferencji izolatu względem zasolonego środowiska;
- obserwacja wzrostu w 37°C.

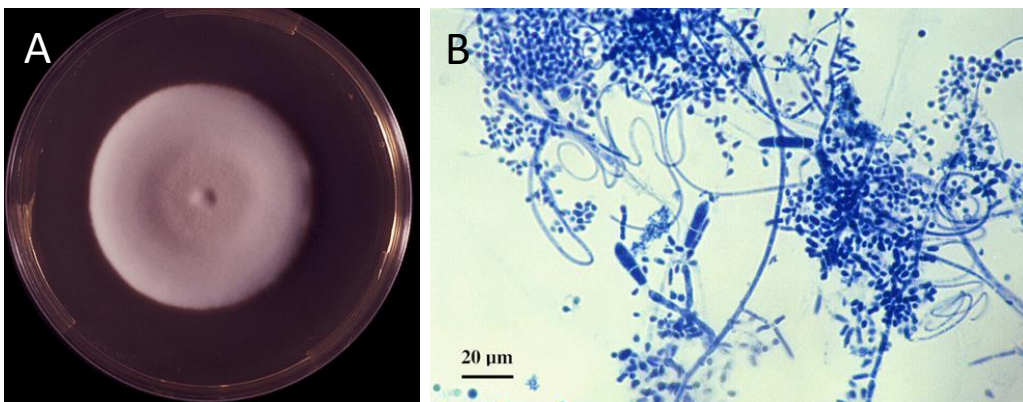
Trichophyton mentagrophytes jest gatunkiem zoofilnym występującym na całym świecie. U ludzi wywołuje zakażenia skóry gładkiej i włosów (Kalinowska *et al.*, 2009). Kolonie szybko rosną, mają pudrowatą lub kłaczkowatą powierzchnię w kolorze kremowym bądź żółtym, natomiast od spodu kolonie są brązowe bądź czerwone (Rys. 5A). W obrazie mikroskopowym makrokonidia

składają się z 3 do 8 komórek, posiadają gładkie i cienkie ściany, są maczugowate lub w kształcie cygara, zazwyczaj rozsiane. Mikrokonidia są kuliste, osadzone na strzępkach, ułożone na konidioforze w gęste groniaste skupiska. Często obecne są strzępki spiralne. Czasem obserwuje się kandelabry woszczynowe i chlamydospory (Krzyściak *et al.*, 2011) (Rys 5B).



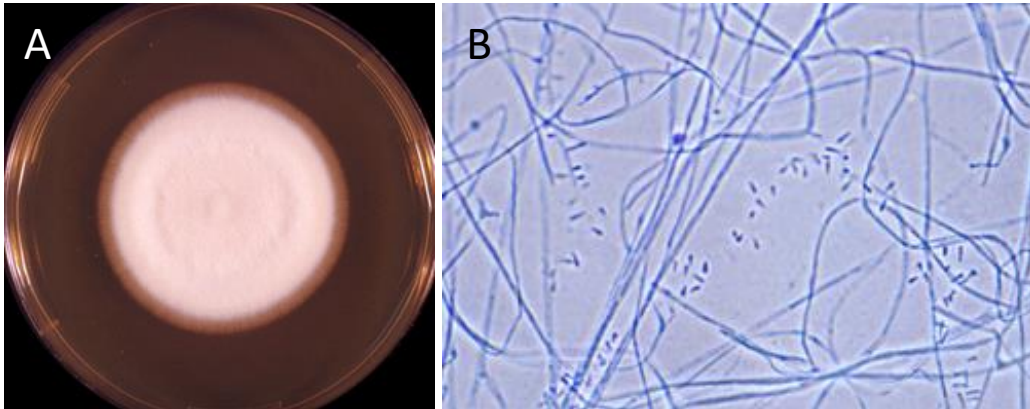
Rys 5. Kolonia *T. mentagrophytes*. Wzrost na podłożu SGA (A) oraz obraz mikroskopowy na którym znajduje się strzępka spiralna (B) oraz liczne makrokonidia (C) (<http://www.mycology.adelaide.edu.au/>).

Trichophyton interdigitale jest gatunkiem antropofilnym rozpowszechnionym na całym świecie. U ludzi powoduje infekcje skóry dłoni i stóp oraz infekcje płytki paznokcia (Kalinowska *et al.*, 2009). Kolonie są cienkie, kłaczkowate, białe (Rys 6A). W obrazie mikroskopowym makrokonidia występują bardzo rzadko, a mikrokonidia są kuliste bądź w kształcie łez. Obecne są strzępki spiralne (Krzyściak *et al.*, 2011) (Rys 6B).



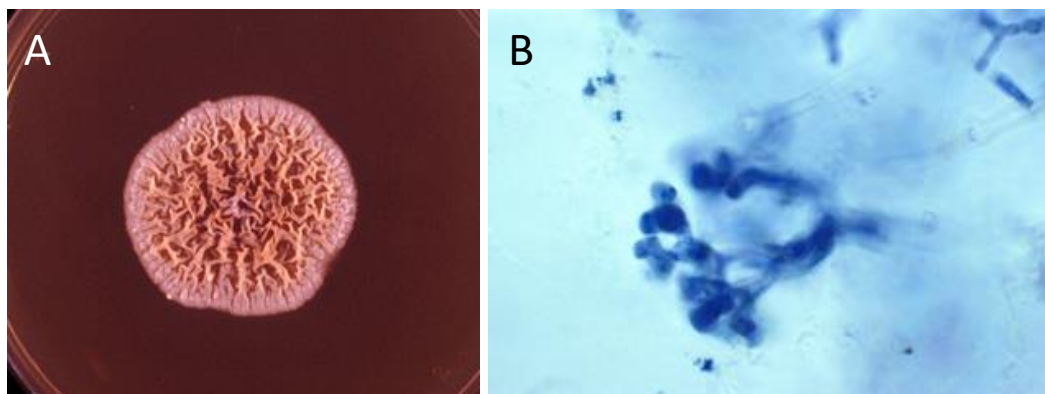
Rys 6. Kolonia *T. interdigitale* Wzrost na podłożu SGA (A) oraz obraz mikroskopowy (B) (<http://www.mycology.adelaide.edu.au/>).

Trichophyton rubrum jest gatunkiem antropofilnym, który bywa również izolowany od psów i kotów. Infekuje wszystkie powierzchnie ciała, za wyjątkiem skóry głowy. Należy on do dermatofitów powodujących chroniczne infekcje (Kalinowska *et al.*, 2009). W obrazie mikroskopowym makrokonidia na ogół są nieobecne, natomiast mikrokonidia są klinowate lub gruszkowate, osadzone na niezróżnicowanych strzępkach (Rys 7A). Kolonie wyrastają szybko, są puszyste lub kosmate, białe bądź żółte, z wiekiem różowieją (Rys. 7B) (Krzyściak *et al.*, 2011).



Rys 7. Kolonia *T. rubrum*. Wzrost na podłożu SGA (A) oraz obraz mikroskopowy prezentujący mikrokonidia (B) (<http://www.mycology.adelaide.edu.au/>).

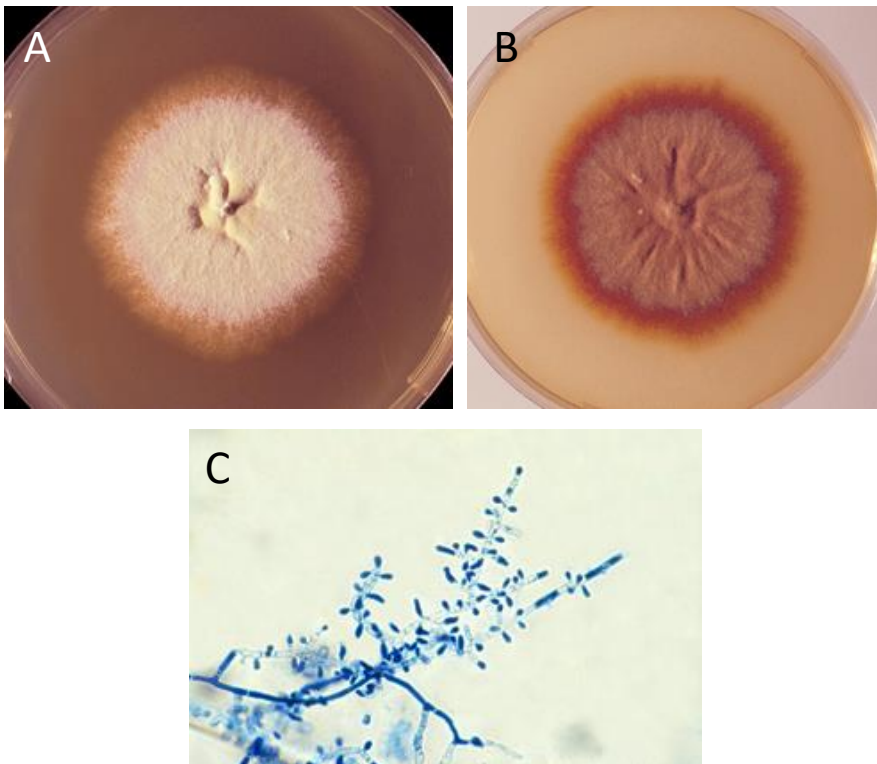
Trichophyton schoenleinii jest gatunkiem antropofilnym występującym najczęściej w Euroazji i Afryce Północnej. Kolonie są bardzo charakterystyczne o konsystencji woskowej, potem aksamitnej i skórzastej, a w centrum są pofałdowane (Rys 8A). W obrazie mikroskopowym nie występują makrokonidia ani mikrokonidia. Strzępki mają kształt rogów jelenich z obecnymi kandelabrami woszczynowymi w młodych koloniach. Obecne są liczne chlamydospory (Rys 8B) (Krzyściak *et al.*, 2011).



Rys 8. Kolonia *T. schoenleinii*. Wzrost na podłożu SGA (A) oraz obraz mikroskopowy prezentujący chlamydospory (B) (<http://www.mycology.adelaide.edu.au/>).

Trichophyton tonsurans jest gatunkiem antropofilnym rozpowszechnionym na całym świecie. Zazwyczaj wywołuje infekcje skóry owłosionej, jednakże może powodować grzybicę skóry gładkiej,

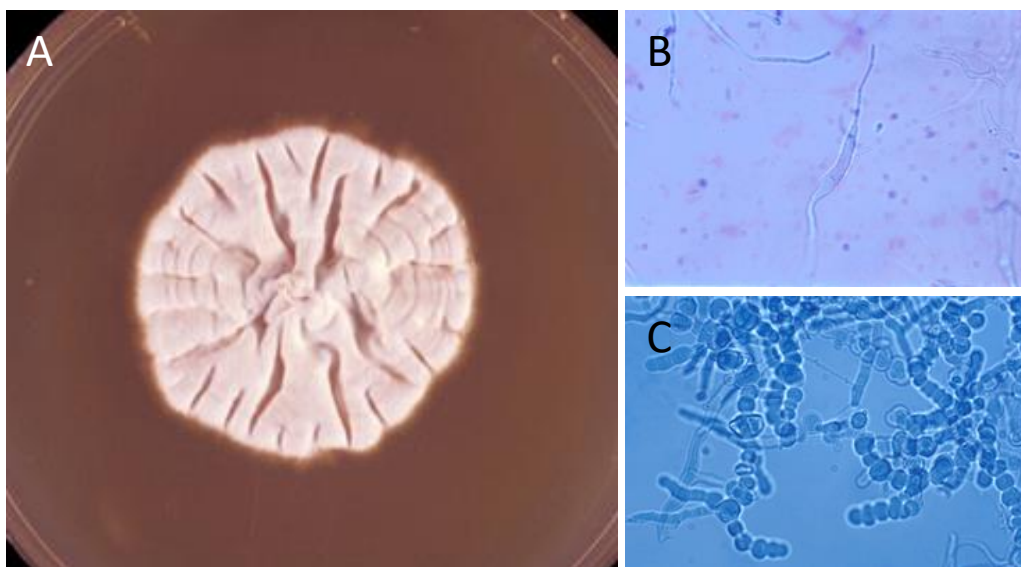
zazwyczaj w tzw. strefie prysznicowej, czyli na szyi, ramionach, plecach, pośladkach czy też stopach. Spowodowane jest to wymywaniem z głowy *inoculum* na wymienione części ciała (Kalinowska *et al.*, 2009). Kolonie wykazują dużą zmienność morfologiczną. Są zamszowe, mączyste z nieregularnymi i promienistymi bruzdami, o kolorze białym do szarawego, żółtawym lub brązowym (Rys 9A i 9B). Makrokonidia, o ile są obecne, występują w różnych kształtach, zazwyczaj są cienkościenne o gładkich brzegach. Mikrokonidia występują licznie i tworzą się na strzępkach w różny sposób: pod kątem prostym, na szypułkach, w luźnych skupiskach lub w klastrach. Chlamydiospory są liczne, a strzępki szerokie, septowate i rozgałęzione, mogą tworzyć spiralne skręcenia (Rys. 9C) (Krzyściak *et al.*, 2011).



Rys 9. Kolonia *T. tonsurans*. Wzrost na podłożu SGA (A, B) oraz obraz mikroskopowy przedstawiający mikrokonidia (C) (<http://www.mycology.adelaide.edu.au/>).

Trichophyton verrucosum jest gatunkiem zoofilnym, zazwyczaj występującym u koni i bydła. Kolonie są małe, rosną wolno, zazwyczaj w kształcie guzika bądź wyniosłe, otoczone strzępkami na obwodzie. Młode kolonie są białe i woskowe, a starsze aksamitne i kremowe. Wykazuje tendencje do wrastania w podłoże (Rys 10A). Rzadko występuje zarodnikowanie, a w obrazie mikroskopowym makrokonidia, jeżeli są obecne, posiadają gładkie i cienkie ściany, w kształcie strączka fasoli szparagowej, zazwyczaj 4-7 komorowe (Rys 10B). Mikrokonidia, o ile są obecne, są owalne bądź gruszkowate. W młodych izolatach występują końcowe i interkalarne chlamydiospory, które

zazwyczaj układają się w łańcuchy (Rys 10C). Strzępki natomiast mogą kończyć się rozgałęzieniami przypominającymi rogi jelenia (Krzyściak *et al.*, 2011).

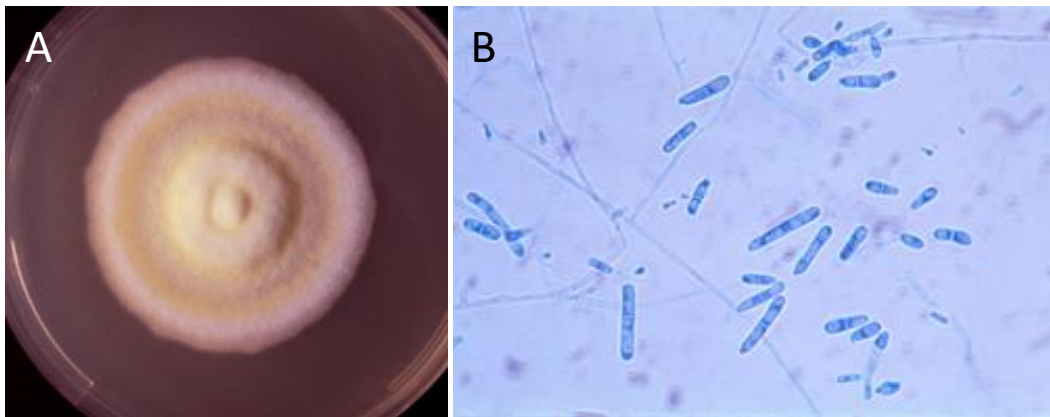


Rys 10. Kolonia *T. verrucosum*. Wzrost na podłożu SGA (A) oraz obraz mikroskopowy z charakterystycznymi makrokonidiami (B) oraz chlamydospory układające się w łańcuchy (C) (<http://www.mycology.adelaide.edu.au/>).

1.1.5. Charakterystyka rodzaju *Arthroderma*

Grzyby z rodzaju *Arthroderma* (A.) są najliczniejszym rodzajem dermatofitów, w skład którego wchodzi aż 21 gatunków. Wytwarzają kolonie od ziarnistych po bawełniane, w kolorach od żółtego po brązowe. Strzępki są szliste oraz cienkościenne (de Hoog *et al.*, 2017).

Arthroderma insingulare, według poprzedniej nomenklatury znana jako *Trichophyton terrestre*, jest gatunkiem geofilnym, występującym na całym świecie. Kolonie są szybko rosnące, filcowate i puszyste w kolorze jasnokremowym bądź brązowym (Rys 11A). Makrokonidia nie są wyraźnie zróżnicowane od mikrokonidiów. Są od dwu- do szściokomórkowe, o gładkich i cienkich ścianach, w kształcie maczugowatym lub cylindrycznym. Mikrokonidia znajdują się na gęsto ułożonych konidioforach z licznymi prostopadłymi odgałęzieniami. Obserwuje się strzępki raketowe, spiralne oraz chlamydospory (Rys 11B) (Krzyściak *et al.*, 2011).



Rys 11. Kolonia *A. insingulare*. Wzrost przypominający *T. mentagrophytes* na podłożu SGA (A) oraz obraz mikroskopowy (B) (<http://www.mycology.adelaide.edu.au/>).

1.2. Dermatofitozy

1.2.1. Czynniki predysponujące do rozwoju dermatofitoz

Zakażenia grzybicze, które do tej pory rzadko powodowały odpowiedź immunologiczną obecnie często powodują nasilony stan zapalny bądź reakcje alergiczne. Przyczynia się do tego wiele czynników, między innymi agresywne terapie, zamieszkiwanie w dużych skupiskach ludzi, korzystanie ze wspólnych urządzeń sanitarnych czy też noszenie obuwia z tworzyw sztucznych. Rozwojowi zakażenia sprzyja obniżenie odporności gospodarza oraz obecność czynników predysponujących, takich jak maceracja skóry, nieodpowiednie jej odżywienie, zaburzenia złuszczenia czy też mikrourazy skóry, paznokci.

Czynniki predysponujące do rozwoju infekcji grzybiczych można podzielić na trzy grupy (Hejniak, 2000):

- wrodzone: atopia, zaburzenia rogowacenia oraz mechanizmy odporności immunologicznej, predyspozycje genetyczne;
- nabyte: stosowanie leków (m.in. immunosupresantów, kortykosterydów, chemoterapeutyków, antybiotyków), choroby (m.in. nowotwory, udary mózgu, zakażenia wirusem HIV, choroby naczyń obwodowych, sarkoidoza), ciąża czy też okres noworodkowy lub podeszły wiek;
- środowiskowe: życie w dużych aglomeracjach bądź grupach środowiskowych (mieszkańcy internatów, akademików, żołnierze, górnicy czy też sportowcy).

1.2.2. Czynniki wirulencji - proteazy i lipazy dermatofitów

Dermatofity posiadają zdolność do wnikania do warstwy rogowej naskórka, paznokci oraz włosów, a w rezultacie powodują rozwój tzw. grzybic powierzchniowych. Przenikanie tkanek

gospodarza jest ułatwione poprzez wytwarzane przez grzyby proteazy i lipazy, które doprowadzają do przerwania błony komórkowej poprzez zaburzenie jej struktury (Weitzman i Summerbell, 1995).

Proteazy, które rozkładają keratynę komórek zrogowaciałych nazywamy keratynazami. Odpowiadają one za katalizowanie rozpadu wiązania peptydowego białek oraz peptydów (Monod *et al.*, 2002). Grzyby wydzielają proteazy, gdy znajdują się na podłożu, które zawiera białka jako jedyne źródło azotu (Brouta *et al.*, 2001). Jeżeli w podłożu znajdują się wolne aminokwasy bądź jony amonowe następuje supresja ekspresji genów kodujących keratynazy (Monod *et al.*, 2002). Proteazy te są produkowane przez wiele dermatofitów, między innymi *T. mentagrophytes*, *T. rubrum* oraz *M. canis* i *N. gypsea*, co prawdopodobnie jest związane z ich dużą zdolnością do infekcji włosów (Kobierzycka i Cisło, 2005). Niektóre dermatofity, takie jak *N. gypsea*, *T. mentagrophytes* czy *T. verrucosum*, cechuje zdolność trawienia elastyny, co uwidacznia się w przypadku infekcji skóry oraz może mieć wpływ na ich dużą wysoką wirulencję (Muhsin *et al.*, 1997).

Drugą grupą enzymów, mającą istotne znaczenie w mechanizmie infekcji grzybiczych są fosfolipazy. Przeprowadzają one hydrolizę wiązań estrowych glikofosfolipidów. Produkowane są przez liczne gatunki dermatofitów, m. in. *N. gypsea*, *M. canis*, *E. floccosum* i *T. rubrum*. Mają wpływ na utrzymanie prawidłowej funkcji błony komórkowej grzybów, jak również wpływają na wirulencję, poprzez hydrolizę glicerofosfolipidów znajdujących się w błonie komórkowej gospodarza (Muhsin *et al.*, 1997, Ghannoum, 2000, Schaufuss i Steller, 2003). Fosfolipazy mogą być również integralną częścią aparatu litycznego rodzaju *Trichophyton* lub aktywować nieznaną szlak lityczny aktywowany przez wydzieliny pozakomórkowe (Martin *et al.*, 1975, Schaufuss i Steller 2003). Enzymy te mogą mieć wpływ na indukcję stanu zapalnego poprzez aktywację reakcji immunologicznej gospodarza, co jest związane z migracją limfocytów, makrofagów, neutrofilów i komórek tucznych do skóry. Z drugiej strony, hemolizyny produkowane przez rodzaj *Trichophyton* charakteryzują się dużą toksycznością dla komórek gospodarza, co może mieć wpływ na słabszą odpowiedź immunologiczną (Schaufuss i Steller, 2003).

1.2.3. Patomechanizm zakażeń grzybami chorobotwórczymi

Skóra, którą pokrywa rogowa warstwa naskórka oraz jej zrogowaciałe przydatki tworzą trudne warunki dla rozwoju grzybic. Jednakże drobne urazy, podrażnienie bądź przerwanie ciągłości tkanek, fizjologiczne nieprawidłowości w mechanizmach obronnych, jak również niekorzystne zmiany w środowisku, umożliwiają grzybom inwazję. Kolonizacja oraz rozwój infekcji zależą zarówno od gospodarza, jak i grzyba (Hejniak, 2000).

Organizm człowieka wykształcił liczne mechanizmy obronne, które przeciwdziałają penetracji patogenu. Zaliczamy do nich przyspieszenie podziałów komórkowych naskórka, co umożliwia wydalanie komórek grzyba wraz ze zluszcządzającą się warstwą rogową (Berk *et al.*, 1976, Macura,



1990, Weitzman i Summerbell, 1995), zachowanie ciągłości powłok skórnych i śluzowych (Majewski i Macura, 1984, Hejniak 2000), obecność kwasów tłuszczowych w łożu zawierających 7, 9, 11 i 13 atomów węgla, które wykazują zdolność do hamowania wzrostu grzybów (Hay *et al.*, 1992, Hejniak 2000), jak również mikroflora bakteryjna, która współzawodniczy o niszę na powierzchni komórki tworząc dodatkową fizyczną barierę (Macura, 1987; Macura 1990, Hejniak 2000).

Innym mechanizmem obronnym jest obrona przed uogólnieniem procesu zakażenia, a w jej skład wchodzi odporność komórkowa i humoralna (Baran i Ziarkiewicz, 1990; Dahl, 1993, Hejniak 2000), układ fagocytarny, siateczkowo-śródbłonkowy oraz dopełniacza (Hay, 1982; Ghannoum, 1988; Dahl, 1994, Hejniak 2000).

Natomiast do właściwości grzybów, które umożliwiają kolonizację i rozwój infekcji można zaliczyć: adhezję, kiełkowanie i inwazję (Hejniak, 2000).

1.2.4. Leczenie

W leczeniu infekcji wywołanych dermatofitami jako pierwsze stosowane są zazwyczaj miejscowe leki przeciwgrzybicze. Wynika to z ich wysokiej skuteczności, jak również niewielkiego potencjału ogólnoustrojowych działań niepożądanych. Główne klasy miejscowych leków przeciwgrzybiczych obejmują polieny, azole, alliloamina/benzyloaminy oraz pochodne pirydynonu. Zgodnie z pracami przeglądowymi publikowanymi na przestrzeni ostatnich kilku lat można uznać, iż nie ma różnicy nie tylko w skuteczności tych antymikotyków, ale również w ich tolerancji oraz bezpieczeństwie (Gupta i Cooper, 2008, Rotta *et al.*, 2012, El-Gohary *et al.*, 2014, Sahni *et al.*, 2018).

W terapii doustnej jako pierwsza (w zależności od szerokości geograficznej) stosowana jest zazwyczaj terbinafina lub gryzeofulwina (Gupta *et al.*, 2017). Doustny ketokonazol nie jest rekomendowany w leczeniu dermatofitoz od 2013 roku ze względu na możliwe ciężkie uszkodzenie wątroby, problemy z nadnerczami, jak również szkodliwe interakcje z innymi lekami (FDA 2013, FDA 2016). Doustne antymikotyki są skuteczne wobec szerokiego spektrum gatunków dermatofitów, a porównując do leków stosowanych powierzchniowo wykazują wyższą skuteczność. Jednakże, ze względu na powiększającą się wiedzę dotyczącą toksyczności leków antygrzybiczych, głównie wobec wątroby oraz interakcji z innymi lekami (Raschi *et al.*, 2014), terapię doustną stosuje się tylko w przypadkach infekcji dotyczących rozległych partii ciała, nawracających oraz dotyczących *tinea capitis* (Gupta *et al.*, 2017).



1.2.5. Rodzaje dermatofitoz

Grzybice spowodowane przez dermatofity zostały nazwane zgodnie z miejscem, w którym wywoływały stan zapalny poprzez dodanie do słowa *tinea* (ang. grzybica) miejsca występowania w języku łacińskim. I tak np. grzybica skóry głowy nosi nazwę *tinea capitis*.

Tinea barbae odnosi się do grzybicy brody i wąsów. Zazwyczaj jest ona powodowana przez patogeny zoofilne, dlatego też występuje przede wszystkim u rolników (Hainer, 2003).



Rys 12. *Tinea barbae* wywołana *T. verrucosum*
(<http://www.mycology.adelaide.edu.au/>).

Tinea capitis odnosi się do grzybicy głowy, rzęs i brwi. Głównym objawem jest wyłysienie w miejscu infekcji jak również powstanie stanów zapalnych. Zazwyczaj czynnikami etiologicznymi powodującymi ten rodzaj dermatomikozy są gatunki należące do rodzaju *Microsporum* oraz *Trichophyton*. Wyróżniamy cztery rodzaje grzybic wśród *tinea capitis*: drobnozarodnikową, strzygącą, strzygącą głęboką oraz woszczynową (Hainer, 2003).



Rys 13. *Tinea capitis* wywołana przez *M. canis* (<http://www.mycology.adelaide.edu.au/>).

Tinea corporis jest grzybicą skóry nieowłosionej (gładkiej) i odnosi się do grzybic skóry tułowia, ramion i nóg, z wyłączeniem pachwin, dłoni i stóp. Infekcje często mają charakter przewlekły i są wywołane przez wszystkie dermatofity. Wśród dorosłych infekcje powodują zazwyczaj gatunki *T. rubrum* oraz *T. interdigitale*, u dzieci natomiast obserwuje się głównie zachorowania spowodowane przez gatunki odzwierzęce (Nenoff *et al.*, 2014).



Rys 14. *Tinea corporis* wywołana przez *M. canis* (<http://www.mycology.adelaide.edu.au/>).

Tinea cruris odnosi się do grzybicy pachwin, odbytu i okolic łonowych. Czynnikiem etiologicznym wywołującym ten rodzaj grzybicy są *E. floccosum* oraz *T. rubrum*. Zazwyczaj występuje w ciepłym klimacie, gdzie maceracja i potliwość skóry w okolicach pachwin sprzyja rozwojowi infekcji (Richardson i Warnock 1993, Weitzmann i Summerbell, 1995).

Tinea faciei występuje na policzkach, a także powiekach i regionie podżuchwowym. Charakteryzuje się rumieniową, odśrodkowo rosnącą, dyskretnie łuszczącą się zmianą z widocznymi granicami często nawet bez świądu. Wywoływana jest zazwyczaj przez szczepy *T. interdigitale* oraz *M. canis* (Nenoff *et al.*, 2014).



Rys 15. *Tinea faciei* wywołana przez *T. interdigitale* (Nenoff *et al.*, 2014).

Tinea favosa, wywołwana zazwyczaj przez *T. schoenleinnii*, jest przewlekłą i chroniczną grzybicą, która występuje na nieowłosionej skórze oraz na skórze głowy. Występuje w postaci żółtej skorupy, która składa się z nabłonka oraz gęstej masy grzybni. Występuje w Euroazji oraz Afryce (Weitzman i Summerbell, 1995).



Rys 16. *Tinea favosa* (<http://www.mold.ph/>).

Tinea mannum jest grzybicą dłoni. Głównie wywołwana jest przez infekcje *T. rubrum* przeniesione z zainfekowanych stóp. W obrazie klinicznym obserwuje się zmiany hiperkeratotyczne, odśrodkowe i rumieniowo-łuskowate (Nenoff *et al.*, 2014). Samoczynne ustąpienie choroby nie występuje.

Tinea pedis określa grzybicę stóp. Wyróżniamy grzybicę: wyprzeniową, potnicową oraz złuszczającą, z odczynem alergicznym i wrzodziejącą. Zazwyczaj wywołwana jest przez *T. rubrum*, *T. interdigitale* oraz *E. floccosum* (Nenoff *et al.*, 2014).



Rys 17. *Tinea pedis* wywołana przez *T. interdigitale* (<http://www.mycology.adelaide.edu.au/>).

Tinea unguium odnosi się do grzybicy paznokci. Nazwa „onychomykoza” jest dużo mniej specyficzna, ponieważ odnosi się do grzybic zarówno wywołanych przez dermatofity, jak i inne grzyby (Weitzman i Summerbell, 1995).



Rys 18. *Tinea unguium* wywołana przez *T. rubrum* (<http://www.mycology.adelaide.edu.au/>)

Onychomykoza

Onychomykoza powodowana jest przez dermatofity, nie-dermatofity oraz drożdżaki. Szacuje się, iż nawet 5,5% ludzi na świecie dotkniętych jest onychomykozą (Maraki i Mavromanolaki, 2016, Gupta *et al.*, 2017, Dubljanin *et al.*, 2017, Totri *et al.*, 2017). W 50-70% przypadków onychomykoza wywoływana jest przez dermatofity (Ghannoum *et al.*, 2000, Ioannidou *et al.*, 2006), a niektóre źródła podają, iż jest to nawet 77% (Papini *et al.*, 2015). Głównymi czynnikami infekcyjnymi są *T. rubrum* (>50%) oraz *T. mentagrophytes* (~20%) (Ghannoum *et al.*, 2000, Ioannidou *et al.*, 2006, Papini *et al.*, 2015, Gupta *et al.*, 2016). Czynnikiem sprzyjającym rozwojowi onychomykozy są m. in. starszy wiek, występowanie choroby w rodzinie, nadmierne pocenie oraz rogowacenia (Dubljanin *et al.*, 2017), miejscowy uraz, cukrzyca, łuszczyca czy też niewydolność krążeniowa (Maraki i Mavromanolaki, 2016).

Zespół *Trichophyton rubrum*

T. rubrum jest odpowiedzialny za przewlekłą i uogólnioną dermatofitozę, który wcześniej był określany jako przewlekły zespół dermatofitozowy, uogólnione uporczywe rubrofity czy też grzybica skórna ogólna i sucha. O zespole tym można mówić, jeżeli spełnione są następujące kryteria:

- infekcją objęte są co najmniej cztery miejsca na ciele: stopy, dłonie, paznokcie oraz jeden inny obszar; obszar pachwin, który jest powszechnym miejscem, w którym występują infekcje grzybicze jest wykluczony,
- identyfikacja mikroskopowa dermatofitów w próbkach pobranych ze wszystkich czterech miejsc objętych infekcją,
- identyfikacja *T. rubrum* na podstawie hodowli z próbek z co najmniej trzech z czterech miejsc objętych infekcją.

Nie jest wciąż ustalone, czy syndrom *T. rubrum* jest oddzielną jednostką nozologiczną, a podawana wcześniej terapia kortykosteroidami (miejscowa czy też ogólnoustrojowa) może być uznana za czynnik predysponujący. Badania Pineiro *et al.*, wykazały, iż syndrom ten występuje w 7% wtórnych infekcji w wyniku autoinokulacji od pierwotnej grzybicy stóp. Endogenne hiperkortyzolizm w kontekście choroby Cushinga również uważany jest za czynnik predysponujący do przewlekłych i opornych dermatofitoz powodowanych przez *T. rubrum* (Peixoto *et al.*, 2010).



1.2.6. Antymykotyki – lekooporność

Dane literaturowe wskazują, iż leczenie dermatofitoz jest nieefektywne nawet u 40% pacjentów z grzybicą paznokci oraz u 6,5% pacjentów z grzybicą skóry nieowłosionej (Nweze *et al.*, 2007). W ostatnich latach pojawiły się doniesienia, iż za lekooporność odpowiada między innymi zbyt niskie skuteczne stężenia leku (Sanglard 2016, Bhatia *et al.*, 2019). Jednakże z pewnością nie jest to jedyny czynnik, który wpływa na pojawienie się zjawiska oporności, co potwierdza publikacja zespołu Łagowski *et al.*, 2020 w której opisuje oporność na terbinafinę u zwierząt, które nigdy nie były ekspozowane na jej obecność. Testy wrażliwości *in vitro* mogą pomóc w wyborze odpowiedniego leczenia (Łagowski *et al.*, 2020). Zgodnie z badaniami opublikowanymi przez Adimi *et al.*, 2013 przeprowadzonymi na 15 różnych gatunkach dermatofitów, spośród 10 antymikotyków stosowanych miejscowo oraz doustnie (gryzeofulwiny, terbinafiny, itraconazolu, ketokonazolu, flukonazolu, worikonazolu, klotrimazolu, cyklopiroksoaminy, amorolfiny i naftifiny), itraconazol oraz terbinafina wykazują najniższe minimalne stężenie hamujące (MIC) a gryzeofulwina oraz flukonazol wykazują największe wartości MIC (Adimi *et al.*, 2013).

Grupa Manzano-Gayosso przedstawiła wyniki badań mających na celu określenie oporności *in vitro* izolatów dermatofitów, które wyizolowano od pacjentów, którzy nie reagowali na typowe leczenie. Spośród 36 izolatów, aż siedem (jeden szczep *T. tonsurans*, trzy szczepy *T. mentagrophytes* oraz trzy szczepy *T. rubrum*) wykazało oporność na jeden lub więcej leków antygrzybiczych. Jeden szczep *T. rubrum* był oporny na trzy azole (itraconazol, ketokonazol i flukonazol), a wszystkie siedem szczepów dermatofitów było opornych na flukonazol (Manzano-Gayosso *et al.*, 2008).

W literaturze można spotkać informacje o opornych szczepach *T. rubrum* na leczenie allilaminą – terbinafiną, która specyficznie blokuje syntezę epoksydu skwalenu ze skwalenu, tym samym powodując nagromadzenie go do toksycznego stężenia i obniża poziom wytwarzania ergosterolu. Wysokie, wewnątrzkomórkowe stężenie skwalenu zakłóca działanie błony komórkowej oraz syntezę ściany komórkowej (Ryder 1992, Favre i Ryder, 1996, Odds *et al.*, 2003). Badania sekwencji DNA genu kodującego epoksydazę skwalenu izolatów *T. rubrum* opornych na terbinafinę, które były odporne krzyżowo na wszystkie badane inhibitory epoksydazy skwalenu, ujawniły specyficzne mutacje w pozycjach Leu³⁹³, Phe³⁹⁷ (Leu393Phe oraz Phe397Leu). Mutacje te znajdowały się w tym samym regionie, w którym występuje kilka mutacji zidentyfikowanych wcześniej w szczepach *S. cerevisiae* również opornych na terbinafinę (Osborne *et al.*, 2005, Osborne *et al.*, 2006, Martinez-Rossi *et al.*, 2018). Dodatkowo, w ostatnim czasie przeprowadzono badania nad 2056 izolatami *T. rubrum* i *T. interdigitale*, spośród których 17 okazało się być opornymi na terbinafinę. Analiza sekwencji genu kodującego epoksydazę skwalenu (*SQLE*) opornych szczepów ujawniła specyficzne

jednopunktowe mutacje prowadzące do podstawienia aminokwasów w jednej z czterech pozycji: Leu³⁹³, Phe³⁹⁷, Phe⁴¹⁵ oraz His⁴⁴⁰. Globalna analiza ekspresji genów nie wykazała żadnych innych istotnych różnic między szczepami posiadającymi mutację a szczepami kontrolnymi, co wskazuje, że oporność na terbinafinę prawdopodobnie wynikała z obecności wykrytych mutacji (Yamada *et al.*, 2017, Martinez-Rossi *et al.*, 2018). Jednakże, mogła ona również wynikać z różnicy w poziomie ekspresji genów. W tym miejscu warto również wspomnieć o badaniach przeprowadzonych przez Singh *et al.*, 2018 w Indiach. Spośród 63 izolatów *T. interdigitale* aż 20 było opornych na terbinafinę, 12 a z nich posiadało mutację Phe397Leu, a 8 Leu393Phe (Singh *et al.*, 2018).

Opisując lekooporność należy również wspomnieć o transporterach błony komórkowej, które są zdolne do wiązania się z różnymi związkami, w tym również z lekami przeciwgrzybiczymi, a następnie ich translokację poza komórkę. Ekspresja tych pomp molekularnych stanowi jedną z głównych przyczyn niepowodzenia leczenia poprzez zmniejszanie akumulacji szkodliwych związków w komórce (Putman *et al.*, 2000; Cervelatti *et al.*, 2006; El-Awady *et al.*, 2016). Oporność wielolekowa wynika w dużej mierze z nadekspresji genów kodujących transportery ABC (*ang.* ATP-binding cassette). Budowa tych transporterów pozostała ewolucyjnie zachowana u prokariotów i eukariotów. Transportery składają się z wysoce zakonserwowanej domeny, która wiąże nukleotydy i zmiennej domeny transbłonowej (ter Beek *et al.*, 2014). W danych literaturowych znajdują się informacje o dwóch genach kodujących białka z rodziny transporterów ABC: *mdr1* oraz *mdr2* (*z ang.* Multidrug Resistance), których nadekspresja jest obserwowana w odpowiedzi na stres wywołany przez związki przeciwgrzybicze, jednakże nic nie wiadomo na temat zdolności obu transporterów do działania jako pomp usuwających azole lub alliloaminy. W przypadku genu *mdr1* jego nadekspresja była obserwowana w wyniku ekspozycji na bromek etydyny, ketokonazol, cykloheksymid, flukonazol, gryzeofulwinę, imazalil oraz itrakonazol (Cervelatti *et al.*, 2006), a *mdr2* na akryflawinę, benomyl, bromek etydyny, ketokonazol, chloramfenikol, gryzeofulwinę, flukonazol, imali, itrakonazol, metotreksat, 1-tlenek 4-nitochinoliny oraz tiokonazol (Fachin *et al.*, 2006).

Oporność może pojawić się w wyniku przedłużonej ekspozycji na lek, tak jak w przypadku pacjenta z chorobą Dariera (Digby *et al.*, 2016) lub też u pacjentów, którzy nie przyjmowali wcześniej żadnych leków przeciwgrzybiczych (Mukherjee *et al.*, 2003). Pierwszy opisany przypadek oporności *M. canis* na terbinafinę został opisany w 2018 roku w Chinach. Oporny szczep *M. canis* został wyizolowany od domowego kota. Dalsze badania potwierdziły, iż szczep ten wykazywał oporność na terbinafinę, aczkolwiek pozostał wrażliwy na itrakonazol (Hsiao *et al.*, 2018).



Ze względu na rosnący odsetek przypadków dermatofitoz opornych na typowe leczenie, jak również przewlekłych dermatofitoz oraz poważnych skutków ubocznych antymikotyków, powstaje potrzeba poszukiwania nowych miejscowych oraz doustnych leków przeciwgrzybiczych.

1.3. Diagnostyka

1.3.1. Pobieranie próbek do badań

Materiałem do badań diagnostycznych są zmienione chorobowo włosy, opilki paznokciowe oraz łuski skórne. W przypadku łuszczących się zmian na skórze pobiera się zeszkrobinę przy pomocy jałowego skalpela, pincety, skrobaczki do kości czy też żyłki. Miejsce, z którego ma być pobierana próbka jest odkażane 70% etanolem. Jeżeli obecne są liczne ogniska zapalne próbki należy pobrać z kilku miejsc. Gdy podejrzewana jest infekcja dermatofitowa pobiera się łuski skórne z brzegu zmiany. Próbki paznokci pobiera się z miejsc zgrubiałych, przebarwionych, kruszących się, rozdławiających oraz o nierównej powierzchni po wcześniejszym przemyciu 70% alkoholem. Przy pomocy skalpela zeszkrobuje się powierzchnię płytki – pierwsza warstwa zeszkrobin jest odrzucana, a analizie poddawana jest próbka pochodząca z głębszych warstw. Pobierane też powinny być niewielkie fragmenty paznokcia oraz materiał zgromadzony pod paznokciem. W przypadku próbek pochodzących ze skóry owłosionej należy pobrać 10-15 włosów z ogniska zakażenia przy pomocy pincety (Krzyściak *et al.*, 2011).

1.3.2. Diagnostyka klasyczna

Typowa diagnostyka zakażeń grzybiczych jest oparta na badaniach mikroskopowych próbek klinicznych, a następnie hodowli w warunkach *in vitro* i morfologicznej identyfikacji próbek, co wymaga bardzo dużego doświadczenia diagnosty.

Lampa Wooda może zostać wykorzystana w celu rozpoznania zakażeń spowodowanych przez dermatofity. Została ona opisana w roku 1903 i opiera się na fluorescencji emitowanej przez skórę bądź czynnik zakaźny, oświetlane przez źródło emitujące krótkie długości fal (320-400 nm). W przypadku identyfikacji dermatofitów, fluorescencja jest emitowana przez metabolity czynnika zakaźnego. Niebieskozielone światło jest emitowane zazwyczaj w przypadku infekcji rodzajem *Microsporum*, natomiast *T. schoenleinii* emituje światło o zabarwieniu jasnoniebieskim (Asawanonda i Taylor, 1999, Klatte *et al.*, 2015, Veasey *et al.*, 2017). Lampa Wooda jest przenośna, łatwa w zastosowaniu oraz nie wymaga wcześniejszego przygotowania próbek. Z tego też względu ma liczne zastosowania, między innymi w kosmetologii, jak również przy kontroli epidemii w szkołach (Gupta i Singhi, 2004).





Rys 19. *Tinea capitis* wywołana *M. canis* oświetlona Lampą Wooda (Veasey *et al.*, 2017).

Obserwacje mikroskopowe umożliwiają wykrycie obecności strzępek grzybni oraz ich zarodników, ocenie podlega ich kształt, układ oraz wielkość. Aby przygotować taki preparat, do próbki pobranej od pacjenta dodaje się 10-20% KOH w celu rozpuszczenia keratyny (Krzyściak *et al.*, 2011).

W hodowli w warunkach *in vitro* stosowany jest agar Sabouraud, który umożliwia wzrost tylko grzybom. Stosowany może być również agar Kimmig, umożliwiający wzrost drożdżom oraz dermatofitom, jednakże wzrost na nim jest powolniejszy aniżeli na podłożu Sabouraud. Zazwyczaj, typowa hodowla dermatofitów wymaga wzrostu przez 2 do 5 tygodni w temperaturze 37°C. Następnie wymagana jest identyfikacja makroskopowa i mikroskopowa. Rekomendowane jest zastosowanie dodatkowych substancji, które hamują wzrost bakterii (chloramfenikol, streptomycyna, penicylina) (Tchernev *et al.*, 2013).

Hodowla na podłożach sztucznych nie jest środowiskiem optymalnym dla wzrostu dermatofitów, dlatego też mimo obecności żywych grzybów w materiale klinicznym, wynik hodowli może być ujemny (Krzyściak *et al.*, 2011). Dodatkowo, fałszywie ujemny wynik może wynikać z ograniczonej żywotności spowodowanej wcześniejszym leczeniem antymikotykami, bądź niewystarczającej ilości pobranego inokulum (Graser *et al.*, 2018). Kolonie, które wyrosły na podłożach ocenia się ze względu na kształt, fakturę, wielkość, kolor oraz zabarwienie podłoża.

Test ureazowy jest również przydatny w identyfikacji dermatofitów. Wykorzystywany jest w nim agar Christensena, który w swoim składzie zawiera mocznik. Niektóre dermatofity wykazują zdolność wytwarzania ureazy, która katalizuje rozkład mocznika na amoniak i dwutlenek węgla, w wyniku czego wzrasta pH, a w efekcie obserwuje się zmianę koloru wskaźnika znajdującego się w pożywce z żółtej (pH 6.8) na czerwoną (pH 8.1) (Zafar *et al.*, 2017). Mocznik jest rozkładany przez *T. interdigitale*, *T. mentagrophytes*, *M. canis*, *N. gypsea*, co odróżnia je od *T. rubrum*, który w teście ureazowym daje wynik ujemny (Kurnatowska i Kurnatowski, 2018). Do testów



mikroskopowych zalicza się również test perforacji włosa, który polega na obserwacji czy dany patogen posiada zdolność do penetrowania w głąb struktury włosa

Obserwacja mikroskopowa próbek klinicznych jest bardzo szybka i umożliwia zdiagnozowanie infekcji grzybiczych, jednakże nie zapewnia różnicowania pomiędzy dermatofitami, a innymi grzybami, jak również daje fałszywie-negatywne wyniki w 5 do 15% przypadków (Gentles, 1971; Singh *et al.*, 2003). Hodowla *in vitro* umożliwia identyfikację gatunku, opartą na kryteriach morfologicznych i biochemicznych. Jednakże jest to czasochłonne ze względu na powolny wzrost dermatofitów oraz potrzebę wykonania dodatkowych testów fizjologicznych. Dodatkowo, hodowla daje wynik ujemny nawet w 40% przypadków, które były oznaczone jako pozytywne w badaniach mikroskopowych (Weinberg *et al.*, 2003).

1.3.3. Diagnostyka molekularna

Skrócenie czasu niezbędnego do identyfikacji patogenu, wyeliminowanie błędnych diagnoz oraz możliwość przeprowadzenia w rutynowych laboratoriach mikrobiologicznych są niewątpliwymi zaletami zastosowania technik biologii molekularnej w diagnostyce mikrobiologicznej. Obecnie w celu identyfikacji zakażeń wywoływanych przez dermatofity wykorzystuje się metody oparte na reakcji PCR i jej odmianach takie jak: PCR fingerprinting, Real-Time PCR, Random Amplification of Polymorphic DNA (RAPD), PCR and Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR/RFLP) czy też Arbitrarily Primed-PCR (Brillowska-Dąbrowska, 2009).

W literaturze zostały opisane liczne testy diagnostyczne oparte na reakcji PCR (Bontems *et al.*, 2009, Ebihara *et al.*, 2009, Bergmans *et al.*, 2010, Wisselink *et al.*, 2011, Bergman *et al.*, 2013, Miyajima *et al.*, 2013, Verrier *et al.*, 2013, Abastabar *et al.*, 2014), jednakże tylko nieliczne zostały wykorzystane w rutynowej pracy (Brillowska-Dąbrowska *et al.*, 2007; Alexander *et al.*, 2011; Kondori *et al.*, 2013; Mehlig *et al.*, 2014). Może być to spowodowane ograniczeniami wynikającymi z niewielkiej ilości gatunków, które można zidentyfikować do poziomu gatunku, skomplikowanej i wieloetapowej metodzie izolacji DNA z próbek pobranych od pacjenta (Garg *et al.*, 2009; Litz i Cavagnolo, 2010; Berk *et al.*, 2011; Bergman *et al.*, 2013; Miyajima *et al.*, 2013), potrzeby stosowania zautomatyzowanych systemów, które nie są dostępne w małych laboratoriach (Wisselink *et al.*, 2011), a przede wszystkim potrzeby przeprowadzenia długotrwałego etapu hodowli, który jest konieczny do izolacji DNA.

1.3.4. Cele molekularne

Jako cel molekularny wykorzystuje się fragment genomu, który charakteryzuje się wysokim stopniem zróżnicowania między gatunkami. Odpowiednia czułość zapewniana jest poprzez wybranie fragmentu DNA, który występuje w wielu kopiach. W przypadku grzybów jest to tzw.



rybosomalne DNA, które zawiera w swoim regionie geny kodujące podjednostki rybosomalnego RNA tj. 18S, 5.8S oraz 28S. Są one relatywnie silnie zakonserwowane wśród grzybów. Jednakże, region ten obejmuje również sekwencje obszarów zmiennych DNA ITS1 oraz ITS2 (*ang. ITS internal transcribed spacer*). Mimo iż ten region nie jest kodujący, pełni on niezwykle istotną rolę w tworzeniu pełnofunkcjonalnego rRNA, jak również wykazuje polimorfizm między gatunkami grzybów, dzięki czemu jest on bardzo dobrym celem molekularnym (Iwen *et al.*, 2002).

Od wielu lat jednym z głównych celów molekularnych w detekcji dermatofitów jest gen kodujący syntezę chitynową (*chs1*) ze względu na wysoki stopień zakonserwowania (Kano *et al.*, 2003), jednakże może być on wykorzystywany tylko do wykrywania w próbce obecności dermatofitów bez ich różnicowania. Jako cel molekularny stosuje się również gen kodujący topoisomerazę II, co umożliwia identyfikację gatunków *T. rubrum*, *T. violaceum*, *M. canis*, *N. gypsea* oraz *E. floccosum* (Kanbe *et al.*, 2003) jak również β -tubulinę, która została wykorzystana w pan-dermatofitowym Real-Time PCR (Mirhendi *et al.*, 2016).

Niezwykle istotnym problemem w identyfikacji dermatofitów metodami biologii molekularnej jest fakt, iż ogólnie dostępna baza NCBI jest przepełniona identycznymi sekwencjami o różnych nazwach. Jest to spowodowane tym, iż nomenklatura wielu gatunków jest wciąż przedmiotem dyskusji. Dodatkowo, liczne szczepy, których sekwencje są w nich zdeponowane były błędnie zidentyfikowane. (Cholett *et al.*, 2015, Verrier i Monod, 2017, Chowdhary *et al.*, 2019). Spowodowane jest to między innymi tym, iż izolaty kliniczne nie zawsze posiadają takie same cechy fenotypowe jak szczepy referencyjne. Dlatego też standaryzacja z zastosowaniem szczepów referencyjnych zidentyfikowanych na podstawie cech fenotypowych jest bardzo utrudniona. Dodatkowo wiele dermatofitów słabo sporuluje w hodowli, czego efektem są słabo ujawnione cechy fenotypowe (Chowdhary *et al.*, 2019). Nie bez znaczenia jest tutaj również czynnik ludzki.

W tym miejscu warto wspomnieć o kompleksie *T. mentagrophytes/T. interdigitale*. Od wielu lat przedmiotem dyskusji jest to czy są to dwa odrębne gatunki czy też jest to gatunek *T. mentagrophytes*, a *T. interdigitale* jest jego wariantem. Powszechnie uważa się, iż termin *T. interdigitale* odnosi się do izolatów antropofilnych, a *T. mentagrophytes* dla izolatów zoofilnych (Nenoff *et al.*, 2019, Chowdhary *et al.*, 2019). Patogeny te izolowane są od ludzi z różnych miejsc – *T. interdigitale* zazwyczaj izolowany jest z niepowodujących zapaleń grzybicy stóp oraz paznokci, natomiast *T. mentagrophytes* izolowany z pozostałych powierzchni ciała takich jak skóra nieowłosiona, twarz czy też skóra głowy. Podobny problem dotyczył gatunków *T. tonsurans* i *T. equinum*, których odróżnienie metodami biologii molekularnej nie zostało dokonane. *T. equinum* był uznawany jako gatunek zoofilny, podczas gdy *T. tonsurans* był gatunkiem antropofilnym. Obecnie uważa się, iż jest to jeden gatunek. W ostatnim czasie pojawiła się debata dotycząca tego czy w Indiach dominują infekcje powodowane przez *T. mentagrophytes* (Nenoff *et al.*, 2019) czy



T. interdigitale. Warto nadmienić, iż w ostatnich latach zaobserwowano wzrost grzybiczych infekcji powierzchniowych w Indiach. Nenoff i *et al.*, doszli do wniosku, iż za te infekcje odpowiada *T. mentagrophytes*, co zostało podważone w publikacji opublikowanej przez Chowdhary i *et al.*, 2019 w której zwrócono uwagę, iż zoofilny gatunek *T. mentagrophytes* nie może powodować aż tak licznego wzrostu zakażeń grzybiczych, ponieważ infekcje takie mogą prowadzić tylko do małych samoograniczających się ognisk. Jak do tej pory nie istnieje żaden test oparty na metodach biologii molekularnej, który umożliwiłby odróżnienie tych dwóch gatunków (bądź wariantów) od siebie (Chowdhary *et al.*, 2019, Nenoff *et al.*, 2019).

1.3.5. Przygotowanie DNA

Oczyszczanie DNA z próbek włosów, skóry oraz paznokci jest niezwykle istotne. Na samym początku, próbka jest cięta na małe kawałki bądź rozdzielana mechanicznie. Następnie, stosowane mogą być metody enzymatyczne, w których wykorzystuje się inkubację z dodatkiem proteiny K przez różne okresy czasu – od 20 min (Bergman *et al.*, 2013) do całonocnej inkubacji (Kardjeva *et al.*, 2006, Sato *et al.*, 2010, Alexander *et al.*, 2011, Wisselink *et al.*, 2011, Ohst *et al.*, 2016). W drugim podejściu, które jest dedykowane głównie próbkom paznokci, stosowana jest całonocna inkubacja w roztworze rozpuszczającym paznokcie (Monod *et al.*, 1989, Bontems *et al.*, 2009, Verrier *et al.*, 2013). Następnie, DNA jest zazwyczaj izolowane z zastosowaniem komercyjnie dostępnych zestawów. Zgodnie z protokołami komercyjnie dostępnych zestawów do izolacji genomowego DNA lizaty komórkowe nanoszone są na kolumny ze złożem krzemionkowym lub jonowymiennym. W ostatnim etapie DNA ulega wymyciu. W przypadku zastosowania kolumny jonowymiennej eluat jest wysalany oraz zagęszczany poprzez precypitację alkoholową (Kardjeva *et al.*, 2006, Ohst *et al.*, 2015). DNA może być również izolowane automatycznie. W takim przypadku, lizaty mieszane są z cząsteczkami magnetycznymi, do których wiąże się DNA, po czym następują liczne etapy przemywania w celu eliminacji zanieczyszczeń (Alexander *et al.*, 2011, Wisselink *et al.*, 2011, Bergman *et al.*, 2013). W danych literaturowych znajdują się również informacje, iż ekstrakcja fenol-chloroform nadal jest stosowana (Garg *et al.*, 2009, Verrier i Monod, 2017).

W 2017 roku przez zespół Gnat *et al.* zostały opublikowane niezwykle interesujące badania, w których porównano różne metody izolacji DNA z hodowli. Najefektywniejszą metodą okazała się metoda izolacji DNA wykorzystująca fenol-chloroform, a najmniej efektywne były izolacje z zastosowaniem komercyjnie dostępnych zestawów (Gnat *et al.*, 2017).

Wyjątkowo ważne, z klinicznego punktu widzenia, było opracowanie metody, która umożliwia izolację DNA bezpośrednio z próbek klinicznych, którymi są paznokcie, włosy lub skóra. Metoda ta wymagała by wydajność DNA była jak największa oraz by uwalniane w jej procesie z komórek DNA można było stosować w reakcji PCR. Metoda ta obejmuje jedynie dwa etapy. W pierwszym etapie



stosuje się inkubację próbki w buforze w temperaturze 95°C, a w drugim etapie dodaje się 2% roztwór BSA i intensywnie miesza. Tak przygotowana mieszanina zawierająca „uwolnione” DNA może być stosowana w reakcji PCR (Brillowska-Dąbrowska, *et al.*, 2007). Jednakże, metoda ta wymaga oddzielnego dodania osobnych buforów, co w rutynowej pracy laboratoryjnej, a w szczególności w laboratorium diagnostycznym wiąże się z ryzykiem kontaminacji. Dodatkowo, „uwolnione” DNA, znajduje się w lizacie komórkowym ze wszystkim zanieczyszczeniami, co może mieć wpływ np. na odczyt fluorescencji w reakcji Real-Time PCR.

1.3.6. Technika PCR w diagnostyce dermatomikoz

Jednym z testów diagnostycznych stosowanych w rutynowej pracy laboratoryjnej jest test oparty na reakcji multipleks PCR, który umożliwia wykrywanie dermatofitów (*ang.* pan-dermatophyte), z jednoczesną identyfikacją *T. rubrum*, który jest głównym patogenem powodującym infekcje grzybicze paznokci. Reakcja ta, w połączeniu z szybką metodą izolacji DNA stosowaną w tym teście, jest pierwszą umożliwiającą identyfikację molekularną w zaledwie kilka godzin od pobrania próbki od pacjenta (Brillowska-Dąbrowska *et al.*, 2007). Przy zastosowaniu opublikowanego układu przebadano 418 próbek paznokci pobranych od pacjentów z podejrzeniem grzybicy i porównano z identyfikacją metodami klasycznymi. Stosując metodę klasyczną zidentyfikowano 63 próbki pozytywne, natomiast reakcja multipleks PCR dała wynik pozytywny w przypadku 125 próbek, z czego 116 były to infekcje *T. rubrum*. Wyniki te wskazują na dużo większą czułość oraz specyficzność PCR w stosunku do metod konwencjonalnych (Spiliopoulou *et al.*, 2015). Test ten jest również wykonywany rutynowo w Statens Serum Institut w Kopenhadze od 2005 roku.

Testem, który został wprowadzony do rutynowej pracy laboratoryjnej w Szkocji jest test oparty na technice Real-Time PCR opracowany przez Alexander *et al.*, DNA poddawane analizie izolowane jest bezpośrednio z próbek pobranych od pacjentów automatycznie przy zastosowaniu robota. Test ten ogranicza się do zidentyfikowania gatunku *T. rubrum* (Alexander *et al.*, 2011).

Kolejnym testem, o którym warto wspomnieć jest test umożliwiający identyfikację *T. rubrum/T. violaceum* przy zastosowaniu techniki PCR. Wyniki uzyskane z jego użyciem zostały porównane z wynikami uzyskanymi z użyciem technik klasycznych, obejmujących bezpośrednią obserwację mikroskopową oraz hodowle. Zaobserwowano dużo większą czułość przy zastosowaniu techniki PCR w porównaniu z metodami klasycznymi. Dla 40 próbek skóry uzyskano wynik pozytywny w reakcji PCR, natomiast techniki klasyczne dawały wynik ujemny. W 13 badanych próbkach skóry, techniki klasyczne dały wynik pozytywny, a PCR wynik ujemny. W przypadku opilków paznokci wyniki były podobne. W 47 próbkach skóry uzyskano wynik pozytywny w reakcji PCR, a przy zastosowaniu technik klasycznych - wynik ujemny. Natomiast przy zastosowaniu



techniki klasycznych uzyskano wynik pozytywny dla 8 próbek, podczas gdy przy zastosowaniu reakcji PCR uzyskano wynik ujemny (Brasch *et al.*, 2011).

Jeden z testów diagnostycznych opracowany przez zespół Mehlig *et al.*, stosowany w rutynowej pracy laboratorium diagnostycznego umożliwia detekcję i różnicowanie najczęściej identyfikowanych dermatofitów, patogennych drożdżaków oraz pleśni występujących w centralnej Europie przy zastosowaniu multipleks PCR. W teście tym wykonywane są dwie oddzielne reakcje multipleks PCR. W pierwszej stosowane są specyficzne startery dla: *E. floccosum*, *M. canis*, *N. gypsea*, *Trichosporon cutaneum*, *S. brevicaulis*, *Aspergillus* spp., *Candida* spp. W drugiej reakcji stosowane są startery specyficzne dla: *T. rubrum*, *T. interdigitale*, *Trichophyton* spp. W tym przypadku również wykazano, iż PCR dawał wynik pozytywny w próbkach, w których hodowla dawała wynik ujemny, dotyczyło to 38 szczepów *T. rubrum* oraz 12 szczepów *T. interdigitale* (Mehlig *et al.*, 2014).

Kolejnym testem, o którym warto wspomnieć jest test umożliwiający wykrycie rodzaju *Trichophyton* oraz identyfikację DNA *M. canis* i *M. audouinii*. Był on testowany na modelu zwierzęcym, w którym wykorzystano 72 kawii domowych (Saunte *et al.*, 2008). Test ten ma niezwykle ważne znaczenie w przypadku grzybic skóry i włosów, ponieważ przedstawiciele tych dwóch rodzajów stanowią główną przyczynę zakażeń.

Do wykrywania oraz identyfikacji dermatofitów została również wykorzystana technika Real-Time PCR. Opracowany test umożliwił wykrywanie dermatofitów oraz identyfikację *T. rubrum* oraz *T. interdigitale* na podstawie różnic w temperaturze topnienia produktów reakcji. Zastosowanie techniki Real-Time PCR skraca czas analizy oraz zwiększa czułość detekcji w stosunku do konwencjonalnych metod, dlatego też jej stosowanie jest niezwykle istotne. Jednakże test ten wymaga zautomatyzowanej procedury izolacji DNA, która jest niedostępna w większości laboratoriów diagnostycznych (Bergman *et al.*, 2013).

W celu sprawdzenia czy technika Real-Time PCR może być wykorzystywana w rutynowej pracy laboratoryjnej porównano ją z klasyczną reakcją PCR oraz konwencjonalnymi metodami diagnostycznymi. Do tego celu wykorzystano wcześniej opisany test (Brillowska-Dąbrowska *et al.*, 2007). Przebadano 165 próbek paznokci. 72 próbki dały wynik pozytywny w bezpośrednim badaniu mikroskopowym, 49 w hodowli, 69 w klasycznym PCR, natomiast Real-Time PCR 78. Wszystkie próbki pozytywne przy zastosowaniu klasycznego PCR były pozytywne również przy zastosowaniu Real-Time PCR, natomiast 9 próbek, które dały wynik pozytywny przy zastosowaniu Real-Time PCR dały wynik ujemny w klasycznej reakcji PCR. Warto wspomnieć, iż z tych 165 próbek tylko 70 było pobranych od pacjentów z podejrzeniem infekcji grzybiczej. Spośród tych 70 próbek, dla 68 próbek uzyskano wynik pozytywny w badaniu mikroskopowym, 49 w hodowli, 54 w klasycznym PCR, a 61 przy zastosowaniu Real-Time PCR. Spośród 95 próbek, które były pobrane od osób bez



widocznych symptomów chorobowych, 4 dały wynik pozytywny w badaniu mikroskopowym, 2 w hodowli, natomiast w klasycznym PCR aż 15, a stosując Real-Time PCR - 17. Wynik pozytywny w przypadku próbek pobranych od osób bez widocznych symptomów może wynikać z faktu, iż molekularne metody są tak czułe, że wykrywają infekcje w bardzo wczesnym stadium chorobowym, w który nie są jeszcze widoczne symptomy lub wykrywają dermatofity jako składnik przejściowej mikroflory (Gong *et al.*, 2016).

1.3.7. Genotypowanie

Genotypowanie jest metodą, która może uzupełnić tradycyjną diagnostykę mikrobiologiczną obejmującą nie tylko identyfikację gatunkową, ale również różnicowanie szczepów w obrębie gatunku. Do genotypowania dermatofitów może być stosowana metoda RAPD (ang. Random Amplification of Polymorphic DNA) (Baeza i Giannini, 2004) wykazująca średni potencjał różnicujący. Jest to metoda opierająca się na reakcji PCR, która jest przeprowadzana na genomowym DNA z zastosowaniem jednego bądź wielu starterów o często przypadkowej sekwencji, w wyniku której następuje amplifikacja fragmentów różnych regionów genomu jednocześnie. Uzyskane produkty tworzą unikalny, charakterystyczny dla danego szczepu profil. Przykładem zastosowania techniki RAPD jest opisane przez Baeza i Giannini w 2004 roku różnicowanie gatunku *T. rubrum*. W tym celu wykorzystano sześć starterów o długości 10 par zasad każdy. Zastosowanie dwóch z nich pozwoliło na wykazanie wewnątrzgatunkowego polimorfizmu uzyskując po pięć różnych wzorów dla 10 testowanych izolatów (Baeza i Giannini, 2004). Jak donosi literatura, wcześniejsze próby wykorzystania metody RAPD do różnicowania wewnątrzgatunkowego *T. rubrum* nie wykazały znaczącego polimorfizmu (Zhong *et al.*, 1997, Liu *et al.*, 2000). Wynika to z zastosowania nieodpowiednich starterów przyłączających się w bardziej zakonserwowanych rejonach genomu (Baeza i Giannini, 2004) lub też może wynikać z faktu, iż izolaty te posiadały ten sam genotyp. Metoda ta ma jednak liczne ograniczenia, nawet przy zastosowaniu różnicujących starterów, uzyskiwany wynik zależy od zastosowanych odczynników, ilości użytego DNA, a w skrajnych przypadkach od użytego termocyklera ze względu na różnice w szybkości zmian temperatury, przez co porównywanie międzylaboratoryjne wyników jest utrudnione.

Do identyfikacji gatunkowej oraz różnicowania często stosuje się starter (GACA)₄ (Faggi *et al.*, 2001, Shehata *et al.*, 2008, Lott *et al.*, 2010, Dobrowolska *et al.*, 2011, Elavarashi *et al.*, 2014). Starter ten był po raz pierwszy wykorzystany do różnicowania *Cryptococcus neoformans* (Meyer *et al.*, 1999). Zastosowanie tego startera w RAPD w przypadku *T. mentagrophytes* umożliwiło wyróżnienie różnych genotypów natomiast w przypadku gatunków *M. canis*, *N. gypseae*, *T. rubrum*, *T. ajelloi* oraz *E. floccosum* nie uzyskano różnicowania wewnątrzgatunkowego. W obrębie gatunku *T. mentagrophytes* zostały wyróżnione trzy profile produktów genotypowania, w pierwszym profilu



znalazły się szczepy wyizolowane od ludzi i zwierząt, natomiast w drugim i trzecim profilu izolaty otrzymane tylko od ludzi (Faggi *et al.*, 2001). Jednakże, w innych badaniach z wykorzystaniem startera (GACA)₄ w RAPD nie zostało wykazane różnicowanie nawet pomiędzy referencyjnymi szczepami *T. rubrum* a *T. mentagrophytes*. Badania te miały również na celu różnicowanie szczepów *M. canis*, jednakże spośród 45 izolatów został wyodrębniony tylko jeden profil, który był taki sam jak dla szczepu referencyjnego (Dobrowolska *et al.*, 2011).

Do wewnątrzgatunkowego różnicowania genetycznego dermatofitów zostały wykorzystane również takie metody jak PCR MP (*ang.* Melting Profiles) (Leibner-Ciszak *et al.*, 2010), analiza regionów ITS (Jackson *et al.*, 1999, Heidemann *et al.*, 2010) czy też analiza restrykcyjna rDNA (Jackson *et al.*, 2000). W przypadku *M. canis* do tej pory nie wykazano zróżnicowania wewnątrzgatunkowego.

W publikacji Leibner-Ciszak *et al.*, 2010 przedstawione zostały wyniki uzyskane z wykorzystaniem metody PCR MP obejmujące trzy bardzo istotne z klinicznego punktu widzenia gatunki, *T. rubrum*, *T. interdigitale* oraz *M. canis*. Te same szczepy zostały poddane analizie metodą RAPD. Różnicowanie zakończyło się sukcesem dla *T. rubrum* - wyodrębniono 5 genotypów spośród 11 badanych izolatów obiema metodami, jednakże w przypadku PCR MP udało się wyodrębnić tylko jeden genotyp. Dla *T. interdigitale* wyodrębniono 7 genotypów z 40 badanych izolatów metodą PCR MP, 3 genotypy wśród izolatów otrzymanych z ośrodka w Łodzi (Polska), 3 genotypy z ośrodka w Kopenhadze (Dania), oraz inny genotyp dla szczepu referencyjnego (CBS 120357) RAPD wykazało mniejszy potencjał różnicujący wyodrębniając 4 genotypy. Dla *M. canis* ustalono tylko jeden genotyp wspólny dla 14 badanych izolatów (Leibner-Ciszak *et al.*, 2010).

Inną metodą stosowaną w celu genotypowania jest analiza profili restrykcyjnych regionów ITS rybosomalnego DNA grzybów. W pierwszym etapie przeprowadzona jest reakcja PCR z zastosowaniem starterów o nazwie ITS 1 i ITS 4 (White *et al.*, 1990) w wyniku czego następuje amplifikacja obszaru ITS 1, 5.8S oraz ITS 2. Następnie, produkt reakcji zostaje poddany działaniu enzymu *MvaI* (Jackson *et al.*, 1999). Analiza regionów ITS umożliwia uzyskanie profili elektroforetycznych charakterystycznych dla danych gatunków, jednakże nie umożliwia ona rozróżnienia pomiędzy blisko spokrewnionymi gatunkami takimi jak *T. violaceum*, a *T. rubrum* czy też *T. mentagrophytes* a *T. schoenleinii*. (Jackson *et al.*, 1999, Shehata *et al.*, 2008).



2. Cel i zakres pracy

Jednym z najważniejszych etapów diagnostyki molekularnej jest uzyskanie DNA patogenów odpowiedzialnych za infekcje. Niestety, jest to etap limitujący diagnostykę molekularną grzybów, ponieważ izolacja DNA jest czasochłonna i kosztowna. Celem niniejszej pracy badawczej było znalezienie szybkiej metody umożliwiającej izolację DNA zarówno z grzybni, jak i próbek klinicznych oraz zaprojektowanie układu Real-Time PCR, który w pierwszym etapie wykrywałby DNA wszystkich dermatofitów, a w kolejnym etapie zapewniałby identyfikację gatunkową.

Do zrealizowania celu pracy konieczne było zrealizowanie następujących zadań:

1. Sprawdzenie możliwości wykorzystania DNA przygotowanego dwuetapową metodą opisaną wcześniej (Brillowska-Dąbrowska *et al.*, 2007) w reakcji Real-Time PCR.
2. Opracowanie algorytmu identyfikacji gatunkowej dermatofitów wraz z jego poszczególnymi etapami, w których wykorzystywane jest DNA wyizolowane opublikowaną metodą (Brillowska-Dąbrowska *et al.*, 2007):
 - opracowanie protokołu wykorzystania układu Real-Time PCR wykrywającego wszystkie dermatofity;
 - opracowanie protokołu wykorzystania układu Real-Time PCR wykrywającego gatunek *T. rubrum* z zastosowaniem starterów wcześniej opublikowanych (Brillowska-Dąbrowska *et al.*, 2007);
 - zaprojektowanie starterów umożliwiających specyficzną identyfikację gatunku *E. floccosum* oraz opracowano protokół wykorzystania układów PCR oraz Real-Time PCR wykrywających gatunek *E. floccosum*;
 - zaprojektowanie starterów umożliwiających specyficzną identyfikację gatunków należących do kompleksu *M. otae*, opracowanie protokołów wykorzystujących układy PCR oraz Real-Time PCR wykrywający specyficznie gatunek *M. canis* oraz osobno protokołu wykrywającego specyficznie gatunek *M. audouinii*;
 - zaprojektowanie starterów umożliwiających specyficzną identyfikację gatunków należących do kompleksu *T. mentagrophytes*, opracowanie protokołu wykorzystującego układy PCR oraz Real-Time PCR wykrywający specyficznie gatunek *T. mentagrophytes* oraz osobno protokołu wykrywającego specyficznie gatunek *T. interdigitale*.
3. Opracowanie nowej, enzymatycznej metody przygotowania DNA bezpośrednio z hodowli oraz próbek klinicznych do reakcji PCR oraz Real-Time PCR.



3. Materiały

3.1. Izolaty

W niniejszej pracy wykorzystano 246 izolatów grzybów. Ich pochodzenie zostało przedstawione w Tabeli 1. Zostały one zidentyfikowane metodami klasycznej diagnostyki z wykorzystaniem metod makro- oraz mikroskopowych

Tabela 1. Zestawienie izolatów wykorzystanych w niniejszej pracy

Rodzaj	Gatunek	Szczep	Pochodzenie
DERMATOFITY			
<i>Epidermophyton</i>	<i>E. floccosum</i>	EF 1 – EF 15	kliniczne, Kopenhaga (Dania)
<i>Microsporum</i>	<i>M. audouinii</i>	MA 1 – MA 4	kliniczne, Kopenhaga (Dania)
		MA 5	BCCM
		MC 1 – MC 3	kliniczne, Gdańsk (Polska)
	<i>M. canis</i>	MC 4 – MC 6	kliniczne, Gdańsk (Polska)
		MC 7 – MC 13	weterynaryjne, Warszawa (Polska)
		MC 14 – MC 71	kliniczne, Gdańsk (Polska)
		MC 72 – MC 74	kliniczne, Kopenhaga (Dania)
		MC 75, MC 76	BCCM
	<i>N. gypsea</i>	MG 1	kliniczne, Kopenhaga (Dania)
		MG 2	weterynaryjne, Warszawa (Polska)
<i>M. ferrugineum</i>	MF	kliniczne, Gdańsk (Polska)	
<i>Trichophyton</i>	<i>T. interdigitale</i>	TI 1	kliniczne, Kopenhaga (Dania)
		TI 2, TI 3	BCCM
	<i>T. mentagrophytes</i>	TM 1 – TM 4	kliniczne, Gdańsk (Polska)
		TM 5 – TM 13	weterynaryjne, Warszawa (Polska)
		TM 14	NCPF224
		TM 15 – TM 59	kliniczne, Gdańsk (Polska)
		TM 60, TM 61	BCCM
	<i>T. rubrum</i>	TR 1 – TR 11	kliniczne, Kopenhaga (Dania)
		TR 12 – TR 53	kliniczne, Gdańsk (Polska)
	<i>T. soudanase</i>	TS 1	kliniczne, Kopenhaga (Dania)
	<i>A. insingulare</i>	AI 1 – AI 7	kliniczne, Kopenhaga (Dania)
	<i>T. tonsurans</i>	TTo 1 – TTo 4	kliniczne, Kopenhaga (Dania)
	<i>T. violaceum</i>	TVio 1, TVio 2	kliniczne, Kopenhaga (Dania)
	<i>T. verrucosum</i>	TV 1, TV 2	kliniczne, Kopenhaga (Dania)
NIE-DERMATOFITY			
<i>Acremonium</i>	<i>A. charticola</i>		Gdańsk (Polska)
	<i>A. kiliense</i>		Gdańsk (Polska)
<i>Alternaria</i>	<i>A. alternata</i>		Gdańsk (Polska)
<i>Candida</i>	<i>C. albicans</i>		kliniczne, Gdańsk (Polska)
	<i>C. glabrata</i>		kliniczne, Gdańsk (Polska)
	<i>C. kruzei</i>		kliniczne, Gdańsk (Polska)
<i>Fusarium</i>	<i>F. culmorum</i>		Gdańsk (Polska)
	<i>F. oxysporum</i>		Gdańsk (Polska)
<i>Mucor</i>	<i>M. circinelloides</i>		Gdańsk (Polska)
	<i>M. racemosus</i>		Gdańsk (Polska)
<i>Penicillium</i>	<i>P. verrucosum</i>		Gdańsk (Polska)
<i>Rhizosporus</i>	<i>R. oligosporus</i>		Gdańsk (Polska)
	<i>R. oryzae</i>		Gdańsk (Polska)
<i>Scopulariopsis</i>	<i>S. brevicaulis</i>		kliniczne, Gdańsk (Polska)

3.2. Odczynniki, materiały oraz aparatura

3.2.1. Hodowla dermatofitów

- Podłoże Sabouraud (SGA), pH 5.6 (BTL Zakład Enzymów i Peptonów) o składzie:
 - 20 g dekstroza
 - 5 g pepton
 - 10 g agar
 - woda destylowana do 500 ml
- Szalki Petriego (Scienceplast)

3.2.2. Izolacja DNA

- Bufor A:
 - 60 mM NaHCO₃ (POCH)
 - 250 mM KCl (POCH)
 - 50 mM TRIS (pH 9,5) (POCH)
- Bufor B: 2% BSA (Sigma Aldrich)

3.2.3. Zaprojektowane w ramach doktoratu sekwencje starterów Pan-dermatofitowy Real-Time PCR

- Gotowe mieszaniny do reakcji Real-Time PCR:
 - Real-Time 2xPCR Master Mix SYBR[®] zestaw A (A&A Biotechnology)
 - Real-Time 2xPCR Master Mix SYBR[®] zestaw B (A&A Biotechnology)
 - Real-Time 2xPCR Master Mix SYBR[®] zestaw C (A&A Biotechnology)
 - Real-Time HS 2xPCR Master Mix EvaGreen[®] (A&A Biotechnology)
 - StartWarm 2xPCR Master Mix (A&A Biotechnology)
- Termocykler LightCycler[®] Nano (Roche)
- Zastosowane startery (Genomed):
 - panDermFor 5' GAA GAA GAT TGT CGT TTG CAT CGT CTC 3' (Brillowska-Dąbrowska *et al.*, 2007)
 - panDermRev 5' CTC GAG GTC AAA AGC ACG CCA GAG 3' (Brillowska-Dąbrowska *et al.*, 2007)

3.2.4. Przygotowanie fragmentów DNA do sekwencjonowania

- Gotowa mieszanina do reakcji Real-Time PCR: 2xPCR Mix Plus High GC (A&A Biotechnology)

- Zastosowane startery (Genomed):
 - ITS1 5' TCC GTA GGT GAA CCT GCG G 3' (White *et al.*, 1990)
 - ITS4 5' TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC 3' (White *et al.*, 1990)
- Agaroz (Blirt)
- Bufor TAE (Bio-Rad)
- Bromek etydyny (Polgen)
- Zestaw Gel-Out (A&A Biotechnology)
- Termocykler GeneAmp® PCR System 2400 (Perkin Elmer)

3.2.5. *Trichophyton rubrum*-specyficzny Real-Time PCR

- Gotowe mieszaniny do reakcji PCR oraz Real-Time PCR:
 - Real-Time 2xPCR Master Mix SYBR® zestaw A (A&A Biotechnology)
 - Real-Time 2xPCR Master Mix SYBR® zestaw B (A&A Biotechnology)
 - Real-Time 2xPCR Master Mix SYBR® zestaw C (A&A Biotechnology)
- Termocykler LightCycler® Nano (Roche)
- Zastosowane startery (Genomed):
 - TRFor 5' TCT TTG AAC GCA CAT TGC GCC 3' (Brillowska-Dąbrowska *et al.*, 2007)
 - TRFor 5' CGG TCC TGA GGG CGC TGA A 3' (Brillowska-Dąbrowska *et al.*, 2007)

3.2.6. *Epidermophyton floccosum*-specyficzny Real-Time PCR

- Gotowe mieszaniny do reakcji PCR oraz Real-Time PCR:
 - 2xPCR Mix Plus High GC (A&A Biotechnology)
 - Real-Time 2xPCR Master Mix SYBR® zestaw A (A&A Biotechnology)
- Termoblok Red Hot 35 (DNA Gdańsk)
- Termocykler GeneAmp® PCR System 2400 (Perkin Elmer)
- Termocykler LightCycler® Nano (Roche)
- Zaprojektowane w ramach doktoratu sekwencje starterów (Genomed):
 - EFFor 5' GAT TCT CAG AAA TTC TAC GAA ATC TCC 3'
 - EFRRev 5' GTC CCC TCC ACC TTT CTC CTC TC 3'

3.2.7. Identyfikacja gatunków kompleksu *A. otae*

- Gotowe mieszaniny do reakcji PCR oraz Real-Time PCR:
 - 2xPCR Mix Plus High GC (A&A Biotechnology)



- Real-Time 2xPCR Master Mix SYBR[®] zestaw A (A&A Biotechnology)
- Termoblok Red Hot 35 (DNA Gdańsk)
- Termocykler GeneAmp[®] PCR System 2400 (Perkin Elmer)
- Termocykler LightCycler[®] Nano (Roche)
- Zaprojektowane w ramach doktoratu sekwencje starterów (Genomed):
 - MCFor 5' AAC GAG CGT CGA GTT TCA TAA CCC 3'
 - MCRRev 5' GTT AGT ATT CTG CTG AAG AGA AGG GC 3'
 - MATubFor 5' AAC GAG CGT CGA GTT TCA TAA TCT 3'
 - MARRev 5' GTT AGT ATT CTG CTG AAG AGA AAG GGT 3'

3.2.8. Genotypowanie

- Gotowa mieszanina do reakcji PCR 2xPCR Mix Plus High GC (A&A Biotechnology)
- Termocykler GeneAmp[®] PCR System 2400 (Perkin Elmer)
- Agaroza (Blirt)
- Bufor TAE (Bio-Rad)
- Bromek etydyny (Polgen)
- Kuchenka mikrofalowa (Samsung)
- Zestaw do elektroforezy agarozowej Multi Sub Choice (Clever Scientific Ltd)
- Transiluminator UV UV-953 (JW ELECTRONIC)
- Zastosowane startery (Genomed):
 - GACA 5' GAC AGA CAG ACA GAC A 3' (Meyer *et al.*, 1999)
 - OPE18 5' GGA CTG CAG A 3' (Saran *et al.*, 2008)
 - OPE03 5' CCA GAT GCA C 3' (Saran *et al.*, 2008)
 - OPZ10 5' GTG CGA GCA A 3' (Rawashdeh i Amri, 2006)
 - RAPD1254 'CCG CAG CCA A 3' (Johnson *et al.*, 2004)
 - RAPD1247 5' AAG AGC CCG T 3' (Johnson *et al.*, 2004)
 - RAPD1281 5' AAC GCG CAA C 3' (Johnson *et al.*, 2004)
 - NS1 5' GTA GTC ATA TGC TTG TCT C 3' (Sivakumaran *et al.*, 2002)
 - LR3R 5' GTC TTG AAA CAC GGA CC 3' 9 (Hopple i Vilgalys, 1999)
 - LR7 5' TAC TAC CAC CAA GAT CT 3' (Bunyard *et al.*, 1996)
 - LR14 5' AGC CAA ACT CCC CAC CTG 3' (Hopple i Vilgalys, 1999)
 - 4241R 5' GCG CAG ATC CTT CAG TTG AT 3' (Chantratita *et al.*, 2011)



3.2.9. Identyfikacja gatunków kompleksu *T. mentagrophytes*

- Gotowe mieszaniny do reakcji PCR oraz Real-Time PCR:
 - 2xPCR Mix Plus High GC (A&A Biotechnology)
 - Real-Time 2xPCR Master Mix SYBR[®] zestaw A (A&A Biotechnology)
- Termoblok Red Hot 35 (DNA Gdańsk)
- Termocykler GeneAmp[®] PCR System 2400 (Perkin Elmer)
- Termocykler LightCycler[®] Nano (Roche)
- Zaprojektowane w ramach doktoratu sekwencje starterów (Genomed):
 - TMFor 5' AGG CCG GAG GCT GGC CCC CCA C 3'
 - TMRev 5' GCG CGG TCC AGC GTT GAG CCA CTA 3'

3.2.10. Nowa metoda izolacji DNA

- 10 µl proteiny K (20 mg/ml), 90 µl buforu (60 mM NaHCO₃, 250 mM KCl, 50 mM TRIS, pH 9,5)
- 20 µl proteiny K (20 mg/ml), 90 µl buforu (60 mM NaHCO₃, 250 mM KCl, 50 mM TRIS, pH 9,5)



4. Metody

4.1. Izolacja DNA

DNA stosowane do analiz izolowano tzw. krótką metodą izolacji (Brillowska-Dąbrowska *et al.*, 2007; Brillowska-Dąbrowska *et al.*, 2010). Do probówki typu Eppendorf zawierającej próbkę, którą stanowił fragment grzybni lub fragment skóry, włosów albo paznokcia dodawano 100 μ l Buforu A (60 mM NaHCO₃, 250 mM KCl and 50 mM Tris, pH 9,5). Następnie probówkę inkubowano przez 10 min w temperaturze 95°C po czym dodawano 100 μ l Buforu B (2% BSA – albumina surowicy krwi bydlęcej). Próbkę mieszano z użyciem wortexu przez 5 sekund. Tak przygotowane DNA było gotowe do analizy i przechowywane w 4°C. Ze względu na sposób przygotowywania DNA, w którym nie następuje odseparowanie DNA od pozostałych elementów komórkowych, nie określano jego stężenia.

4.2. Real-Time PCR

Reakcja Real-Time PCR prowadzona była w termocyklerze LightCycler Nano® (Roche).

Skład mieszaniny reakcyjnej stosowanej w reakcjach Real-Time PCR opisany w rozdziale Materiały 3.2.3 został przedstawiony w Tabeli 2.

Tabela 2. Skład mieszaniny reakcyjnej do Real-Time PCR

Odczynnik	Objętość [μ l]
Gotowa mieszanina reakcyjna	10
Starter For 10 mM	1
Starter Rev 10 mM	1
Jalowa woda	6
Matryca DNA	2

4.3. Pan-dermatofitowy Real-Time PCR

W pan-dermatofitowym Real-Time PCR użyto starterów panDermFor i panDermRev, które wykrywają fragment DNA kodujący syntazę chitynową I. W pierwszym etapie został przeprowadzony wybór komercyjnie dostępnej mieszaniny reakcyjnej, która znalazła zastosowanie we wszystkich dalszych etapach pracy. Profil reakcyjny przedstawiony został w Tabeli 3, skład gotowej mieszaniny reakcyjnej w Tabeli 2 (rozdział Metody 4.2), a komercyjne mieszaniny które zostały przebadane oraz zastosowane startery wymienione zostały w rozdziale Materiały 3.2.3..

Tabela 3. Profil temperaturowo-czasowy reakcji Real-Time PCR zastosowany przy wyborze gotowej mieszaniny reakcyjnej

	temp [°C]	skok [°C/s]	czas trwania [s]	ilość cykli
inkubacja wstępna	95	5	300	1
3 stopniowa amplifikacja	denaturacja	95	10	40
	przyłączanie starterów	60	10	
	wydłużanie	72	15	
denaturacja ampikonów	95	5	15	
krzywa topnienia	60	4	20	1
	95	0.1	20	1
chłodzenie	40	5	300	1

Do dalszych etapów pracy została wybrana mieszanina Real-Time 2xPCR Master Mix SYBR® zestaw A (A&A Biotechnology). Następnie, dobrano temperaturę przyłączania starterów – przetestowano następujące temperatury: 55, 58, 60 oraz 62°C. Ponieważ, ze wzrostem temperatury nie obserwowano zwiększenia się specyficzności, wybrano temperaturę 55°C. Ze względu na brak powtarzalności wyników zwiększono czasy trwania 3 stopniowej amplifikacji o 5 sekund każdy, co wyeliminowało problemy z powtarzalnością reakcji. Wybrany profil temperaturowo-czasowy został przedstawiony w Tabeli 4. Temperatura topnienia powstałych ampikonów w zakresie temperatur od 87 do 92°C wskazywała na obecność DNA dermatofitów w badanej próbce.

Tabela 4. Profil temperaturowo-czasowy reakcji pan-dermatofitowego Real-Time PCR

	temp [°C]	skok [°C/s]	czas trwania [s]	ilość cykli
inkubacja wstępna	95	5	300	1
3 stopniowa amplifikacja	denaturacja	95	15	40
	przyłączanie starterów	55	15	
	wydłużanie	72	25	
denaturacja ampikonów	95	5	15	
krzywa topnienia	60	4	20	1
	95	0.1	20	1
chłodzenie	40	5	300	1

4.4. Genotypowanie

Do genotypowania zastosowano technikę RAPD, przetestowano 12 starterów, każdy w oddzielnej reakcji (Materiały 3.2.8). DNA zostało uzyskane w wyniku użycia szybkiej metody izolacji DNA (Brillowska-Dąbrowska *et al.*, 2007). Izolaty oraz ich pochodzenie opisano w Tabeli 1 (rozdział Materiały 3.1). Profil temperaturowo-czasowy, od którego rozpoczęto dobór najbardziej efektywnych parametrów przedstawiony jest w Tabeli 5, a mieszanina reakcyjna w Tabeli 6. Produkty reakcji były rozdzielane w 2% żelu agarozowym i wizualizowane w świetle UV.



Tabela 5. a) Profil temperaturowo-czasowy PCR zastosowany technice RAPD. b) Profil temperaturowo-czasowy PCR w technice RAPD zastosowany do genotypowania gatunku *E. floccosum* z użyciem startera RAPD1254

a)	temp [°C]	czas [s]	ilość cykli	b)	temp [°C]	czas [s]	ilość cykli
	95	300	1		95	300	1
	95	45	35		95	45	35
	37	60			40	60	
	72	90			72	90	
	72	600	1		72	600	1
	4	∞	1		4	∞	1

Tabela 6. Skład mieszaniny reakcyjnej stosowanej w technice RAPD z zastosowaniem gotowej mieszaniny

Odczynnik	Objętość [μl]
Gotowo mieszanina reakcyjna	10
Starter 10 mM	2
Jalowa woda	6
Matryca DNA	2

4.4.1. Genotypowanie *M. canis*

W celu zbadania różnorodności genetycznej gatunku *M. canis* zastosowano 12 różnych starterów (każdego oddzielnie): GACA 5' (Meyer *et al.*, 1999), OPE18 (Saran *et al.*, 2008), OPE03 (Saran *et al.*, 2008), OPZ10 (Rawashdeh i Amri, 2006), RAPD1254 (Johnson *et al.*, 2004), RAPD1247 (Johnson *et al.*, 2004), RAPD1281 (Johnson *et al.*, 2004), NS1 (Sivakumaran *et al.*, 2002), LR3R (Hoppe i Vilgalys, 1999), LR7 (Bunyard *et al.*, 1996), LR14 (Hopple i Vilgalys, 1999) oraz 4241R (Chantratita *et al.*, 2011). Profil temperaturowo-czasowy przedstawiono w Tabeli 5a (rozdział Metody 4.4).

4.4.2. Genotypowanie *E. floccosum*

W celu wyodrębnienia różnych genotypów *E. floccosum* zastosowano 3 różne startery: GACA (Meyer *et al.*, 1999), OPE18 (Saran *et al.*, 2008) oraz RAPD1254 (Johnson *et al.*, 2004). Profil temperaturowo-czasowy został przedstawiony w Tabeli 5a (rozdział Metody 4.4). Dla startera RAPD1254 zmieniono temperaturę przyłączenia startera 37 na 40°C, a pozostałe parametry reakcji pozostały bez zmian (Tabela 5b, Metody 4.4).

4.4.3. Genotypowanie *T. rubrum*

W celu wyodrębnienia różnych genotypów *T. rubrum* zastosowano oddzielnie 3 startery: GACA (Meyer *et al.*, 1999), RAPD1254 (Johnson *et al.*, 2004) oraz OPE18 (Saran *et al.*, 2008). Profil temperaturowo-czasowy został przedstawiony w Tabeli 5a (rozdział Metody 4.4).



4.4.4. Genotypowanie *T. mentagrophytes*

W celu wyodrębnienia różnych genotypów *T. mentagrophytes* zastosowano oddzielnie 2 startery: GACA (Meyer *et al.*, 1999) i RAPD1254 (Johnson *et al.*, 2004). Profil temperaturowo-czasowy został przedstawiony w Tabeli 5a (rozdział Metody 4.4).

4.5. Sekwencjonowanie

W celu potwierdzenia przynależności izolatów do gatunków *M. canis*, *T. rubrum* oraz *T. mentagrophytes* przeprowadzono reakcję PCR z zastosowaniem starterów ITS1 i ITS4 wybranych izolatów (sekwencje przedstawione w rozdziale Materiały 3.2.4), produkty zostały rozdzielone na 1% żelu agarozowym, wycięte, a DNA oczyszczone przy użyciu zestawu do izolacji DNA z żeli agarozowych. Sekwencjonowanie zostało przeprowadzone w firmie Genomed. Uzyskane rezultaty porównano z bazą danych zawierającą 125 sekwencji ITS1, 5.8 S, ITS2 gatunków dermatofitów stworzoną przeze mnie na podstawie danych dostępnych w bazie CBS KNAW z użyciem programu Vector NTI (Invitrogen).

4.6. *Trichophyton rubrum*-specyficzny Real-Time PCR

Celem molekularnym starterów wykorzystanych w *T. rubrum*-specyficznej Real-Time PCR: TRFor i TRFor był region ITS (Brillowska-Dąbrowska *et al.*, 2007). Ich sekwencje zostały przedstawione w rozdziale Materiały 3.2.5. Skład mieszaniny reakcyjnej został przedstawiony w Tabeli 2 (rozdział Metody 4.2). W wyniku doboru najbardziej efektywnych parametrów ustalono profil temperaturowo-czasowy zaprezentowany w Tabeli 7. Temperatura topnienia powstałych ampliconów w zakresie temperatur od 92 do 93°C wskazywała na obecność DNA *T. rubrum* w badanej próbce.

Tabela 7. Profil temperaturowo-czasowy reakcji *T. rubrum*-specyficznego Real-Time PCR

	temp [°C]	skok [°C/s]	czas trwania [s]	ilość cykli
inkubacja wstępna	95	5	300	1
3 stopniowa amplifikacja	denaturacja	95	15	40
	przyłączenie starterów	62	15	
	wydłużanie	72	25	
denaturacja ampliconów	95	5	15	1
krzywa topnienia	60	4	20	1
	95	0.1	20	1
chłodzenie	40	5	300	1

4.7. Identyfikacja izolatów gatunku *E. floccosum*

W celu opracowania sekwencji starterów, umożliwiających identyfikację gatunku *E. floccosum* porównano różne sekwencje DNA dermatofitów znajdujących się w bazie NCBI przy pomocy programu Vector NTI. Jako cel molekularny wybrano region ITS, a zaprojektowane startery zaprezentowano w rozdziale Materiały 3.2.6.. Fragment porównania sekwencji DNA reprezentatywnych szczepów gatunków dermatofitów zostało zaprezentowane poniżej.

(A)

```
E. floccosum AF168130 (204) TCGGGGGATGGAGAAGGATGCCCCGGCGGGGTTGATCGCTCCCCACCCCCTGGACAGCGCTCGCCGAAGG
E. floccosum EU200372 (160) TCGGGGGATGGAGAAGGATGCCCCGGCGGGGTTGATCGCTCCCCACCCCCTGGACAGCGCTCGCCGAAGG
N. gypsea A. gypseum AF168128 (184) CCGGGG-----ACAA TCAA-----CTCCC-----TGGATCGCGCCCGCCGAGG
M. audouinii FJ479793 (183) CTGAGGG--GGACTTTTGTTTCC-----TAGGCCACGCCCC-----GGG-CAGCGCTCGCCGAGG
M. canis AF168127 (227) CTGAGGG--GGACTCTTGTTTCC-----TAGGCCACGCCCC-----GGG-CAGCGCTCGCCGAGG
M. ferrugineum AJ252335 (226) CTGAGGG--GGACTCTTGTTTCC-----TAGGCCACGCCCC-----GGG-CAGCGCTCGCCGAGG
A. insingulare AJ877211 (172) CCTTGG---ACCAGTGTCCCC-----GTGGCC-----TGGCAGCGCA CGCCGACGG
T. rubrum FJ356084 (155) CCGGCGG---GCCCC--TTCTGG-----GAGCCTCGA-----GCCGGACCGCGCCCGCCGAGG
T. violaceum EU181450 (177) CCGGCGG---GCCCC--TTCTGG-----GGGCCTCGA-----GCCGGACCGCGCCCGCCGAGG
T. verrucosum AF168126 (193) CCGGCGA---GCCTC--TTCTG-----GGGGCTTTA-----GCTGGATCGCGCCCGCCGAGG
T. mentagrophytes Z98000 (195) TCGGCGA---GCCTCTCTTTA-----GTGGCTAAC-----GCTGGACCGCGCCCGCCGAGG
T. schoenleinii AJ853757 (151) TCGGCGA---GCCTCTCTTTA-----GTGGCTAAC-----GCTGGACCGCGCCCGCCGAGG
T. interdigitale AB193720 (171) TCGGCGA---GCCTCTCTTTA-----GTGGCTAAC-----GCTGGACCGCGCCCGCCGAGG
T. interdigitale AF170461 (305) TCGGCGA---GCCTCTCTTTA-----GTGGCTAAC-----GCTGGACCGCGCCCGCCGAGG
T. tonsurans AB094062 (161) TCGGCGA---GCCTCTCTTTAATA-----GGGCCTAAC-----GCTGGACCGCGCCCGCCGAGG
Consensus (351) CCGGCG GCCTCT TTT G GGCTC AC GCTGGACCGCGCCCGCCGAGG
421 490

E. floccosum AF168130 (274) AGTGATTCTCAGAAATTCTACGAAATCTCCATAGGTGGTTCAGTCTGAGCGTT-GGCAAGCAAAAACAG
E. floccosum EU200372 (230) AGTGATTCTCAGAAATTCTACGAAATCTCCATAGGTGGTTCAGTCTGAGCGTT-GGCAAGCAAAAACAG
N. gypsea A. gypseum AF168128 (223) AGTGATT-----AAAATCCATGAA---TACT--G---TCCGTCTGAGCGTT-AGCAAGTAAAAATC-AG
M. audouinii FJ479793 (236) ATT-ACTCTG-GAAA----ACACACTCTTGAAAGAACATACCCTGTGAGCG---AGCAACGCAAAATC-AG
M. canis AF168127 (280) ATT-ACTCTG-GAAA----ACACACTCTTGAAAGAACATACCCTGTGAGCG---AGCAACGCAAAATC-AG
M. ferrugineum AJ252335 (279) ATT-ACTCTG-GAAA----ACACACTCTTGAAAGAACATACCCTGTGAGCG---AGCAACGCAAAATC-AG
A. insingulare AJ877211 (218) ACAGTCT-----TAA-----AACTTTACATATC-GCCGTCTGAGCGT--ATAAGCAAAA--TCAG
T. rubrum FJ356084 (204) ACAGACACCAAGGAAA---AA-TTCTCT--GAAGAGCTGTGAGTCTGAGCGTTAGCAAGCACAA--TCAG
T. violaceum EU181450 (226) ACAGACACCAAGGAAA---AA-TTCTCT--GAAGAGCTGTGAGTCTGAGCGTTAGCAAGCACAA--TCAG
T. verrucosum AF168126 (240) ACAGACATCAAAAAA-----TCTT--GAAGAGCTGTGAGTCTGAGCGTT-AGCAAGCAAAA--TCAG
T. mentagrophytes Z98000 (245) ACAGACGCAAAAAAT-----TCTTTCA GAAGAGCTGTGAGTCTGAGCGTT-AG-AAGCAAAAATCAG
T. schoenleinii AJ853757 (201) ACAGACGCAAAAAAT-----TCTTTCA GAAGAGCTGTGAGTCTGAGCGTT-AGCAAGCAAAAATCAG
T. interdigitale AB193720 (221) ACAGACGCAAAAAAT-----TCTTTCA GAAGAGCTGTGAGTCTGAGCGTT-AGCAAGCAAAAATCAG
T. interdigitale AF170461 (355) ACAGACGCAAAAAAT-----TCTTTCA GAAGAGCTGTGAGTCTGAGCGTT-AGCAAGCAAAAATCAG
T. tonsurans AB094062 (213) ACAGACGCAAAAAAT-----AAATCTTTCA GAAGAGCTGTGAGTCTGAGCGTT-AGCAAGCAAAAATCAG
Consensus (421) ACAGAC C AA AAA A TCTCT GAAGAGCTGTGAGTCTGAGCGTT AGCAAGCAAAA TCAG
491 560
```



(B)

E. floccosum AF168130	(552)	TGCAT	CCCC	CGT	TCC	ACCG	GGAG	AG	GAGAAAGGTGGAG	GGGAC	GCGCCC	GAAAAGCAGT	GGCCAGGCCGC	
E. floccosum EU200372	(508)	TGCAT	CCCC	CGT	TCC	ACCG	GGAG	AG	GAGAAAGGTGGAG	GGGAC	GCGCCC	GAAAAGCAGT	GGCCAGGCCGC	
N. gypsea A. gypseum AF168128	(483)	-----	CCC	---	TA	TCCAGGGGAG	---	---	---	GGGAC	GCGCCC	GAAAAGCAGT	GGCCAGGCCGC	
M. audouinii FJ479793	(503)	AATAA	CCACC	-ACC	GCT	TAG	GGGG	GTGGGAGGGAG	-G	GGGAC	GCGCCC	GAAAAGCAGT	GGT	CAGGCCGC
M. canis AF168127	(549)	AGTAAC	CAACC	-ACC	GCT	TAG	GGGG	GTGGGAGGGAG	-G	GGGAC	GCGCCC	GAAAAGCAGT	GGT	CAGGCCGC
M. ferrugineum AJ252335	(548)	AACAAC	CAACC	-ACC	GCT	TAG	GGGG	GTGGGAGGGAG	-G	GGGAC	GCGCCC	GAAAAGCAGT	GGT	CAGGCCGC
A. insingulare AJ877211	(478)	GGGCGGGAC	GCG	TCC	GAAAA	G	CAGTGGCTAGGCCCGCGACTTCG	GCGCCT	GAGCGAATGGG	GATTTCCAGCG				
T. rubrum FJ356084	(470)	-----	CCC	---	TCC	CTT	CGGGG	-GC	-----	GGGAC	GCGCCC	GAAAAGCAGT	GGCCAGGCCGC	
T. violaceum EU181450	(492)	-----	CCC	---	TCC	CTT	CGGGG	-GC	-----	GGGAC	GCGCCC	GAAAAGCAGT	GGCCAGGCCGC	
T. verrucosum AF168126	(500)	-----	CCC	---	CT	TTT	CGGGG	-GC	-----	GGGAC	GCGCCC	GAAAAGCAGT	GGCCAGGCCGC	
T. mentagrophytes Z98000	(509)	-----	CCCC	---	TTT	CTCG	GGGGTGC	---	-----	GGGAC	GCGCCC	GAAAAGCAGT	GGCCAGGCCGC	
T. schoenleinii AJ853757	(466)	-----	CCCC	---	TTT	CTCG	GGGGTGC	---	-----	GGGAC	GCGCCC	GAAAAGCAGT	GGCCAGGCCGC	
T. interdigitale AB193720	(487)	-----	CCCC	---	GT	TTT	GGGGTGC	---	-----	GGGAC	GCGCCC	GAAAAGCAGT	GGCCAGGCCGC	
T. interdigitale AF170461	(621)	-----	CCCC	---	GT	TTT	GGGGTGC	---	-----	GGGAC	GCGCCC	GAAAAGCAGT	GGCCAGGCCGC	
T. tonsurans A. equinum AB094062	(483)	-----	CCCC	---	GT	TCT	GGGGTGC	---	-----	GGGAC	GCGCCC	GAAAAGCAGT	GGCCAGGCCGC	
Consensus	(701)		CCCC		TCC		T	GGGG	GC		GGGAC	GCGCCC	GAAAAGCAGT	GGCCAGGCCGC

771 840

Rys 20. Porównanie sekwencji regionu ITS różnych gatunków dermatofitów. Pogrubieniem zaznaczono obszar, w którym znajduje się sekwencja startera (A) EFFor (B) EFRev.



W poprzednich podrozdziałach (Metody 4.3, Metody 4.6), w których opisywane były protokoły oparte na reakcji Real-Time PCR nie opracowywano układu wykorzystującego klasyczną metody PCR do wykrywania dermatofitów (rozdział Metody 4.3) oraz do wykrywania gatunku *T. rubrum* (rozdział Metody 4.6) ponieważ wykorzystano testy opracowane przez Brillowska-Dąbrowska, *et al.*, (Brillowska-Dąbrowska, *et al.*, 2007). Natomiast, w przypadku identyfikacji *E. floccosum* układy takie nie zostały opisane ani przy zastosowaniu Real-Time PCR, ani PCR, a specyficzne startery stosowane w obu protokołach zostały opracowane w ramach doktoratu.

4.7.1. Gatunkowo-specyficzny PCR

Skład mieszaniny reakcyjnej został przedstawiony w Tabeli 2 (rozdział Metody 4.2). W celu dobrania najbardziej efektywnych parametrów reakcji sprawdzono następujące temperatury przyłączania starterów: 58, 60, 62°C. Wraz ze wzrostem temperatury nie zaobserwowano wyższej specyficzności, dlatego wybrano temperaturę 58°C. Ustalony profil temperaturowo-czasowy został przedstawiony w Tabeli 8 (rozdział Metody 4.7.1). Produkty reakcji rozdzielano w 1,5% żelu agarozowym, wielkość specyficznego produktu wynosiła 318 pz.

Tabela 8. Profil temperaturowo-czasowy zastosowany w *E. floccosum*-specyficznym PCR

temp [°C]	czas [s]	ilość cykli
94	300	1
94	30	45
58	30	
72	30	
72	300	1
4	∞	1

4.7.2. Gatunkowo-specyficzny Real-Time PCR

W celu dobrania najbardziej efektywnych parametrów reakcji Real-Time PCR przeprowadzono reakcje z zastosowaniem różnych temperatur przyłączania starterów. Sprawdzono temperatury 58, 60 oraz 62°C. Ze wzrostem temperatury nie zaobserwowano wzrostu specyficzności, dlatego też wybrano temperaturę 58°C. Profil temperaturowo-czasowy przedstawiony został w Tabeli 9. Skład mieszaniny reakcyjnej został przedstawiony w Tabeli 2 (rozdział Metody 4.2). Temperatura topnienia powstałych amplikonów w zakresie temperatur od 88,9 do 89,5°C wskazywała na obecność DNA *E. floccosum* w badanej próbce.



Tabela 9. Profil temperaturowo-czasowy reakcji *E. floccosum*-specyficznego Real-Time PCR

	temp [°C]	skok [°C/s]	czas trwania [s]	ilość cykli
inkubacja wstępna	95	5	300	1
3 stopniowa amplifikacja	denaturacja	95	15	40
	przyłączenie starterów	58	15	
	wydłużanie	72	25	
denaturacja ampliconów	95	5	15	1
krzywa topnienia	60	4	20	1
	95	0.1	20	1
chłodzenie	40	5	300	1

4.8. Identyfikacja gatunków należących do kompleksu *Arthroderma otae*

W celu opracowania sekwencji starterów, umożliwiających identyfikację gatunków należących do kompleksu *A. otae*, poddano analizie dostępne w bazie NCBI sekwencje różnych genów dermatofitów z wykorzystaniem programu Vector NTI. Analiza ta pozwoliła wytypować gen β -tubuliny jako cel molekularny. Dalsza analiza, której fragment przedstawiono na Rys. 21 umożliwiła opracowanie starterów służących do identyfikacji gatunkowej *M. canis* oraz identyfikacji *M. audouinii*/*M. ferrugineum*, których sekwencje przedstawiono w rozdziale Materiały 3.2.7..

(A)

Microsporium canis JF731101.1 Arthroderma otae	(123)	GCGG	GAAAAA	ACGAGCGTCGAGTTTCATAA	--	CCCCAATGTA	GAGCTTCCAGCATCA	AACTAACGTTA
Microsporium audouinii JF731113.1	(123)	GCGG	GAAAAA	ACGAGCGTCGAGTTTCATAA	--	TCTCAATGTA	GAGCTTCCAGCATCA	AGCTAACGTTA
Microsporium ferrugineum JF731107.1	(122)	GCGG	GAAAAA	ACGAGCGTCGAGTTTCATAA	-	CTC-AATGTA	GAGCTTCCAGCATCA	AGCTAACGTTA
Microsporium gypseum JF731093.1	(136)	GCGT	GAAAGG	GACGGCACGAAAGTTTCA	CAATTCCGCATAGAGAGCTTCGAGTATCAGGCTAACGTTT			
Epidermophyton floccosum JF731122.1	(135)	GCGT	GAAAGG	ACGGCTTCTAGTTTCA	CAATTCTCGCATAGAGAACTTCGAGCATCAGGCTAACGTTA			
Trichophyton rubrum JF731063.1	(137)	GCGT	GAAAGG	AACAGGCTTCGAGTTTCA	CAATTCTCGCATAGCGAGCTTCGAGTATCAGGCTAACGTTA			
Trichophyton schoeleinii JF731082.1	(141)	GCGT	GAAAGG	AACAGGCTTCGAGTTTCA	CAATTCTCGCATAGCGAGCTTCGAGCATCAGGCTAACGTTA			
Trichophyton equinum								
Trichophyton interdigitale JF731076.1	(138)	GCGT	GAAAGG	GACAGGCTTCGAGTTTCA	CAATTCTCGCATACGAGCTTCGAGCATCAGGCTAACGTTA			
Trichophyton mentagrophytes JF731084.1	(135)	GCGT	GAAAGG	GACAGGCTTCGAGTTTCA	CAATTCTCGCATAGCGAGCTTCGAGCATCAGGCTAACGTTA			
Trichophyton tonsurans JF731069.1	(135)	GCGT	GAAAGG	GACAGGCTTCGAGTTTCA	CAATTCTCGCATAGCGAGCTTCGAGCATCAGGCTAACGTTA			
Trichophyton verrucosum KJ606181.1	(115)	GCGT	GAAAGG	AACAGGCTTCGAGTTTCA	CAATTCTCGCATAGCGAGCTTCGAGTTCAGGCTAACGTTA			
Trichophyton violaceum JF731090	(137)	GCGT	GAAAGG	AACAGGCTTCGAGTTTCA	CAATTCTCATAGCGAGCTTCGAGTTCAGGCTAACGTTA			
Consensus	(141)	GCGT	GAAAGG	AACAGGCTTCGAGTTTCA	CAATTCTCGCATAGCGAGCTTCGAGCATCAGGCTAACGTTA			

(B)

Microsporium canis JF731101.1 Arthroderma otae	(524)	GCATGAAC	GTCTACTTCAACGAGGT	TGGCAC	AACCAAAGCCCTT	-	CTCTTCAGCAGAACTACTA	ACTCATT
Microsporium audouinii JF731113.1	(524)	GCATGAAC	GTCTACTTCAACGAGGT	TGGCAC	AACCAAAGCCCTT	CTCTTCAGCAGAACTACTA	ACTCATT	
Microsporium ferrugineum JF731107.1	(523)	GCATGAAC	GTCTACTTCAACGAGGT	TGGCAC	AACCAAAGCCCTT	CTCTTCAGCAGAACTACTA	ACTCATT	
Microsporium gypseum JF731093.1	(552)	GTATGAAC	GTCTACTTCAACGAGGT	TGCAC	GACCAAGACCCTT	-	TCCTTCAGCAGCATACTA	ACTCATT
Epidermophyton floccosum JF731122.1	(543)	GCATGAAC	GTCTACTTCAACGAGGT	TGCAC	TACCAAGACCCTT	-	CCCTTCAGCAGCATACTA	ACTCATT
Trichophyton rubrum JF731063.1	(548)	GCATGAAT	GTCTACTTCAACGAGGT	TGCAC	GACCAAGACCCTT	-	CCCTTCAGCAGCATACTA	ACTCATT
Trichophyton schoeleinii JF731082.1	(552)	GCATGAAT	GTCTACTTCAACGAGGT	TGCAC	GACCAAGACCCTT	-	CCCTTCAGCAGCATACTA	ACTCATT
Trichophyton equinum	(544)							
Trichophyton interdigitale JF731076.1	(547)	GCATGAAT	GTCTACTTCAACGAGGT	TGCAC	GACCAAGACCCTT	-	CCCTTCAGCAGCATACTA	ACTCATT
Trichophyton mentagrophytes JF731084.1	(544)	GCATGAAT	GTCTACTTCAACGAGGT	TGCAC	GACCAAGACCCTT	-	CCCTTCAGCAGCATACTA	ACTCATT
Trichophyton tonsurans JF731069.1	(544)	GCATGAAT	GTCTACTTCAACGAGGT	TGCAC	GACCAAGACCCTT	-	CCCTTCAGCAGCATACTA	ACTCATT
Trichophyton verrucosum KJ606181.1	(529)	GCATGAAT	GTCTACTTCAACGAGGT	TGCAC	GACCAAGACCCTT	-	CCCTTCAGCAGCATACTA	ACTCATT
Trichophyton violaceum JF731090	(548)	GCATGAAT	GTCTACTTCAACGAGGT	TGCAC	GACCAAGACCCTT	-	CCCTTCAGCAGCATACTA	ACTCATT
Consensus	(561)	GCATGAAT	GTCTACTTCAACGAGGT	TGCAC	GACCAAGACCCTT	-	CCCTTCAGCAGCATACTA	ACTCATT

Rys 21. Porównanie sekwencji regionu β-tubuliny różnych gatunków dermatofitów. Pogrubieniem zaznaczono obszar, w którym znajduje się sekwencja startera (A) MCFor i MATubFor, (B) MCREv i MARev.

4.8.1. Gatunkowo-specyficzny PCR

Skład mieszaniny reakcyjnej został przedstawiony w Tabeli 2 (rozdział Metody 4.2). Zastosowanie w reakcji PCR starterów MATubFor oraz MAREv (rozdział Materiały 3.2.7.) pozwoliło na specyficzną amplifikację DNA *M. audouinii*/*M. ferrugineum*, a zastosowanie w reakcji PCR starterów MCFor oraz MCREv (rozdział Materiały 3.2.7.) pozwoliło na specyficzną amplifikację DNA *M. canis*. Profil wyjściowy, od którego rozpoczęto dobór najbardziej efektywnych parametrów obu reakcji przedstawiono w Tabeli 10.

Tabela 10. Profil temperaturowo-czasowy zastosowany jako wyjściowy w optymalizacji *M. audouinii*/*M. ferrugineum*-specyficznego oraz *M. canis*-specyficznego PCR

temp [°C]	czas [s]	ilość cykli
94	300	1
94	30	40
60	30	
72	30	
72	300	1
4	∞	1

W celu dobrania najbardziej efektywnych parametrów reakcji PCR, dla *M. audouinii*/*M. ferrugineum*-specyficznego PCR sprawdzono następujące temperatury przyłączenia starterów: 60, 62, 64, 66 oraz 68°C. Najwyższą specyficzność uzyskano w temperaturze 66°C i tę temperaturę wybrano. Profil temperaturowo-czasowy ustalonego *M. audouinii*/*M. ferrugineum*-specyficznego PCR przedstawiono w Tabeli 11.

Tabela 11. Profil temperaturowo-czasowy zastosowany w *M. audouinii*/*M. ferrugineum*-specyficznym PCR

temp [°C]	czas [s]	ilość cykli
94	300	1
94	30	40
66	30	
72	30	
72	300	1
4	∞	1

W celu dobrania najbardziej efektywnych parametrów reakcji PCR, dla *M. canis*-specyficznego PCR sprawdzono następujące temperatury przyłączenia starterów: 60, 62, 64, 66 oraz 68°C. Otrzymane wyniki nie były zadowalające, dlatego też zmniejszono ilość cykli reakcji do 35 i sprawdzono temperatury przyłączenia starterów 66 oraz 68°C. Najlepsze wyniki uzyskano w temperaturze 66°C i tę temperaturę wybrano. Wybrany profil temperaturowo-czasowy *M. canis*-specyficznego PCR przedstawiono w Tabeli 12 (rozdział Metody 4.8.1).



Tabela 12. Profil temperaturowo-czasowy zastosowany w *M. canis*-specyficznym PCR

temp [°C]	czas [s]	ilość cykli
94	300	1
94	30	35
66	30	
72	30	
72	300	1
4	∞	1

Produkty powyższych reakcji rozdzielano w 1,5% żelu agarozowym. W przypadku *M. audouinii*/*M. ferrugineum*-specyficznego PCR wielkość produktu wynosi 456 pz, natomiast w przypadku *M. canis*-specyficznego PCR wielkość produktu wynosi 455 pz. Reakcja nie może być prowadzona w jednej mieszaninie reakcyjnej ze względu na małą różnicę w wielkości produktów reakcji.

4.8.2. Gatunkowo-specyficzny Real-Time PCR

W *M. audouinii*/*M. ferrugineum*-specyficznym PCR zastosowano startery z MAFor oraz MAREv (rozdział Materiały 3.2.7.) a w *M. canis*-specyficznym PCR startery MCFFor oraz MCRev (rozdział Materiały 3.2.7.). Profil temperaturowo-czasowy, od którego rozpoczęto dobór najbardziej efektywnych parametrów obu reakcji przedstawiono w Tabeli 13, a skład mieszaniny reakcyjnej przedstawiono w Tabeli 2 (rozdział Metody 4.2).

Tabela 13. Profil temperaturowo-czasowy od którego rozpoczynano dobór najbardziej efektywnych parametrów reakcji *M. audouinii*-specyficznego oraz *M. canis*-specyficznego Real-Time PCR

	temp [°C]	skok [°C/s]	czas trwania [s]	ilość cykli
inkubacja wstępna	95	5	300	1
3 stopniowa amplifikacja	denaturacja	95	15	40
	przyłączanie starterów	56	15	
	wydłużanie	72	25	
denaturacja amplikonów	95	5	15	1
krzywa topnienia	60	4	20	1
	95	0.1	20	1
chłodzenie	40	5	300	1

W przypadku *M. audouinii*/*M. ferrugineum*-specyficznego Real-Time PCR dobór najbardziej efektywnych parametrów temperatury przyłączania starterów rozpoczęto od temperatury 56°C, nie zaobserwowano jednak specyficzných produktów reakcji, dlatego też zwiększano temperaturę o 2°C. Równolegle przeprowadzono reakcje z zastosowaniem krótszych czasów 3 stopniowej amplifikacji, które wynosiły dla denaturacji 10 s, przyłączania starterów - 10 s oraz dla wydłużania 15 s. Jako temperaturę przyłączania starterów wybrano temperaturę 68°C, a profil temperaturowo-czasowy z krótszymi czasami 3 stopniowej amplifikacji. Temperatura topnienia powstałych amplikonów

w zakresie temperatur od 86,5 do 87°C wskazywała na obecność DNA *M. audouinii*/*M. ferrugineum* w badanej próbce.

W przypadku *M. canis*-specyficznego Real-Time PCR dobór najbardziej optymalnej temperatury przyłączania starterów rozpoczęto od temperatury 56°C, jednakże zaobserwowano powstałe amplikony, których temperatura topnienia wynosiła pomiędzy 86 a 87°C dla reakcji z zastosowaniem matryc zawierających DNA *M. canis*, *M. audouinii* oraz *E. floccosum*. W celu zwiększenia specyficzności reakcji, zwiększano temperaturę przyłączania starterów o 2°C. Równolegle przeprowadzano reakcje z zastosowaniem krótszych czasów 3 stopniowej amplifikacji, które wynosiły dla denaturacji 10 s, przyłączania starterów 10 s oraz wydłużanie 15 s. Jako temperaturę przyłączania starterów wybrano temperaturę 68°C, a profil temperaturowo czasowo z krótszymi czasami 3 stopniowej amplifikacji. Temperatura topnienia powstałych amplikonów w zakresie temperatur od 86,5 do 87°C wskazywała na obecność DNA *M. canis* w badanej próbce.

Dla obu układów ustalono wspólny profil temperaturowo-czasowy (Tabela 14), jednakże ze względu na to, iż powstałe amplikony cechuje ta sama temperatura topnienia, reakcja nie może być wykonywana w jednej próbce.

Tabela 14. Profil temperaturowo-czasowy reakcji *M. audouinii*-specyficznego oraz *M. canis*-specyficznego Real-Time PCR

	temp [°C]	skok [°C/s]	czas trwania [s]	ilość cykli
inkubacja wstępna	95	5	300	1
3 stopniowa amplifikacja	denaturacja	95	10	40
	przyłączanie starterów	68	10	
	wydłużanie	72	15	
denaturacja amplikonów	95	5	15	1
krzywa topnienia	60	4	20	1
	95	0.1	20	1
chłodzenie	40	5	300	1

4.9. Identyfikacja gatunków należących do kompleksu *T. mentagrophytes*

W celu opracowania starterów, umożliwiających identyfikację gatunków należących do kompleksu *T. mentagrophytes*, poddano analizie dostępne w bazie NCBI sekwencje różnych genów dermatofitów z wykorzystaniem programu Vector NTI. Analiza ta pozwoliła wytypować obszar ITS jako cel molekularny. Dalsza analiza, której fragment przedstawiono na Rys. 22 umożliwiła opracowanie starterów służących do identyfikacji kompleksu, których sekwencje przedstawiono w rozdziale Materiały 3.2.9.



(A)

```
T. interdigitale AB193720 (7) GGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAAACGCGCAGGCCG--GAGGCTGGCCCCCA-----CG
T. mentagrophytes Z98000 (29) GGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAAACGCGCAGGCCG--GAGGCTGGCCCCCA-----CG
  T. rubrum FJ356084 (1) -----GATCATTAAACGCGCAGGCCG--GAGGCTGGCCCCCA-----CG
  T. violaceum EU181450 (7) GGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAAACGCGCAGGCCG--GAGGCTGGCCCCCA-----CG
  T. verrucosum AF168126 (29) GGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAAACGCGCAGGCCG--GAGGCTGGCCCCCA-----CG
  T. schoenleinii AJ853757 (1) -----GATCATTAAACGCGCAGGCCG--GAGGCTGGCCCCCA-----CG
A. insingulare A. lenticulare AJ877211 (11) CGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAAACGCGCAGGCCG--GAGGCTGGCCCCCA-----CG
  T. tonsurans A. equinum AB094062 (1) -----AACCTGCGGAAGGATCATTAAACGCGCAGGCCG--GAGGCTGGCCCCCA-----CG
  M. audouinii FJ479793 (1) -----GATCATTAAACGCGCAGGCCG--GAGGCTGGCCCCCA-----CG
  M. canis AF168127 (29) GGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAAACGCGCAGGCCG--GAGGCTGGCCCCCA-----CG
  M. ferrugineum AJ252335 (29) GGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAAACGCGCAGGCCG--GAGGCTGGCCCCCA-----CG
  E. floccosum AF168130 (29) GGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAAACGCGCAGGCCG--GAGGCTGGCCCCCA-----CG
  Consensus (141) GGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAAACGCGCAGGCCG GAGGCTGGCCCCCA CG
  211 280
T. interdigitale AF170461 (194) ATAGGGCCAAACGT--CCGTCAGGGGTGAGC--AGATGTGC--GCCGGCCGTACCGCCCATTCTTGCTACCA
T. interdigitale AB193720 (60) ATAGGGCCAAACGT--CCGTCAGGGGTGAGC--AGATGTGC--GCCGGCCGTACCGCCCATTCTTGCTACC
T. mentagrophytes Z98000 (82) ATAGGGCCAAACGT--CCATCAGGGGTGAGC--AGATGTGC--GCCGGCCGTACCGCCCATTCTTGCTACC
  T. rubrum FJ356084 (38) ATAGGGACCGACGTTCCATCAGGGGTGAGC--AGACGTGC--GCCGGCCGTACGCCCCATTCTTGCTACC
  T. violaceum EU181450 (60) ATAGGGACCGACGTTCCATCAGGGGTGAGC--AGACGTGC--GCCGGCCGTACGCCCCATTCTTGCTACC
  T. verrucosum AF168126 (82) ATAGGGATCAGCGTTCCATCAGGGGTGAGC--AGATGTGC--GCCGGCCGTACGCCCCATTCTTGCTACC
  T. schoenleinii AJ853757 (38) ATAGGGCCAAACGT--CCATCAGGGGTGAGC--AGATGTGC--GCCGGCCGTACCGCCCATTCTTGCTACC
A. insingulare A. lenticulare AJ877211 (61) CCCCAGCTTGAGATATA--CCTGCACGCTGC--TCGAGGTG--GCCGGCCGTAC--CCCATTCTTGCTAC--
  T. tonsurans A. equinum AB094062 (50) ATAGGGCCAAACGT--CCGTCAGGGGTGAGC--AGATGTGC--GCCGGCCGTACCGCCCATTCTTGCTACC
  M. audouinii FJ479793 (55) CCCGGGCTCCCGGGAGGTTCCGGGCGCGAGGGGTGCTCCGGGCGCACG--CCCATTCTTGCTAC--
  M. canis AF168127 (99) CCCGGGCTCCCGGGAGGTTCCGGGCGCGAGGGGTGCTCCGGGCGCACG--CCCATTCTTGCTAC--
  M. ferrugineum AJ252335 (99) CCCGGGCTCCCGGGAGGTTCCGGGCGCGAGGGGTGCTCCGGGCGCACG--CCCATTCTTGCTAC--
  E. floccosum AF168130 (80) CCTTCTCTCTGAA--C--CTGCACGCTG-----TC--GCCGGCCGTACG--CCCATTCTTGCTACA
  Consensus (211) ATAGGGCC ACGT CCGTCAGGGGTGAGC AGA GTGC GCCGGCCGTAC CCCATTCTTGCTACC
  281 350
```



4.9.1. Gatunkowo-specyficzny PCR

Skład mieszaniny reakcyjnej został przedstawiony w Tabeli 2 (rozdział Metody 4.2). W celu dobrania najbardziej efektywnych parametrów reakcji sprawdzono następujące temperatury przyłączenia starterów: 56, 58, 60, 62°C. Ponieważ oczekiwany produkt reakcji wynosił 175 pz, czas poszczególnych cykli reakcji PCR wynosił 20 s. Profil temperaturowo-czasowy, od którego rozpoczęto optymalizację został przedstawiony w Tabeli 15.

Tabela 15. Profil temperaturowo-czasowy reakcji PCR od której rozpoczęto optymalizację identyfikacji kompleksu *T. mentagrophytes*

temp [°C]	czas [s]	ilość cykli
95	300	1
95	20	30
56	20	
72	20	
72	600	1
4	∞	1

Przy zastosowaniu temperatur 56 oraz 58°C obserwowano produkty niespecyficzne, podwyższenie temperatury przyłączenia starterów do 60°C wyeliminowało ten problem, dlatego też jako temperaturę przyłączenia starterów wybrano najniższą temperaturę, w której uzyskiwano jedynie produkty specyficzne. Produkty reakcji rozdzielano w 1,5% żelu agarozowym, wielkość specyficznego produktu wynosiła 175 pz.

Tabela 16. Profil temperaturowo-czasowy reakcji PCR zastosowany w identyfikacji kompleksu *T. mentagrophytes*

temp [°C]	czas [s]	ilość cykli
95	300	1
95	20	30
60	20	
72	20	
72	600	1
4	∞	1

4.9.2. Gatunkowo-specyficzny Real-Time PCR

W celu dobrania najbardziej efektywnych parametrów reakcji Real-Time PCR przeprowadzono reakcje z zastosowaniem różnych temperatur przyłączenia starterów. Sprawdzono temperatury 60, 62, 64 oraz 68°C. Przy zastosowaniu każdej z nich obserwowano produkty niespecyficzne. Zastosowano metodę, która uwzględniała dwustopniową amplifikację, a jej profil został przedstawiony w Tabeli 17. Przy zastosowaniu tego profilu temperaturowo-czasowego uzyskano jedynie produkty specyficzne. Skład mieszaniny reakcyjnej został przedstawiony w Tabeli 2 (rozdział Metody 4.2). Temperatura topnienia powstałych amplikonów w zakresie temperatur od 90,5 do 91,5°C wskazywała na obecność DNA gatunków należących do kompleksu *T. mentagrophytes* w badanej próbce.



Tabela 17. Profil temperaturowo-czasowy reakcji *E. floccosum*-specyficznego Real-Time PCR

	temp [°C]	skok [°C/s]	czas trwania [s]	ilość cykli
inkubacja wstępna	95	5	300	1
2 stopniowa amplifikacja	denaturacja	95	10	40
	przyłączanie starterów oraz wydłużanie	72	30	
denaturacja ampliconów	95	5	15	1
krzywa topnienia	60	4	20	1
	95	0.1	20	1
chłodzenie	40	5	300	1

4.10. Nowa metoda izolacji DNA

4.10.1. Dobór najbardziej efektywnych parametrów przygotowania DNA przeprowadzanych nową metodą

W celu doboru najbardziej efektywnych parametrów „izolacji” DNA przygotowano dwa buforę ekstrakcyjne (60 mM NaHCO₃, 250 mM KCl and 50 mM Tris, pH 9,5) z różnym stężeniem proteiny K (20 mg/ml) - 10% oraz 20%. Następnie do próbek typu Eppendorf zawierających fragment grzybni dodawano po 200 µl wcześniej przygotowanego buforu. Po tym etapie następowała inkubacja próbek. Część próbek była inkubowana przez 10 min w temperaturze pokojowej oraz następnie 10 min w temperaturze 95°C, pozostała część próbek była inkubowana jedynie przez 10 min w 56°C. Po zakończonej inkubacji próbki mieszano za pomocą wortexu 5 sekund. Tak „wyekstrahowane” DNA było gotowe do analizy i przechowywane w 4°C. Równolegle przeprowadzono izolację DNA metodą opisaną w Rozdziale 4.1. W celu wybrania optymalnych warunków do izolacji DNA przeprowadzono pan-dermatofitowy PCR (Brillowska-Dąbrowska, *et al.*, 2007) oraz Real-Time PCR zgodnie z protokołem opisanym w Rozdziale 4.3.

4.10.2. Pan-dermatofitowy PCR oraz Real-Time PCR

Przeprowadzono pan-dermatofitowy PCR oraz Real-Time PCR z zastosowaniem DNA wyekstrahowanym nową metodą oraz szybką metodą opracowaną przez Brillowska-Dąbrowska *et al.*, 2007 (rozdział Metody 4.3).

4.10.3. Sprawdzenie stabilności DNA

W celu sprawdzenia stabilności przygotowano DNA

- nową metodą tj. metodą opracowaną w tej pracy,
- metodą opublikowaną przez Brillowska-Dąbrowska *et al.*, 2007.



Mieszanki były przechowywane w 4°C. Kolejne reakcje PCR oraz Real-Time PCR zostały przeprowadzone po 28 dniach, oraz po 3 i 6 miesiącach.

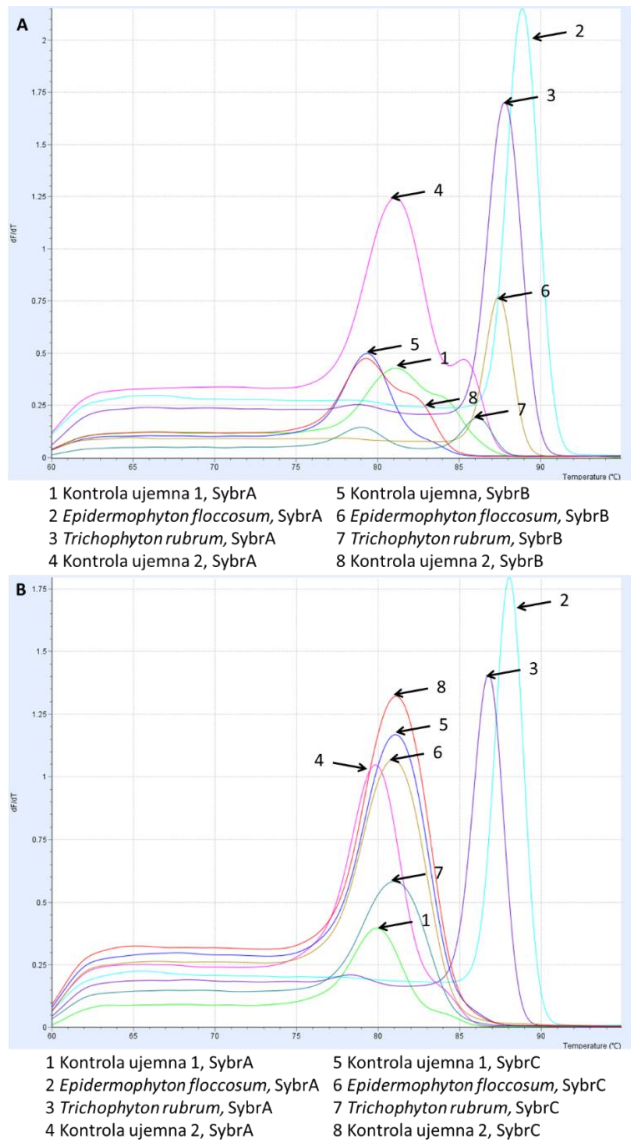
5. Wyniki i wnioski

5.1. Szybka metoda izolacji DNA

Jednym z najważniejszych etapów diagnostyki molekularnej jest uzyskanie DNA patogenów odpowiedzialnych za infekcje. Niestety, jest to etap limitujący diagnostykę molekularną grzybów, ponieważ izolacja DNA jest nie tylko czasochłonna, ale i kosztowna. Zespół Brillowskiej-Dąbrowskiej (Brillowska-Dąbrowska *et al.*, 2007) opracował szybką metodę izolacji DNA, która umożliwia uzyskanie DNA zaledwie w dwóch etapach, zarówno z grzybni, jak i próbek klinicznych, które może być wykorzystane w klastycznej reakcji PCR. Jednakże to czy tak uzyskane DNA, które wciąż znajduje się w lizacie komórkowym, może być wykorzystane w technice Real-Time PCR nie było do tej pory sprawdzone (Kobylak *et al.*, 2014). Reakcja Real-Time PCR jest niezwykle czuła i wymaga zastosowania wysokiej jakości DNA, ponieważ wszelkie zanieczyszczenia, zarówno te pochodzące z elementów komórkowych, jak i z odczynników stosowanych w wybranej metodzie izolacji, mogą mieć wpływ na odczyt fluorescencji. W niniejszej pracy, została podjęta próba wykorzystania DNA w reakcji Real-Time PCR, które znajduje się w lizacie komórkowym zawieszonym w mieszaninie buforów zastosowanych w celu jego uwolnienia (Bufor A oraz Bufor B opisane w Materiałach 3.2.2.). DNA grzybni wyizolowano zgodnie z protokołem opisanym w publikacji (Brillowska-Dąbrowska *et al.*, 2007), a następnie została podjęta próba stworzenia układu do identyfikacji dermatofitów z zastosowaniem wcześniej opisanych starterów pan-dermatofitowych oraz identyfikacji gatunku *T. rubrum* również z zastosowaniem starterów wcześniej opisanych (Brillowska-Dąbrowska *et al.*, 2007).

5.1.1. Pan-dermatofitowy Real-Time PCR

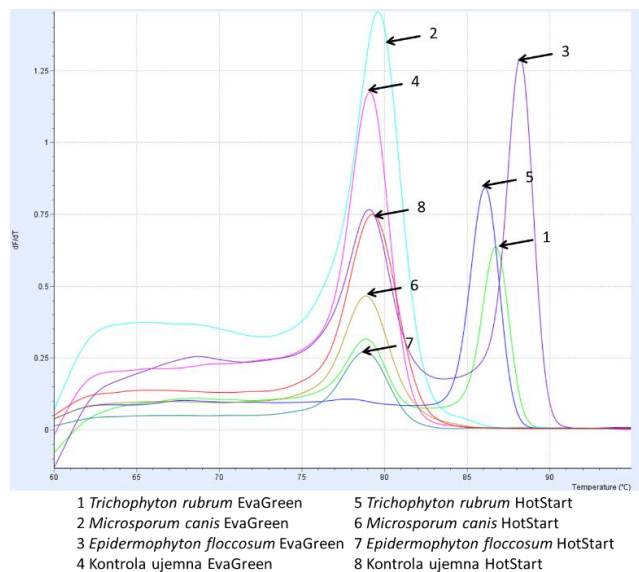
W celu ustalenia odpowiednich warunków reakcji przetestowano 3 komercyjnie dostępne mieszaniny, przeznaczone do reakcji Real-Time PCR, różniące się ilością związku fluorescencyjnego SYBR – SybrA, SybrB i SybrC. Reakcje zostały przeprowadzone w warunkach opisanych w Tabeli 3 (rozdział Metody 4.3) przy zastosowaniu starterów panDermFor oraz panDermRev opracowanych przez zespół Brillowskiej-Dąbrowskiej (Brillowska-Dąbrowska *et al.*, 2007), a jako matryce zastosowano DNA *E. floccosum* i *T. rubrum*, gatunków znacznie różniących się (genotypowo i fenotypowo) (Rys 23). W przypadku zastosowania mieszaniny SybrA otrzymano produkt o temperaturze topnienia 88-89°C dla *E. floccosum* oraz 87,5-88,5°C dla *T. rubrum*. Dla mieszaniny SybrB otrzymano produkt o temperaturze topnienia dla *T. rubrum* 86-87°C o małej intensywności fluorescencji, a dla *E. floccosum* produkt o temperaturze topnienia 87-88°C. Kolejną testowaną mieszaniną była mieszanina SybrC i dla niej nie otrzymano pozytywnych wyników.



Rys 23. Krzywa topnienia produktów amplifikacji pan-dermatofitowego Real-Time PCR. (zastosowane mieszaniny reakcyjne: SybrA, SybrB i SybrC).

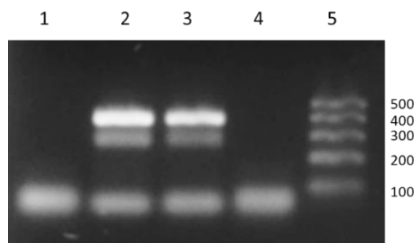
Oprócz sprawdzenia możliwości zastosowania mieszanin SybrA, SybrB i SybrC zostały również przetestowane inne komercyjnie dostępne mieszaniny – StartWarm 2xPCR Master Mix (A&A Biotechnology) i Real-Time HS 2xPCR Master Mix EvaGreen® (A&A Biotechnology). Mieszanina StartWarm wykorzystuje technikę Hot Start PCR, która umożliwia przygotowanie reakcji w temperaturze pokojowej bez ryzyka wystąpienia niespecyficznego amplifikacji i tworzenia struktury „primer-dimer”. Uzyskiwane jest to w wyniku hamowania aktywności polimerazy Hot Start Taq do momentu aktywacji cieplnej. EvaGreen jest natomiast barwnikiem, który sam w sobie nie jest fluorescencyjny, jednak po związaniu do podwójnej nici DNA staje się silnie fluorescencyjny, tym samym wykazuje niższą fluorescencję tła aniżeli SYBR. Dodatkowo od SYBR

odróżnia go to, iż wykazuje mniejsze działanie inhibycyjne na reakcję PCR, jak również jest bardziej stabilny zarówno w warunkach przechowywania, jak i podczas reakcji PCR. Wyniki reakcji z zastosowaniem obu mieszanin zostały zaprezentowane poniżej na Rys 24. Skład mieszaniny reakcyjnej opisany jest w Tabeli 2 (rozdział Metody 4.2), a profil temperaturowo-czasowy w Tabeli 3 (rozdział Metody 4.3). Przy zastosowaniu EvaGreen zaobserwowano pozytywny wynik reakcji Real-Time PCR dla 2 zastosowanych matryc (TR2 i EF1), natomiast stosując mieszaninę HotStart wynik pozytywny zaobserwowano tylko w przypadku matrycy TR2. Biorąc pod uwagę powyższe, do dalszych badań wybrano mieszaninę reakcyjną SybrA.



Rys 24. Krzywa topnienia produktów amplifikacji pan-dermatofitowego Real-Time PCR, Zastosowane mieszaniny reakcyjne HotStart i EvaGreen.

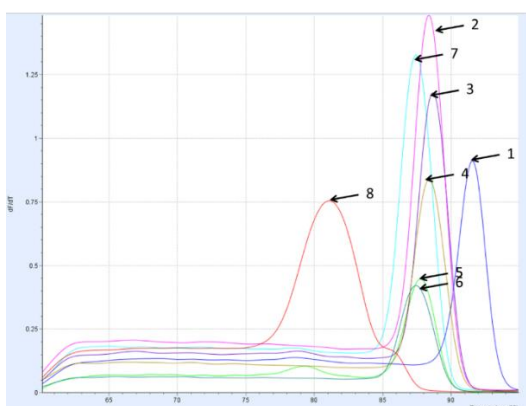
W celu upewnienia się czy produkty reakcji z zastosowaniem mieszaniny SybrA odpowiadają oczekiwanym wielkościom rozdzielono je w 1% żelu agarozowym, a wyniki przedstawiono na Rys 25. Produkt uzyskany w reakcji PCR z zastosowaniem Pan-dermatofitowych starterów odpowiada wielkości 366 pz, co jest zgodne z oczekiwanym wynikiem. Na Rys 25 obserwujemy dwa produkty reakcji. Wynik taki spowodowany jest obecnością w mieszaninie poreakcyjnej, której końcowym etapem było badanie temperatury topnienia produktów, zarówno DNA dwuniciowego jak i jednoniciowego, które mają odmienną konformację przestrzenną. Z tego powodu, mimo iż posiadają taką samą masę, migrują w żelu z różną szybkością. Prążek o większej intensywności odpowiada DNA dwuniciowemu.



Rys 25. Elektroforegram produktów amplifikacji pan-dermatofitowego Real-Time PCR. Produkty PCR uzyskano na matrycach: 1 - kontrola ujemna, 2 - *E. floccosum*, 3 - *T. rubrum*, 4 - kontrola ujemna, 5 - M 100-500 pz

Jednym z głównych celów niniejszej pracy było stworzenie układów, które będą oparte na jednym, tym samym systemie, co jest znacznym udogodnieniem w rutynowej pracy laboratoryjnej. Dlatego też wszystkie układy opracowywane były z zastosowaniem gotowej mieszaniny reakcyjnej SybrA (A&A Biotechnology).

Kolejnym etapem był wybór temperatury przyłączenia starterów - przy zastosowaniu profilu temperaturowo-czasowego z temperaturą przyłączania starterów 55°C, otrzymano wyłącznie specyficzne produkty o temperaturze topnienia w zakresie od 87 do 92°C świadczące o obecności w mieszaninie reakcyjnej DNA dermatofitów. W próbkach ujemnych może pojawiać się niespecyficzny produkt o temperaturze topnienia 81°C, który nie jest brany pod uwagę w interpretacji.



Rys 26. Krzywa topnienia produktów amplifikacji pan-dermatofitowego Real-Time PCR. Produkty PCR uzyskane w reakcji z DNA wyizolowanym z: 1 - *M. audouinii*, 2 - *A. insingulare*, 3 - *E. floccosum*, 4 - *T. mentagrophytes*, 5 - *T. rubrum*, 6 - *T. verrucosum*, 7 - *T. violaceum*, 8 - kontrola ujemna.

Kolejnym parametrem, którego wartość należało wybrać w celu uzyskania oczekiwanej jakości wyników były czasy trwania poszczególnych etapów 3-stopniowej amplifikacji, które zostały wydłużone do 15, 15 i 25 sekund odpowiednio dla denaturacji, przyłączania starterów oraz wydłużania. Ostateczny profil temperaturowo-czasowy został przedstawiony w Tabeli 4 (rozdział Metody 4.3), a uzyskane w Tabeli 18. **W odniesieniu do badanej grupy izolatów pan-**

dermatofitowy Real-Time PCR cechuje 100% specyficzność, jako że pozytywny wynik został uzyskany dla wszystkich 65/65 przebadanych próbek zawierających DNA dermatofitów, które pochodziło z 12 różnych gatunków, natomiast wynik był ujemny dla 18/18 próbek zawierających DNA innych grzybów aniżeli dermatofity oraz DNA bakterii. Dodatkowo test został przeprowadzony na DaNA wyizolowanym z włosów 4 zdrowych osób, a uzyskany wynik był ujemny, tzn. nie stwierdzono w badanych próbkach DNA pochodzącego od dermatofitów.

Tabela 18. Wyniki ustalone podczas optymalizacji pan-dermatofitowego Real-Time PCR

Dermatofity	Ilość próbek, dla których uzyskano wynik pozytywny / ilość próbek poddanych analizie	Tm [°C]
<i>E. floccosum</i>	9/9	88,5-90
<i>M. audouinii</i>	2/2	92
<i>M. canis</i>	11/11	87,5-92
<i>N. gypsea</i>	1/1	89-92
<i>T. interdigitale</i>	1/1	89
<i>T. mentagrophytes</i>	13/13	88-89
<i>T. rubrum</i>	14/14	87,5-88,5
<i>T. soudanense</i>	1/1	88
<i>A. insingulare</i>	7/7	88,5-89
<i>T. tonsurans</i>	3/3	88,5-89
<i>T. verrucosum</i>	2/2	87,5-88
<i>T. violaceum</i>	1/1	87
Nie-dermatofity		
<i>A. charticola</i>	0/1	80
<i>A. kiliense</i>	0/1	81
<i>A. alternata</i>	0/1	80,5
<i>A. species</i>	0/1	80,5
<i>C. albicans</i>	0/1	80
<i>C. glabrata</i>	0/3	80,5
<i>C. kruzei</i>	0/1	83
<i>F. culmorum</i>	0/1	80,5
<i>M. circinelloides</i>	0/1	81
<i>M. racemosus</i>	0/1	80,5
<i>P. digitatum</i>	0/1	79
<i>P. verrucosum</i>	0/1	80,5
<i>P. paneum</i>	0/1	81
<i>R. oligosporus</i>	0/1	80
<i>R. oryzae</i>	0/1	80
<i>S. brevicaulis</i>	0/1	81

Skład mieszaniny reakcyjnej oraz ustalone warunki przeprowadzenia reakcji zostały sprawdzone na DNA wyizolowanym z 11 izolatów *E. floccosum*, 5 izolatów *M. audouinii*, 76 izolatów *M. canis*, 2 izolatów *N. gypsea*, 3 izolatów *T. interdigitale*, 61 izolatów *T. mentagrophytes*, 53 izolatów *T. rubrum*, 1 izolat *T. soudanense*, 7 izolatów *A. insingulare*, 4 izolatów *T. tonsurans*, 2 izolatów *T. violaceum* oraz 2 izolatów *T. verrucosum* co daje łączną ilość 227 izolatów dermatofitów. Uzyskane wyniki zostały przedstawione w zbiorczej Tabeli 19.



Tabela 19. Zbiorcze wyniki pan-dermatofitowego Real-Time PCR wraz z podanymi temperaturami topnienia specyficznych produktów

Izolat	panDerm	Tm	Szczep	panDerm	Tm	Szczep	panDerm	Tm
<i>E. floccosum</i>			<i>T. interdigitale</i>			<i>T. rubrum</i>		
EF 1	+	88,27	TI 1	+	88,83	TR 1	+	87,60
EF 2	+	88,38	TI 2	+	87,79	TR 2	+	87,76
EF 3	bd	-	TI 3	+	87,99	TR 3	+	87,60
EF 4	+	88,61	<i>T. mentagrophytes</i>			TR 4	+	87,68
EF 5	+	88,71				TR 5	+	87,47
EF 6	+	88,56	TM 1	+	88,38	TR 6	+	87,58
EF 7	+	88,71	TM 2	+	88,94	TR 7	+	87,43
EF 8	+	88,82	TM 3	+	88,69	TR 8	+	87,49
EF 9	+	88,68	TM 4	+	88,54	TR 9	+	87,55
EF 10	bd	-	TM 5	+	88,86	TR 10	+	87,49
EF 11	bd	-	TM 6	+	88,22	TR 11	+	87,52
EF 12	+	88,45	TM 7	+	88,66	TR 12	+	87,71
EF 13	bd	-	TM 8	+	88,47	TR 13	+	87,65
EF 14	+	88,31	TM 9	+	88,65	TR 14	+	87,96
EF 15	+	88,29	TM 10	+	88,15	TR 15	+	87,45
<i>M. audouinii</i>			TM 11	+	88,16	TR 16	+	87,43
MA 1	+	91,54	TM 12	+	88,51	TR 17	+	87,03
MA 2	+	92,02	TM 13	+	88,17	TR 18	+	87,60
MA 3	+	91,56	TM 14	+	88,32	TR 19	+	87,41
MA 4	+	91,38	TM 15	+	88,55	TR 20	+	87,45
MA 5	+	91,46	TM 16	+	88,60	TR 21	-	-
<i>M. canis</i>			TM 17	+	88,54	TR 22	+/-	87
MC 1	+	91,74	TM 18	+	88,53	TR 23	+	87,18
MC 2	-	-	TM 19	+	88,58	TR 24	+	-
MC 3	+	91,97	TM 20	+	88,62	TR 25	+	87,49
MC 4	+	91,02	TM 21	+	88,37	TR 26	+	87,5
MC 5	+	91,86	TM 22	+	88,30	TR 27	+	87,5
MC 6	+	88,68	TM 23	+	88,55	TR 28	+	87,15
MC 7	+	87,26	TM 24	+	88,40	TR 29	+	87,76
MC 8	+	87,22	TM 25	+	88,40	TR 30	+	87,14
MC 9	+	91,76	TM 26	+	88,33	TR 31	+	87,04
MC 10	+	91,68	TM 27	+	87,26	TR 32	+	87,07
MC 11	+	91,67	TM 28	+	88,35	TR 33	+	87,10
MC 12	-	-	TM 29	+	88,28	TR 34	+	87,42
MC 13	+	91,67	TM 30	+	87,59	TR 35	+	87,56
MC 14	+	88,74	TM 31	+	87,7	TR 36	+	86,69
MC 15	+	88,30	TM 32	+	87,18	TR 37	+	87,16
MC 16	+	88,24	TM 33	+	87,58	TR 38	+	87,04
MC 17	-	-	TM 34	+	88,4	TR 39	+	87,46
MC 18	+	91,73	TM 35	+	87,87	TR 40	+	87,48
MC 19	+	91,62	TM 36	+	87,77	TR 41	+	87,34
MC 20	+	91,60	TM 37	+	88,1	TR 42	+	87,29
MC 21	+	88,78	TM 38	+	88,04	TR 43	+	86,93
MC 22	+	91,79	TM 39	+	88,18	TR 44	+	87,85
MC 23	-	-	TM 40	+	87,61	TR 45	+	87,58
MC 24	+	87,89	TM 41	+	88,00	TR 46	+	87,39
MC 25	+	91,34	TM 42	+	88,00	TR 47	+	87,48
MC 26	+	88,5	TM 43	+	88,18	TR 48	+	88,21
MC 27	-	-	TM 44	+	88,19	TR 49	+	88,09
MC 28	-	-	TM 45	+	87,64	TR 50	+	87,49
MC 29	+	91,35	TM 46	+	88,09	TR 51	+	88,05
MC 30	+	91,30	TM 47	+	88,01	TR 52	+	87,19
MC 31	+	91,30	TM 48	+	88,51	TR 53	+	87,12



MC 32	+	91,28	TM 49	+	87,68	<i>T. soudanase</i>		
MC 33	+	91,39	TM 50	+	87,71	TS 1	+	88,10
MC 34	+	91,15	TM 51	+	88,18	<i>A. insingulare</i>		
MC 35	+	91,30	TM 52	+	88,07	AI 1	+	88,89
MC 36	+	91,26	TM 53	+	88,19	AI 2	+	88,36
MC 37	+	88,28	TM 54	+	87,55	AI 3	+	88,30
MC 38	+	88,20	TM 55	+	88,19	AI 4	+	88,48
MC 39	+	91,39	TM 56	+	88,36	AI 5	+	88,41
MC 40	+	91,40	TM 57	+	88,38	AI 6	+	88,46
MC 41	+	91,37	TM 58	+	87,93	AI 7	+	88,47
MC 42	+	91,18	TM 59	+	87,90	<i>T. tonsurans</i>		
MC 43	+	91,27	TM 60	+	87,80	TTo 1	+	88,44
MC 44	+	91,31	TM 61	+	87,91	TTo 2	+	88,27
MC 45	-	-				TTo 3	+	88,21
MC 46	+	91,39				TTo 4	+	87,76
MC 47	+	88,48				<i>T. violaceum</i>		
MC 48	+	91,14				TVio 1	+	87,68
MC 49	+	91,42				TVio 2	+	87,42
MC 50	+	88,07				<i>T. verrucosum</i>		
MC 51	-	-				TV 1	+	87,42
MC 52	+	91,23				TV 2	+	87,57
MC 53	+	91,16						
MC 54	+	88,45						
MC 55	+	91,49						
MC 56	-	-						
MC 57	+	88,84						
MC 58	+	88,56						
MC 59	+	88,65						
MC 60	-	-						
MC 61	-	-						
MC 62	+	91,54						
MC 63	-	-						
MC 64	+	91,46						
MC 65	+	91,35						
MC 66	-	-						
MC 67	+	91,49						
MC 68	-	-						
MC 69	+	91,59						
MC 70	+	91,65						
MC 71	-	-						
MC 72	+	91,5						
MC 73	+	91,5						
MC 74	+	91,37						
MC 75	+	91,49						
MC 76	+	91,46						
<i>N. gypsea</i>								
NG 1	+	92,12						
NG 2	+	91,4						

Czerwonym kolorem zaznaczono wyniki, dla których uzyskano brak produktów reakcji dla gatunku *M. canis*. Niebieskim kolorem zaznaczono wyniki, dla których temperatura topnienia produktów reakcji wynosiła od 87 do 89°C dla gatunku *M. canis*

Zaobserwowano, iż temperatury topnienia produktów reakcji są charakterystyczne rodzajowo. Dla rodzajów *Epidermophyton* oraz *Trichophyton* były to temperatury od 87 do 89°C, natomiast dla rodzaju *Microsporum* temperatura ta wynosiła zazwyczaj od 92 do 93°C. Jednakże, w przypadku 16



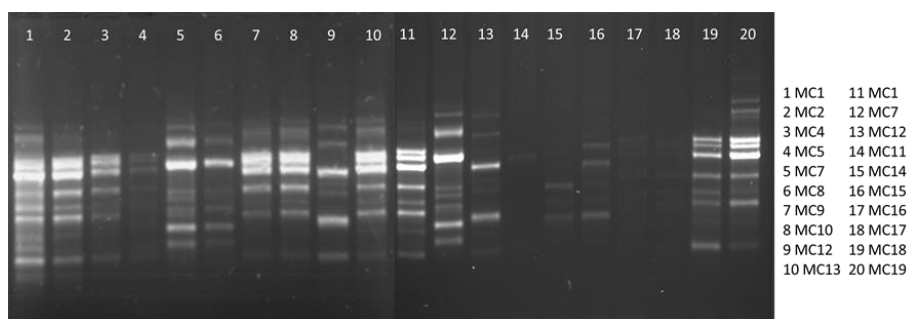
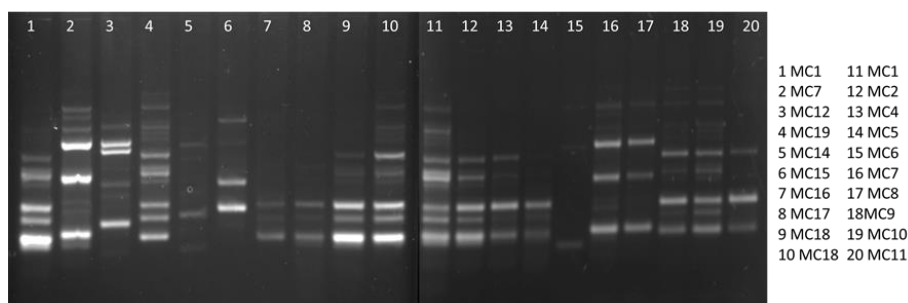
szczepów gatunku *M. canis* uzyskano temperatury w zakresie od 87 do 89°C (zaznaczone na kolor niebieski w Tabeli 19), a dla 15 szczepów nie uzyskano żadnych produktów reakcji (zaznaczone na kolor czerwony w Tabeli 19). Różnice w temperaturze topnienia specyficznych produktów reakcji Real-Time PCR mogły wskazywać na różnice w genotypach tych szczepów, dlatego też podjęto próbę genotypowania gatunku *M. canis*. Próbę podjęto ze względu na to, że w literaturze naukowej brak jest doniesień na temat możliwości rozróżniania genotypów w obrębie gatunku *M. canis*. Samo zastosowanie reakcji Real-Time PCR w warunkach opisanych w rozdziale Materiały 4.3 można by było uznać za genotypowanie, jednakże w związku ze sprzecznością uzyskanych wyników z danymi literaturowymi przeprowadzono dalsze badania.

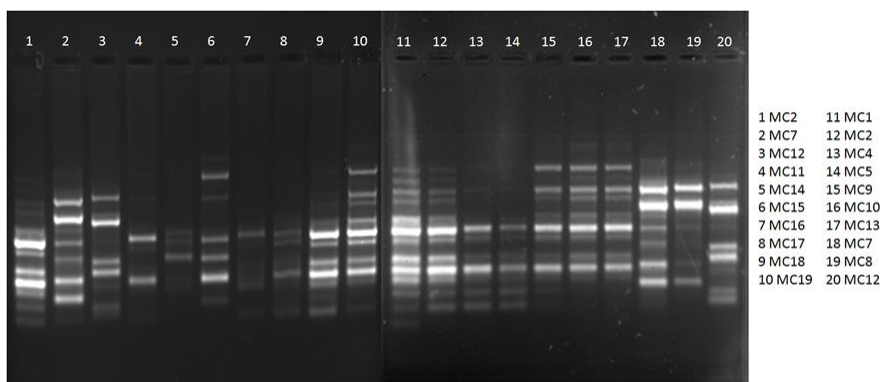
W celu przeprowadzenia genotypowania izolatów należących do gatunku *M. canis* zostało wykorzystanych dwanaście starterów wymienionych w rozdziale Materiały 3.2.8. W wyniku użycia dwóch z nich nie uzyskano żadnych produktów reakcji [startery NS1 (Sivakumaran *et al.*, 2002) i LR7 (Bunyard *et al.*, 1996)], cztery nie wykazały żadnego różnicowania [LR3R (Hoppe i Vilgalys, 1999), OPE03 (Saran *et al.*, 2008), RAPD1281 (Johnson *et al.*, 2004) oraz 4241R (Chantratita *et al.*, 2011)], 6 natomiast wykazało różnicowanie [GACA (Meyer *et al.*, 1999), LR14 (Hopple i Vilgalys, 1999), OPE18 (Saran *et al.*, 2008), RAPD1247 (Johnson *et al.*, 2004), RAPD1254 (Johnson *et al.*, 2004) oraz OPZ10 (Rawashdeh i Amri, 2006)]. Uzyskane różnicowanie stało w sprzeczności z danymi literaturowymi. W pierwszym etapie sprawdzane były matryce od MC1 do MC11 - wśród tych matryc wyodrębniono 2 lub 3 profile elektroforetyczne, w zależności od tego, który starter został zastosowany. Następnie, wybrano trzy startery, w wyniku zastosowania których w RAPD uzyskano profile elektroforetyczne dające największą szansę na uzyskanie różnorodnych genotypów (GACA Rys 27, OPE18 Rys 28 oraz OPZ10 Rys 29) i przeprowadzono reakcję na matrycach od MC12 do MC19. Umożliwiło to wyodrębnienie kolejnych 3 genotypów - wyniki zostały zebrane w Tabeli 20.



Tabela 20. Zbiornicze wyniki genotypowania gatunku *M. canis*. (-) oznacza, że dany szczep nie został przebadany

	GA CA	LR 3R	LR 14	OPE 18	OPE 03	RAPD 1247	RAPD 1254	RAPD 1281	OPZ 10	424 1R
MC1	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
MC2	A	-	A	A	A	A	A	A	A	A
MC4	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
MC5	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
MC6	-	A	B	B	-	B	B	A	-	A
MC7	B	A	C	C	A	C	C	A	B	A
MC8	B	A	C	C	-	C	C	A	B	A
MC9	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
MC10	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
MC11	B	A	-	A	-	A	A	A	A	A
MC12	C	-	-	D	-	-	-	-	C	-
MC13	A	-	-	A	-	-	-	-	A	-
MC14	A	-	-	E	-	-	-	-	D	-
MC15	A	-	-	F	-	-	-	-	E	-
MC16	A	-	-	A	-	-	-	-	A	-
MC17	A	-	-	A	-	-	-	-	A	-
MC18	A	-	-	A	-	-	-	-	A	-
MC19	A	-	-	A	-	-	-	-	A	-

Rys 27. Profile elektroforetyczne uzyskane w wyniku zastosowania startera GACA w reakcji RAPD przy zastosowaniu matrycy DNA *M. canis*.Rys 28. Profile elektroforetyczne uzyskane w wyniku zastosowania startera OPE18 w reakcji RAPD przy zastosowaniu matrycy DNA *M. canis*.



Rys 29. Profile elektroforetyczne uzyskane w wyniku zastosowania startera OPZ10 w reakcji RAPD przy zastosowaniu matrycy DNA *M. canis*.

W związku z tym, że otrzymane wyniki z zastosowaniem prostej i powszechnie stosowanej metody RAPD stały w sprzeczności z danymi literaturowymi (Faggi *et al.*, 2001, Brilhante *et al.*, 2005, Leibner-Ciszak *et al.*, 2010), dokonano identyfikacji molekularnej 8 wybranych szczepów. Aby zweryfikować, czy szczepy, których profile elektroforetyczne były inne aniżeli dla szczepu referencyjnego (MC1) należą do gatunku *M. canis*, co świadczyłoby o zmienności wewnątrzgatunkowej, przeprowadzono reakcję PCR z zastosowaniem starterów ITS1 i ITS4 (White *et al.*, 1990), a jej produkty zostały poddane sekwencjonowaniu. W tym miejscu warto przypomnieć, iż temperatury topnienia specyficznych produktów Real-Time PCR, z zastosowaniem starterów panDermatofitowych (panDermFor oraz panDermRev) (Brillowska-Dąbrowska *et al.*, 2007), miały inną temperaturę topnienia aniżeli inne szczepy tego gatunku.

Jako wynik sekwencjonowania genu ITS otrzymano pliki w formacie FASTA zawierające sekwencje nukleotydowe. Stosując program BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) przeszukana została baza sekwencji nukleotydowych, która umożliwiła identyfikację gatunkową badanych szczepów. Wykazały one, iż izolaty, których temperatura topnienia produktów Real-Time PCR wynosiła pomiędzy 87 a 89°C, należały do innych rodzajów dermatofitów. Jeden szczep, dla którego nie uzyskano żadnego produktu reakcji PCR był gatunkiem z rodzaju *Penicillium*, a dla pozostałych 4 szczepów nie uzyskano produktów PCR z zastosowaniem starterów ITS1 oraz ITS4. Szczegółowe wyniki zostały przedstawione w Tabeli 21.

Tabela 21. Wyniki identyfikacji gatunkowej z użyciem sekwencjonowania z zastosowaniem starterów ITS1 oraz ITS4

Izolat	panDerm	Tm	Wyniki sekwencjonowania
MC 6	+	88.68	Sekwencjonowanie: <i>T. verrucosum</i>
MC 12	-	-	<i>Penicillium</i>
MC 14	+	88.74	Sekwencjonowanie: <i>T. verrucosum</i>
MC 15	+	88.30	Sekwencjonowanie: <i>T. mentagrophytes</i>
MC 17	-	-	-
MC 23	-	-	-
MC 27	-	-	-
MC 28	-	-	-

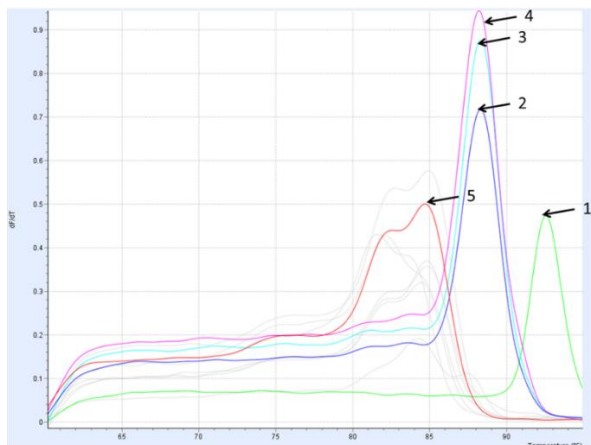
Szczep MC 12 pobrany od zwierząt został wyizolowany w Katedrze Nauk Przedklinicznych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, natomiast szczepy MC 6, MC 14, MC 15, MC 17, MC 23, MC 27 i MC 28 pochodzące z próbek pobranych od ludzi zostały wyizolowane w Katedrze Dermatologii, Wenerologii i Alergologii Wydziału Lekarskiego Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. Nie zaleziono wytłumaczenia, dlaczego nie uzyskano produktów PCR w reakcji ze starterami amplifikującymi DNA wszystkich znanych grzybów.

Temperatura topnienia produktów Real-Time PCR wszystkich izolatów *M. canis* wynosiła pomiędzy 92 a 93°C; umożliwia to odróżnienie rodzaju *Microsporium* od pozostałych rodzajów dermatofitów.

5.1.2. *Trichophyton rubrum*-specyficzny Real-Time PCR

W celu doboru optymalnych warunków reakcji przebadano DNA następujących gatunków: *T. rubrum*, *T. mentagrophytes*, *T. soudanense*, *T. tonsurans*, *A. insingulare*, *T. verrucosum*, *M. canis*, *M. audouinii*, *N. gypsea* oraz *E. floccosum*. Reakcję przeprowadzono z użyciem mieszaniny SybrA, optymalizację temperatury przyłączania starterów rozpoczęto od temperatury 60°C stosując startery TRFor oraz TRRev opracowane przez zespół Brillowskiej-Dąbrowskiej (Brillowska-Dąbrowska *et al.*, 2007). Wynik został zaprezentowany na Rys 30. Numerem 1 została oznaczona krzywa topnienia produktów zsyntetyzowanych na matrycy DNA *T. rubrum*, dla których temperatura topnienia produktów amplifikacji wynosiła 91-93°C. Natomiast w przypadku produktów zsyntetyzowanych na matrycach DNA *T. tonsurans*, *A. insingulare* oraz *T. mentagrophytes* temperatura topnienia wynosiła 88-89°C. W przypadku pozostałych przebadanych gatunków, temperatura topnienia (84-85°C) uzyskanych produktów odpowiada temperaturze topnienia niespecyficznego produktu, który powstał w wyniku reakcji bez matrycy DNA - w kontroli negatywnej.

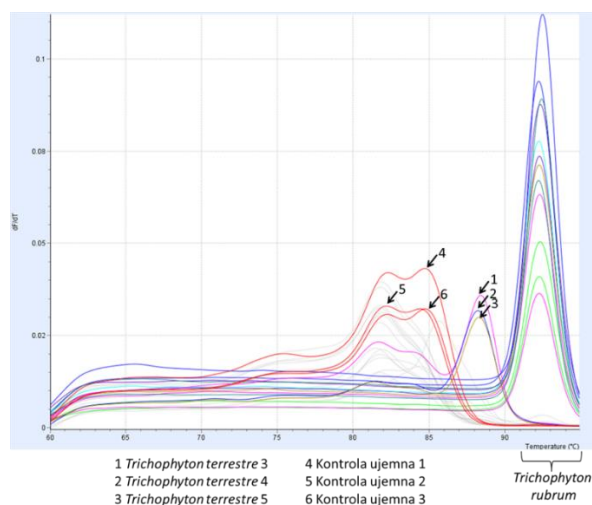




Rys 30. Krzywa topnienia produktów amplifikacji *T. rubrum*-specyficznego Real-Time PCR. Produkty PCR uzyskane w reakcji z DNA wyizolowanym z 1 – *T. rubrum*, 2 – *T. tonsurans*, 3 – *T. mentagrophytes*, 4 – *A. insingulare*, 5 – kontrola ujemna.

Ze względu na powstawanie produktów amplifikacji o temperaturze topnienia 88-89°C, podczas dalszej optymalizacji przeprowadzono reakcję Real-Time PCR na większej ilości matryc zawierających DNA gatunków *T. tonsurans*, *A. insingulare* oraz *T. mentagrophytes*. Reakcję przeprowadzono analogicznie do tej przedstawionej powyżej, jednakże testowano profile temperaturowo-czasowe, w których temperatury przyłączenia starterów wynosiły 62°C, 64 oraz 66°C.

Zastosowanie wyższej temperatury przyłączenia starterów nie spowodowało wzrostu specyficzności reakcji - w przypadku niektórych szczepów z tych gatunków pojawiały się produkty o temperaturze topnienia 88-89°C (Tabela 22). Różnica temperatur topnienia tych produktów z temperaturą topnienia produktów zsyntezowanych na matrycy DNA *T. rubrum* wynosi 3°C – jest wystarczająca, aby nie powodować ryzyka nieprawidłowej identyfikacji. Ostatecznie wybrano temperaturę przyłączenia starterów 62°C (Rys 31). Profil temperaturowo-czasowy został przedstawiony w Tabeli 7 (rozdział Metody 4.6). Obecność produktu o temperaturze topnienia od 92 do 93°C, świadczyło o obecności w próbce DNA *T. rubrum*. Produkty, których temperatura topnienia wynosi pomiędzy 84 a 85°C nie są brane pod uwagę w analizach ze względu na brak znaczenia dla identyfikacji, a zatem i brak znaczenia diagnostycznego. Wyniki przedstawiono w zbiorczej Tabeli 23. **W odniesieniu do badanej grupy izolatów *T. rubrum* - specyficzny Real-Time PCR cechuje 100% specyficzność, jako że pozytywny wynik został uzyskany dla wszystkich 14 przebadanych próbek zawierających DNA *T. rubrum*, natomiast wynik był ujemny dla 34 zawierających DNA innych gatunków dermatofitów oraz 13 próbek zawierających DNA innych grzybów aniżeli dermatofity oraz DNA bakterii.**



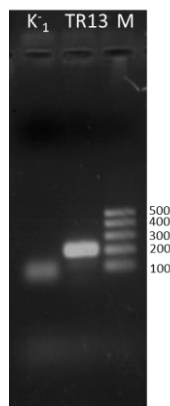
Rys 31. Krzywa topnienia produktów amplifikacji *T. rubrum*-specyficznego Real-Time PCR. Kolorem szarym zaznaczono krzywe topnienia produktów reakcji uzyskanych na matrycach: *T. mentagrophytes* (TM 2 do TM 10) oraz *A. insingulare* (A11) oraz *T. tonsurans* (TTo3).

Wyniki przedstawiono w zbiorczej Tabeli 22.

Tabela 22. Wyniki *T. rubrum*-specyficznego Real-Time PCR

Dermatofity	Liczba próbek, dla których uzyskano wynik pozytywny / liczba próbek poddanych analizie	Tm [°C]
<i>E. floccosum</i>	0/2	-
<i>M. audouinii</i>	0/2	-
<i>M. canis</i>	0/2	-
<i>N. gypsea</i>	0/1	-
<i>T. interdigitale</i>	0/1	-
<i>T. mentagrophytes</i>	0/13	4/18: 88-88,5. 14/18: 81,5-84
<i>T. rubrum</i>	14/14	91-93
<i>T. soudanense</i>	0/1	-
<i>A. insingulare</i>	0/7	3/7: 88,5 4/7: 81,5-82
<i>T. tonsurans</i>	0/3	88,5
<i>T. verrucosum</i>	0/2	1/2: 88,5 1/2: 84,5
Nie-dermatofity		
<i>A. charticola</i>	0/1	-
<i>A. kiliense</i>	0/1	-
<i>A. alternate</i>	0/1	-
<i>C. albicans</i>	0/1	-
<i>C. glabrata</i>	0/1	-
<i>C. krusei</i>	0/1	-
<i>F. culmorum</i>	0/1	-
<i>M. circinelloides</i>	0/1	-
<i>M. racemosus</i>	0/1	-
<i>P. verrucosum</i>	0/1	-
<i>R. oligosporus</i>	0/1	-
<i>R. oryzae</i>	0/1	-
<i>S. brevicaulis</i>	0/1	-

Dodatkowo sprawdzono czy produkty reakcji z zastosowaniem mieszaniny SybrA odpowiadają wielkością produktom oczekiwanym w reakcji specyficznej dla *T. rubrum*. W tym celu produkty reakcji rozdzielono w 1,5% żelu agarozowym, a wyniki przedstawiono na Rys 32. Wielkość specyficznego produktu uzyskanego na matrycy wynosi 203 pz, co odpowiada uzyskanemu wynikowi.



Rys 32. Elektroforegram produktów amplifikacji *T. rubrum*-specyficznego Real-Time PCR. Produkty PCR uzyskane przy zastosowaniu matryc: K₁ – kontrola ujemna, TR13 - *T. rubrum* nr 13, M - 100-500 pz.

5.1.3. Użyteczność szybkiej metody izolacji w reakcji Real-Time PCR

Otrzymane wyniki przedstawione w rozdziałach 5.1.1 i 5.1.2 świadczą o tym, iż DNA wyizolowane szybką metodą (Brillowska-Dąbrowska *et al.*, 2007, Brillowska-Dąbrowska *et al.*, 2010) jest odpowiednie do zastosowania w metodzie Real-Time PCR przy zastosowaniu gotowej mieszaniny SybrA. W związku z powyższym, metoda ta została zastosowana w dalszych etapach pracy.

5.2. Identyfikacja gatunku *E. floccosum*

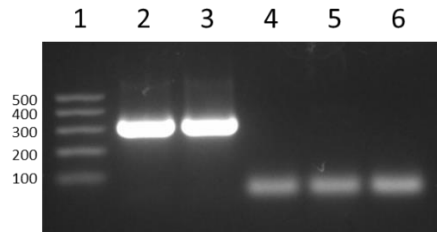
5.2.1. Projektowanie starterów

W celu opracowania testu wykorzystującego technikę PCR oraz Real-Time PCR umożliwiających identyfikację gatunku *E. floccosum* zastosowano startery EFFor oraz EFRev opracowane w ramach doktoratu, które jako cel molekularny wykorzystywały region ITS2.

5.2.2. Gatunkowo-specyficzny PCR

W celu doboru optymalnych warunków reakcji przebadano matryce następujących szczepów: *T. rubrum*, *T. mentagrophytes*, *T. soudanense*, *T. tonsurans*, *A. insingulare*, *T. verrucosum*, *M. canis*, *M. audouinii*, *N. gypsea* oraz *E. floccosum*. Reakcję przeprowadzono z użyciem mieszaniny HighGC (rozdział Materiały 3.2.6), a optymalizację temperatury przyłączenia starterów rozpoczęto od temperatury 58°C. Profil temperaturowo-czasowy został zaprezentowany w Tabeli 8 (rozdział Metody 4.7.1). Wraz ze wzrostem temperatury przyłączenia nie zaobserwowano wzrostu specyficzności reakcji, dlatego też wybrano temperaturę 58°C.

Oczekiwany produkt *E. floccosum*-specyficznego PCR wynosił 318 pz. **Pozytywne wyniki uzyskano dla wszystkich 12 szczepów *E. floccosum*. Natomiast, negatywne wyniki uzyskano dla pozostałych 23 szczepów dermatofitowych oraz 14 szczepów nie-dermatofitowych.** Przykładowe zdjęcie umożliwiające analizę produktów po rozdziale elektroforetycznym w 1,5% żelu agarozowym zostało przedstawione na Rys 33 B.



Rys 33. Elektroforegram produktów amplifikacji *E. floccosum*. 1 – M 100-500 pz, Produkty PCR uzyskane w reakcji z DNA wyizolowanym: 1- *E. floccosum* (1), 2 – *E. floccosum* (2), 4 - *M. canis*, 5 – *T. mentagrophytes*, 6 – *T. rubrum*.

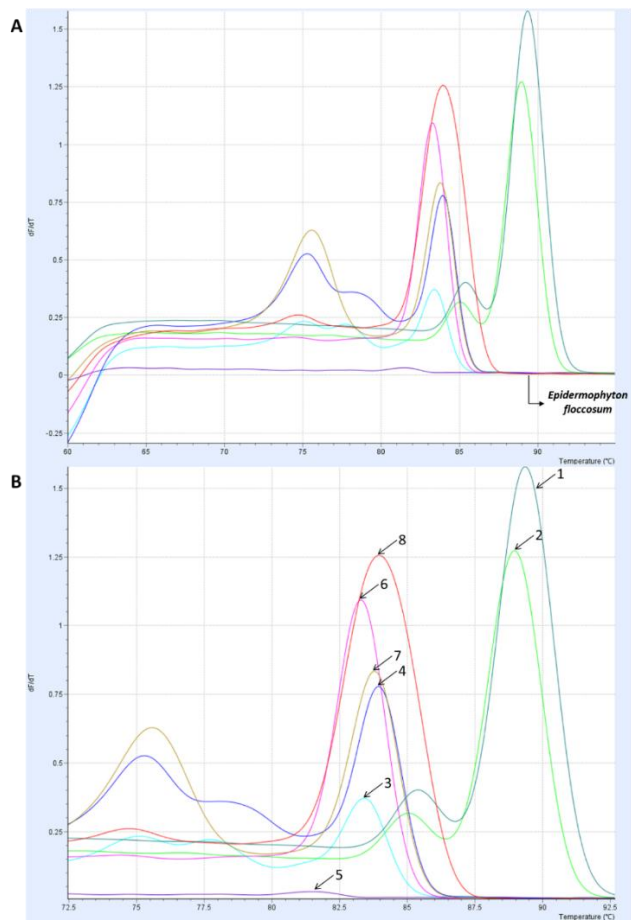
5.2.3. Gatunkowo-specyficzny Real-Time PCR

W celu doboru optymalnych warunków reakcji przebadano DNA szczepów należących do następujących gatunków: *E. floccosum*, *M. canis*, *M. audouinii*, *N. gypsea*, *T. mentagrophytes*, *T. interdigitale*, *T. rubrum* oraz *T. verrucosum*. Reakcję przeprowadzono z użyciem mieszaniny SybrA, a optymalizację temperatury przyłączania starterów rozpoczęto od temperatury 58°C. Temperatura topnienia produktów amplifikacji z zastosowaniem matrycy DNA *E. floccosum* wynosiła 89-89,5°C, natomiast w przypadku zastosowania innych matryc wynosiła: *T. rubrum* – 86,92°C, *T. verrucosum* – 85,48°C, *T. tonsurans* – 86,35°C a *A. insingulare* – 86,5-88°C. W przypadku użycia w reakcji DNA pozostałych badanych gatunków, nie zaobserwowano powstawania żadnych produktów.

Ze względu na powstawanie produktów amplifikacji o temperaturze topnienia 85,5-88°C, podczas dalszej optymalizacji przeprowadzono reakcję Real-Time PCR stosując wyższą temperaturę przyłączania starterów, nie uzyskano większej specyficzności. W związku z tym przeprowadzono reakcję Real-Time PCR na większej liczbie matryc zawierających DNA gatunków *T. rubrum*, *T. verrucosum*, *T. tonsurans* oraz *A. insingulare*. Wyniki zebrano w zbiorczej Tabeli 24, a reprezentacyjną krzywą badania temperaturę topnienia produktów amplifikacji przedstawiono na Rys 34.

Pozytywny wynik reakcji Real-Time PCR został uzyskany dla wszystkich 12 próbek zawierających DNA gatunku *E. floccosum*, natomiast wynik był ujemny dla pozostałych 25

próbek zawierających DNA innych gatunków dermatofitów oraz 14 gatunków innych grzybów aniżeli dermatofity oraz DNA bakterii (Tabela 23).



Rys 34. Krzywa topnienia produktów amplifikacji *E. floccosum*-specyficznego Real-Time PCR. Produkty PCR uzyskane w reakcji z DNA wyizolowanym z: 1 - *E. floccosum* (1), 2 - *E. floccosum* (2), 3 - *M. canis*, 4 - *T. interdigitale*, 5 - *T. mentagrophytes*, 6 - *T. rubrum*, 7 - *T. tonsurans*, 8 – kontrola ujemna.

Tabela 23. Wyniki *E. floccosum*-specyficznego PCR oraz Real-Time PCR

Dermatofity	<i>E. floccosum</i> -specyficzny Real-Time PCR		<i>E. floccosum</i> -specyficzny PCR
	Liczba próbek, dla których uzyskano wynik pozytywny / liczba próbek poddanych analizie	T _m [°C]	Liczba próbek, dla których uzyskano wynik pozytywny / liczba próbek poddanych analizie
<i>E. floccosum</i>	12/12	-	12/12
<i>M. audouinii</i>	0/2	-	0/1
<i>M. canis</i>	0/5	-	0/5
<i>N. gypsea</i>	0/1	-	0/1
<i>T. mentagrophytes</i>	0/5	-	0/5
<i>T. interdigitale</i>	0/1	-	
<i>T. rubrum</i>	0/5	4/5: - 1/5: 86,92	0/5
<i>T. verrucosum</i>	0/2	1/2: - 1/2: 84,48	0/2
<i>A. insingulare</i>	0/2	2/2: 86,5-88	0/2
<i>T. tonsurans</i>	0/2	1/2: - 1/2: 86,35	0/2
Nie-dermatofity			
<i>A. charticola</i>	0/1	-	0/1
<i>A. kiliense</i>	0/1	-	0/1
<i>A. alternata</i>	0/1	-	0/1
<i>C. albicans</i>	0/2	-	0/2
<i>C. glabrata</i>	0/2	-	0/2
<i>C. kruzei</i>	0/2	-	0/2
<i>F. culmorum</i>	0/1	-	0/1
<i>F. oxysporum</i>	0/1	-	0/1
<i>M. circinelloides</i>	0/1	-	0/1
<i>M. racemosus</i>	0/1	-	0/1
<i>P. verrucosum</i>	0/1	-	0/1
<i>R. oligosporus</i>	0/1	-	0/1
<i>R. oryzae</i>	0/1	-	0/1
<i>S. brevicaulis</i>	0/1	-	0/1

5.3. Identyfikacja gatunków kompleksu *A. otae*

5.3.1. Projektowanie starterów

Analiza sekwencji genów *M. audouinii* oraz *M. canis*, dostępnych w bazie NCBI, wykazała różnice w sekwencji genu kodującego β -tubulinę między tymi dwoma gatunkami. Zarazem, w ramach doktoratu, w wyniku dalszej analizy sekwencji tego genu, zaprojektowano startery specyficzne dla obu gatunków. Porównanie sekwencji regionu β -tubuliny różnych gatunków dermatofitów zostało przedstawione w rozdziale Metody 4.8.1. Sekwencje dla obu gatunków są bardzo podobne, w związku z tym możliwe było zaprojektowanie sekwencji starterów mało różniących się od siebie (Tabela 24).



Tabela 24. Porównanie sekwencji starterów służących do identyfikacji gatunkowej *M. canis* oraz *M. audouinii*/*M. ferrugineum*

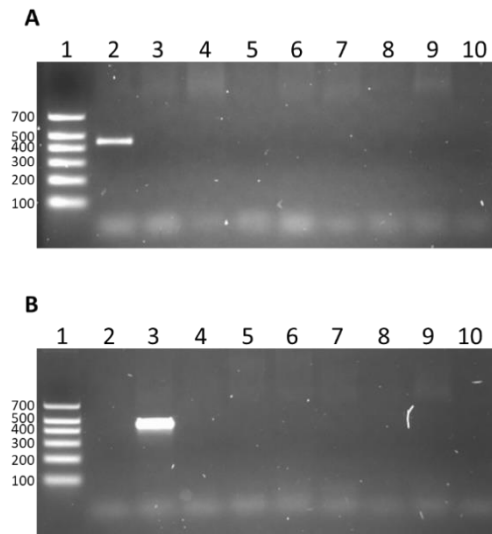
Nazwa startera	Sekwencja startera (5'-3')
MCFor	AACGAGCGTCGAGTTTCATAACCC
MA tubFor	AACGAGCGTCGAGTTTCATAA TCT
MCRRev	GTTAGTATTCTGCTGAAGAGAA GGGC
MARev	GTTAGTATTCTGCTGAAGAGAA AGGGT

5.3.2. Gatunkowo-specyficzny PCR

Wielkość oczekiwanego produktu uzyskanego w *M. audouinii*/*M. ferrugineum*-specyficznej reakcji PCR wynosiła 456 pz. W celu ustalenia optymalnych warunków reakcji PCR przeprowadzono optymalizację, którą rozpoczęto stosując profil zaprezentowany w Tabeli 10 (rozdział Metody 4.8.1). Ponieważ w reakcji w tych warunkach powstały produkty niespecyficzne przy zastosowaniu matryc DNA gatunku *M. canis*, zwiększono temperaturę przyłączania starterów. Najwyższa specyficzność została uzyskana przy temperaturze 66°C. Wybrany profil, przy którym zarówno wydajność jak i specyficzność reakcji była najwyższa zaprezentowano w Tabeli 11 (rozdział Metody 4.8.1). Wyniki zostały przedstawione w zbiorczej Tabeli 25. **W odniesieniu do badanej grupy izolatów *M. audouinii*/*M. ferrugineum*-specyficzny PCR cechuje 100% specyficzność** (Tabela 25). Przykładowe zdjęcie umożliwiające analizę produktów po rozdiale elektroforetycznym w 1,5% żelu agarozowym zostało przedstawione na Rys 35 A.

Wielkość oczekiwanego produktu uzyskanego w *M. canis*-specyficznej reakcji PCR wynosiła 455 pz. W celu ustalenia optymalnych warunków reakcji PCR przeprowadzono optymalizację, którą rozpoczęto stosując profil zaprezentowany w Tabeli 10 (rozdział Metody 4.8.1). Ponieważ pojawiły się produkty niespecyficzne w przypadku zastosowania matrycy DNA gatunku *M. audouinii* zwiększono temperaturę przyłączania starterów. Zdecydowano również o zmniejszeniu ilości cykli 3-stopniowej amplifikacji z 40 na 35. Najwyższa specyficzność została uzyskana przy temperaturze przyłączania starterów 66°C (Tabela 12). **W odniesieniu do badanej grupy izolatów *M. canis*-specyficzny PCR cechuje 100% specyficzność, jako że pozytywny wynik został uzyskany dla 14 próbek zawierających DNA *M. canis*, natomiast wynik był ujemny dla 23 próbek zawierających DNA innych gatunków dermatofitów oraz 13 próbek zawierających DNA innych grzybów aniżeli dermatofity oraz DNA bakterii** (Tabela 25). Przykładowe zdjęcie reprezentujące wynik analizy produktów na 1,5% żelu agarozowym został przedstawiony na Rys. 35 B.



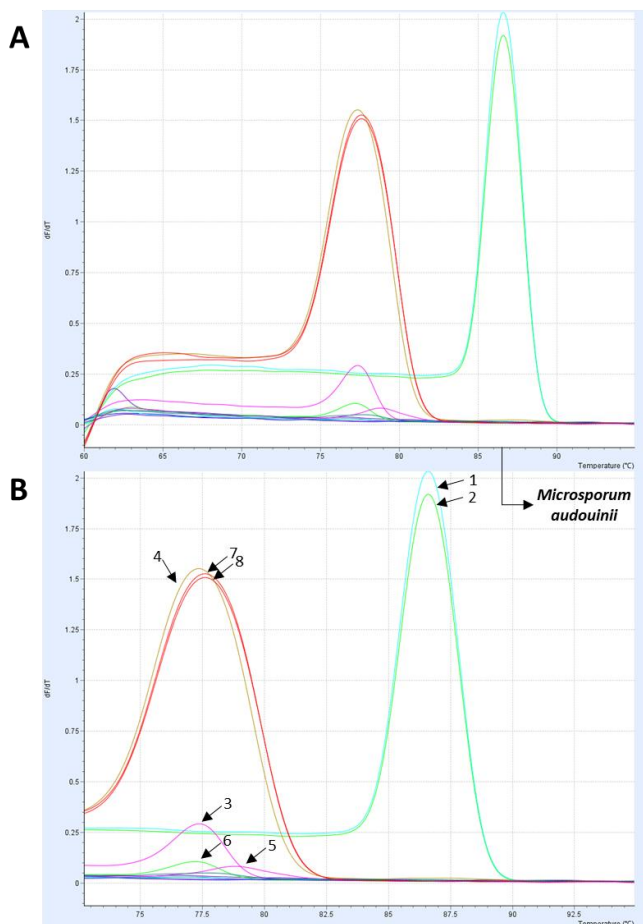


Rys 35. Elektroforegram produktów amplifikacji *M. audouinii* (A) oraz *M. canis* (B). 1 – M 100-700 pz, Produkty PCR uzyskane w reakcji z DNA wyizolowanym z: 2 – *M. audouinii*, 3 – *M. canis*, 4 – *N. gypsea*, 5 – *T. rubrum*, 6 – *T. mentagrophytes*, 7 – *T. interdigitale*, 8 – *A. insingulare*, 9 – *T. tonsurans*, 10 – *E. floccosum*.

5.3.3. Gatunkowo-specyficzny Real-Time PCR

W celu dobrania optymalnych warunków reakcji *M. audouinii*/*M. ferrugineum*-specyficznego Real-Time PCR przebadano matryce DNA następujących szczepów: *M. audouinii*, *M. ferrugineum*, *M. canis*, *E. floccosum*, *T. mentagrophytes*, oraz *T. rubrum*. Reakcje przeprowadzono z użyciem mieszaniny SybrA, a optymalizację temperatury przyłączania starterów rozpoczęto od temperatury 56°C. Specyficzne produkty zaobserwowano dla reakcji w których temperatura przyłączenia starterów wynosiła 66 i 68°C. Do dalszego testowania wybrano profil temperaturowo-czasowy reakcji, w którym temperatura przyłączania starterów wynosiła 68°C (Tabela 14). W celu upewnienia się czy produkty reakcji z zastosowaniem mieszaniny SybrA odpowiadają oczekiwanej wielkościom rozdzielono je w 1% żelu agarozowym. *M. audouinii*/*M. ferrugineum* specyficzny produkt jest wielkości 456 pz i takiej wielkości produkt reakcji zaobserwowano na żelu agarozowym, w przypadku innych gatunków dermatofitów produktu tego nie zaobserwowano. Obecność produktu o temperaturze topnienia od 86,5 do 87°C, świadczyła o obecności w próbce DNA gatunku *M. audouinii* lub *M. ferrugineum*. Produkty, których temperatura topnienia wynosiła pomiędzy 77 a 78°C nie są brane pod uwagę w analizach ze względu na brak znaczenia dla identyfikacji, a zatem i brak znaczenia diagnostycznego. **W odniesieniu do badanej grupy izolatów *M. audouinii*/*M. ferrugineum*-specyficzny Real-Time PCR cechuje 100% specyficzność, jako że pozytywny wynik został uzyskany dla obu próbek zawierających DNA *M. audouinii* oraz jedynej próbki dostępnej w kolekcji KBMiM zawierającej DNA *M. ferrugineum*, natomiast wynik był ujemny dla 40 próbek zawierających DNA innych**

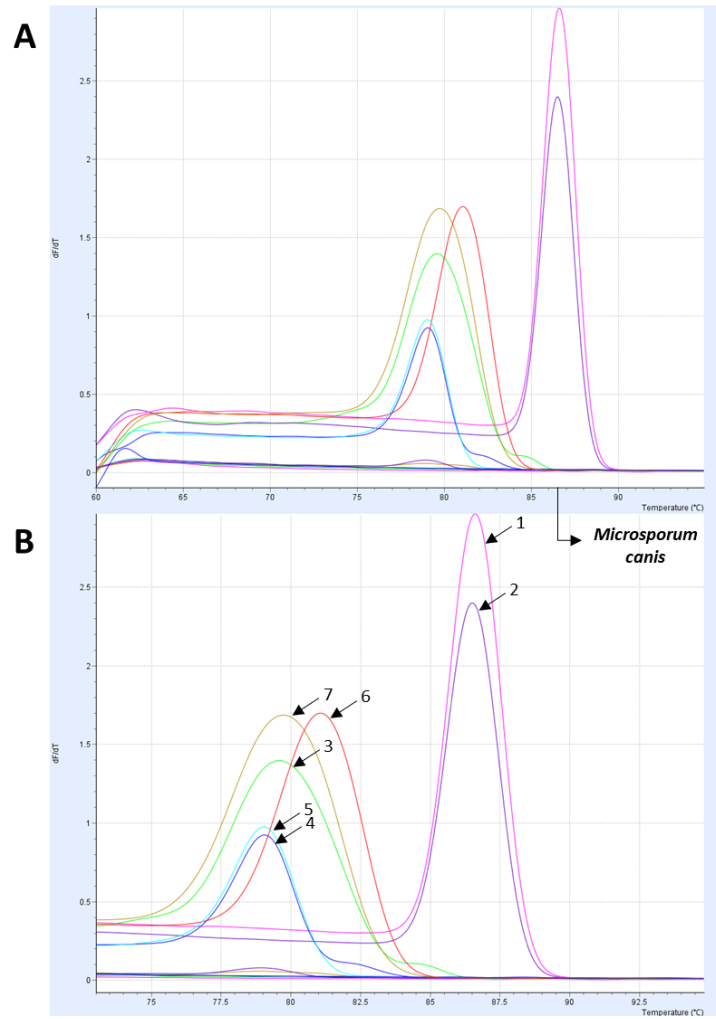
gatunków dermatofitów oraz 13 próbek zawierających DNA innych grzybów aniżeli dermatofity oraz DNA bakterii (Tabela 25).



Rys 36. Krzywa topnienia produktów amplifikacji *M. audouinii*-specyficznego Real-Time PCR. Produkty PCR uzyskane w reakcji z DNA wyizolowanym z: 1 – *M. audouinii* (1), 2 – *M. audouinii* (2), 3 – *M. canis*, 4 – *E. floccosum*, 5 – *A. insingulare*, 6 – *T. interdigitale*, 7 – kontrola ujemna (1), 8 – kontrola ujemna (2).

W celu doboru optymalnych warunków reakcji dla *M. canis*-specyficznego Real-Time PCR przebadano matryce zawierające DNA następujących szczepów: *M. audouinii*, *M. ferrugineum*, *M. canis*, *E. floccosum*, *T. mentagrophytes*, oraz *T. rubrum*. Reakcje przeprowadzono z użyciem mieszaniny SybrA, a optymalizację temperatury przyłączania starterów rozpoczęto od temperatury 56°C, jednakże w tej temperaturze zaobserwowano specyficzne produkty reakcji z zastosowaniem matryc DNA *M. canis* oraz *M. audouinii* i *E. floccosum*. Powstałe produkty reakcji miały temperaturę topnienia od 86 do 87°C. W celu zwiększenia specyficzności reakcji zwiększano temperaturę przyłączania starterów o 2°C. Reakcje prowadzono równolegle z zastosowaniem również krótszych czasów trójstopniowej amplifikacji. Wraz ze wzrostem tej temperatury obserwowano zwiększającą się różnicę temperatury topnienia powstałych amplikonów. W reakcji z przyłączaniem starterów w temperaturze 68°C, temperatura topnienia wynosiła dla matryc

E. floccosum ok 84°C. W celu upewnienia się czy produkty reakcji z zastosowaniem mieszaniny SybrA odpowiadają oczekiwanej wielkości rozdzielono je elektroforetycznie w 1% żelu agarozowym. *M. canis*-specyficzny produkt jest wielkości 455 pz i obecność takiego produktu potwierdzono po elektroforetycznym rozdzielaniu w żelu agarozowym. W mieszaninach poreakcyjnych z użyciem DNA innych gatunków dermatofitów, produktu tego nie zaobserwowano. Z zastosowaniem tej właśnie temperatury przyłączenia starterów (68°C) oraz profilu temperaturowo-czasowego przedstawionego w Tabeli 14 (rozdział Metody 4.8.2) przeprowadzono reakcje Real-Time PCR z zastosowaniem większej ilości matryc DNA innych gatunków dermatofitów oraz szczepów *M. canis* i *M. audouinii*. Obecność produktu o temperaturze topnienia od 86,5 do 87°C, świadczyła o obecności w próbce DNA gatunku *M. canis*. Produkty, których temperatura topnienia wynosiła pomiędzy 77 a 78°C nie są brane pod uwagę w interpretacji wyników ze względu na brak znaczenia dla identyfikacji, a zatem i brak znaczenia diagnostycznego. **W odniesieniu do badanej grupy izolatów stwierdzono, że *M. canis*-specyficzny Real-Time PCR cechuje 100% specyficzność, jako że pozytywny wynik został uzyskany dla 14/14 próbek zawierających DNA *M. canis*, natomiast wynik był ujemny dla 23/23 próbek zawierających DNA innych gatunków dermatofitów oraz 13/13 próbek zawierających DNA innych grzybów aniżeli dermatofity oraz DNA bakterii (Tabela 25).**



Rys 37. Krzywa topnienia produktów amplifikacji *M. canis*-specyficznego Real-Time PCR. Produkty PCR uzyskane w reakcji z DNA wyizolowanym z: 1 – *M. canis* (1), 2 – *M. canis* (2), 3 – *M. audouinii*, 4 – *E. floccosum*, 5 – *A. insingulare*, 6 – *T. interdigitale*, 7 – kontrola ujemna (1), 8 – kontrola ujemna (2).

Wyniki gatunkowo-specyficznego PCR oraz Real-Time PCR zostały zebrane w zbiorczej Tabeli 25.

Tabela 25. Zbiorcze wyniki gatunkowo-specyficznego PCR oraz gatunkowo-specyficznego Real-Time PCR dla DNA wyizolowanego ze szczepów dermatofitowych oraz szczepów nie-dermatofitowych

Dermarofity	Wyniki pozytywne/liczba przebadanych gatunków		Wyniki pozytywne/liczba przebadanych gatunków (T _m [°C])	
	<i>M. canis</i> -specyficzny PCR	<i>M. audouinii</i> -specyficzny PCR	<i>M. canis</i> -specyficzny Real-Time PCR	<i>M. audouinii</i> -specyficzny Real-Time PCR
<i>E. floccosum</i>	0/1	0/1	0/1	0/1
<i>M. audouinii</i>	0/2	2/2	0/2	2/2
<i>M. canis</i>	14/14	0/14	14/14	0/14
<i>N. gypsea</i>	0/1	0/1	0/1	0/1
<i>M. ferrugineum</i>	0/1	1/1	0/1	1/1
<i>T. interdigitale</i>	0/1	0/1	0/1	0/1
<i>T. mentagrophytes</i>	0/9	0/9	0/9	0/9
<i>T. rubrum</i>	0/8	0/8	0/8	0/8
<i>A. insingulare</i>	0/4	0/4	0/4	0/4
<i>T. tonsurans</i>	0/1	0/1	0/1	0/1
<i>T. verrucosum</i>	0/1	0/1	0/1	0/1
nie-dermatofity				
<i>A. charticola</i>	0/1	0/1	0/1	0/1
<i>A. kiliense</i>	0/1	0/1	0/1	0/1
<i>A. alternata</i>	0/1	0/1	0/1	0/1
<i>C. albicans</i>	0/1	0/1	0/1	0/1
<i>C. glabrata</i>	0/1	0/1	0/1	0/1
<i>C. kruzei</i>	0/1	0/1	0/1	0/1
<i>F. culmorum</i>	0/1	0/1	0/1	0/1
<i>F. oxysporum</i>	0/1	0/1	0/1	0/1
<i>M. circinelloides</i>	0/1	0/1	0/1	0/1
<i>M. racemosus</i>	0/1	0/1	0/1	0/1
<i>P. verrucosum</i>	0/1	0/1	0/1	0/1
<i>R. oligosporus</i>	0/1	0/1	0/1	0/1
<i>S. brevicaulis</i>	0/1	0/1	0/1	0/1

5.4. Genotypowanie

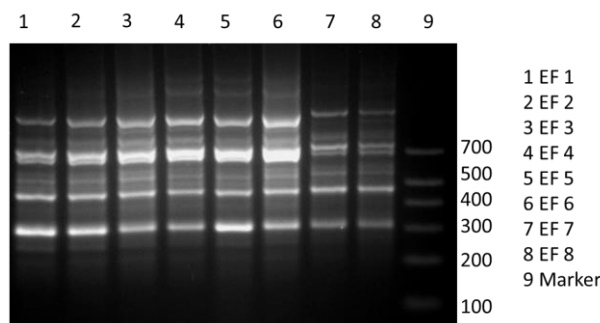
Wyniki genotypowania gatunku *M. canis*, przedstawione w rozdziale Wyniki i wnioski 5.2 wykazały bardzo duży potencjał różnicujący prostej metody RAPD, dlatego też wykorzystano ją w celu przebadania części zebranej populacji gatunków *E. floccosum*, *T. rubrum* oraz *T. mentagrophytes*.

5.4.1. Genotypowanie izolatów gatunku *E. floccosum*

W celu zbadania zmienności wewnątrzgatunkowej *E. floccosum* przebadano 8 szczepów tego gatunku (EF 1 – EF 8), które znajdowały się w kolekcji Katedry Biotechnologii Molekularnej i Mikrobiologii. Badanie zmienności wewnątrzgatunkowej *E. floccosum* rozpoczęto od zastosowania techniki RAPD z użyciem startera GACA (Meyer *et al.*, 1999) dzięki któremu uzyskano dwa genotypy (Rys 38). Zastosowanie startera OPE18 (Saran *et al.*, 2008) również wykazało zmienność



wewnątrzgatunkową, natomiast zastosowanie startera RAPD1254 (Johnson *et al.*, 2004) nie wykazało zmienności wewnątrzgatunkowej przy zastosowaniu profilu czasowo-temperaturowego z temperaturami przyłączania starterów 37 i 40°C.



Rys 38. Profile elektroforetyczne uzyskane w wyniku zastosowania startera GACA w reakcji PCR przy zastosowaniu matrycy DNA *E. floccosum*.

Wyniki genotypowania gatunku *E. floccosum* zostały zebrane w Tabeli 26.

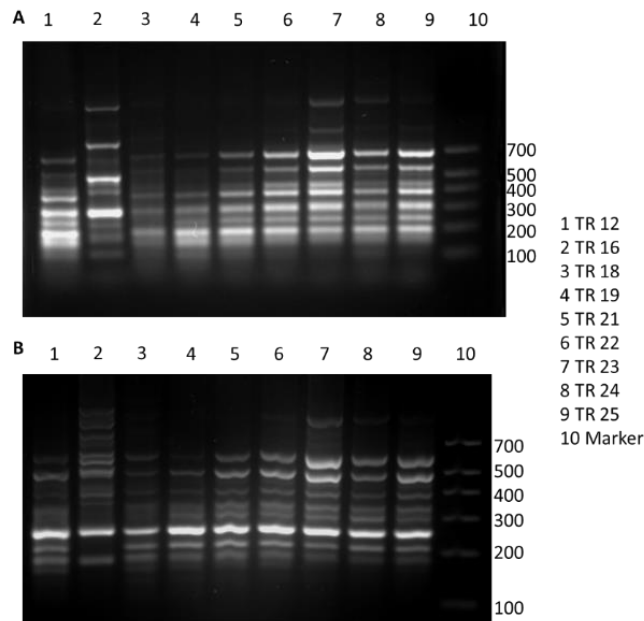
Tabela 26. Zbiorcze wyniki genotypowania gatunku *E. floccosum*

	GACA	OPE18	RAPD1254
EF 1	A	A	A
EF 2	A	A	A
EF 3	A	B	A
EF 4	A	A	A
EF 5	A	A	A
EF 6	A	A	A
EF 7	B	B	A
EF 8	B	B	A

5.4.2. Genotypowanie gatunku *T. rubrum*

W celu zbadania zmienności wewnątrzgatunkowej *T. rubrum* wybrano 9 szczepów, które znajdowały się w kolekcji Katedry Biotechnologii Molekularnej i Mikrobiologii. Badanie zmienności wewnątrzgatunkowej rozpoczęto od techniki RAPD z użyciem startera GACA (Meyer *et al.*, 1999), którego zastosowanie wykazało, iż jeden z badanych szczepów (TR 16) ma znacznie odróżniający się genotyp od pozostałych badanych szczepów. W kolejnych reakcjach zastosowano startery OPE18 (Saran *et al.*, 2008) oraz RAPD1254 (Johnson *et al.*, 2004). Zastosowanie ich, wykazało, iż profil elektroforetyczny tego jednego szczepu znacznie różni się od pozostałych, które nie wykazywały zmienności wewnątrzgatunkowej. W związku z powyższym, dokonano identyfikacji molekularnej tego szczepu poprzez sekwencjonowanie produktu reakcji PCR z zastosowaniem starterów ITS1 oraz ITS4 (White *et al.*, 1990).

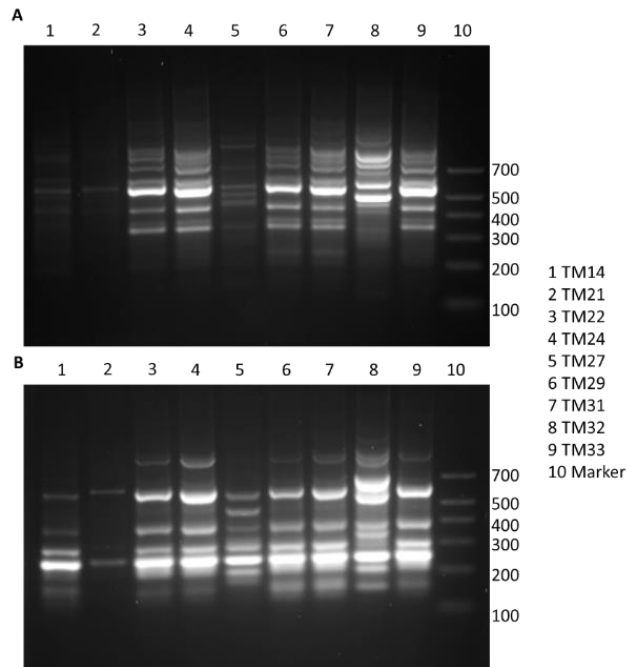
Wyniki sekwencjonowania zostały przeanalizowane i umożliwiły identyfikację gatunkową. Wykazały, iż szczep ten należy do gatunku *Candida albicans*. W związku z powyższym szczep ten został odrzucony i nie był poddawany dalszej analizie.



Rys 39. Profile elektroforetyczne reakcji genotypowania gatunku *T. rubrum* z zastosowaniem starterów (A) OPE18 oraz (B) RAPD1254.

5.4.3. Genotypowanie gatunku *T. mentagrophytes*

Badanie zmienności genetycznej *T. mentagrophytes* rozpoczęto od zastosowania techniki RAPD z użyciem startera GACA (Meyer *et al.*, 1999). Reakcje PCR przeprowadzono z zastosowaniem 26 matryc izolatów jakich, które znajdowały się kolekcji Katedry Biotechnologii Molekularnej i Mikrobiologii. Analiza wyników wykazała, iż jeden z badanych izolatów (TM 32) ma znacznie odróżniający się genotyp od pozostałych badanych. Następnie przeprowadzono reakcje z zastosowaniem startera RAPD1254 (Johnson *et al.*, 2004), które, również wykazały, iż genotyp tego jednego szczepu odróżnia się od pozostałych. W związku z powyższym, dokonano identyfikacji molekularnej tego szczepu poprzez sekwencjonowanie produktu reakcji PCR z zastosowaniem starterów ITS1 oraz ITS4 (White *et al.*, 1990). **Jednakże w tym przypadku wyniki sekwencjonowania potwierdziły, iż szczep ten należy do gatunku *T. mentagrophytes* co na późniejszym etapie prac zostało potwierdzone w reakcjach PCR oraz Real-Time PCR.**



Rys 40. Profile elektroforetyczne reakcji genotypowania gatunku *T. mentagrophytes* z zastosowaniem starterów (A) GACA oraz (B) RAPD1254.

5.5. Identyfikacja izolatów kompleksu *T. mentagrophytes*

Analiza sekwencji genów *T. mentagrophytes* oraz *T. interdigitale*, dostępnych w bazie NCBI, wykazała różnice w sekwencji regionów ITS między tym kompleksem, a pozostałymi gatunkami dermatofitów. W ramach doktoratu, w wyniku dalszej analizy sekwencji tego genu zaprojektowano startery specyficzne dla tego kompleksu (rozdział Metody 4.9).

- TMFor 5' AGG CCG GAG GCT GGC CCC CCA C 3'
- TMRev 5' GCG CGG TCC AGC GTT GAG CCA CTA 3'

W obrębie porównywanych sekwencji nie można zaprojektować starterów, które umożliwiałyby identyfikację gatunkową oddzielnie *T. mentagrophytes* i *T. interdigitale*, dlatego też zaprojektowano test wykrywający DNA kompleksu *T. mentagrophytes*.

(A)

T. interdigitale AB193720
GGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAACGCGC**AGGCCGGAGGCTGGCCCCC**ACGATAGGGCCAAACGT
T. mentagrophytes Z98000
GGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAACGCGC**AGGCCGGAGGCTGGCCCCC**ACGATAGGGCCAAACGT

(B)

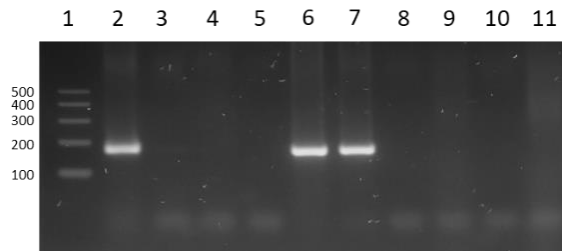
T. interdigitale AB193720 CGGCGAGCCTCTCTTT**TAGTGGCTAAACGCTGGACCGCGCCCGCGGAGGA**
T. mentagrophytes Z98000 CGGCGAGCCTCTCTTT**TAGTGGCTCAACGCTGGACCGCGCCCGCGGAGGA**

Rys 41. Zestawienie porównywanych sekwencji regionu ITS dla gatunków *T. mentagrophytes* oraz *T. interdigitale*, w obrębie których zaprojektowano startery specyficzne dla kompleksu *T. mentagrophytes*. Pogrubieniem zaznaczono obszar, w którym znajduje się sekwencja startera (A) TMFor, (B) TMRev

5.5.1. Gatunkowo-specyficzny PCR

W celu doboru optymalnych warunków przeprowadzono reakcje z DNA następujących izolatów: *T. mentagrophytes*, *T. interdigitale*, *T. tonsurans*, *A. insingulare*, *M. canis*, oraz *E. floccosum*. Reakcje przeprowadzono z użyciem mieszaniny HighGC (rozdział Materiały 3.2.9) a wybór optymalnej temperatury przyłączania starterów rozpoczęto od temperatury 56°C. Profil temperaturowo-czasowy został zaprezentowany w Tabeli 16 (rozdział Metody 4.9.1). Ze względu na powstawanie produktów niespecyficznych w reakcjach z matrycami DNA gatunków *T. tonsurans* oraz *T. rubrum* w tej temperaturze przyłączania starterów, sprawdzano możliwość zastosowania profili temperaturowo-czasowych z wyższymi temperaturami przyłączania starterów. Wybrano profil z temperaturą przyłączania starterów równą 60°C, jako że przy jego zastosowaniu syntezowane były wyłącznie oczekiwane produkty.

Wielkość specyficznego produktu reakcji z DNA izolatów należących do kompleksu *T. mentagrophytes*-specyficznego PCR wynosiła 175 pz. **Pozytywne wyniki uzyskano w reakcjach DNA wszystkich 17 izolatów *T. mentagrophytes* oraz 2 *T. interdigitale*. Natomiast, negatywne wyniki uzyskano w reakcjach DNA pozostałych 26 izolatów dermatofitowych oraz 14 szczepów nie-dermatofitowych.** Przykładowe zdjęcie reprezentujące elektroforegram produktów w 1,5% żelu agarozowym został przedstawiony na Rys 42.

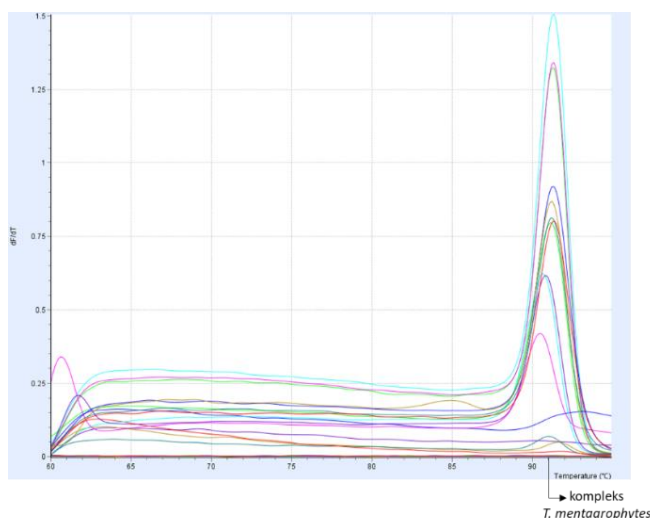


Rys 42. Elektroforegram produktów amplifikacji kompleksu *T. mentagrophytes*. 1 – M 100-500 pz, Produkty PCR uzyskane w reakcji z DNA wyizolowanym z: 2 – *T. interdigitale*, 3 – *T. rubrum*, 4 – *M. canis*, 5 – *M. canis*, 6 – *T. mentagrophytes*, 7 – *T. mentagrophytes*, 8 – *T. terrestris*, 9 – *T. tonsurans*, 10 – *E. floccosum*.

5.5.2. Gatunkowo-specyficzny Real-Time PCR

W celu dobrania optymalnych warunków reakcji przebadano DNA następujących szczepów: *E. floccosum*, *M. canis*, *T. mentagrophytes*, *T. interdigitale*, *T. rubrum*, *A. insingulare* oraz *T. tonsurans*. Reakcje przeprowadzono z użyciem mieszaniny SybrA, a wybór optymalnej temperatury przyłączania starterów rozpoczęto od temperatury 60°C. Temperatura topnienia produktów reakcji w wybranych warunkach (rozdział Metody 4.9.2) wynosiła pomiędzy 90,5 a 91,5°C nie tylko w reakcji z zastosowaniem matrycy DNA gatunków kompleksu *T. mentagrophytes*, ale również z zastosowaniem matrycy DNA izolatów gatunku *T. rubrum*, dlatego też podwyższano temperaturę przyłączania starterów o 2°C. Podwyższenie temperatury topnienia do 68°C nie wyeliminowało tego problemu, dlatego też zastosowano dwustopniową amplifikację z zastosowaniem temperatury 72°C. W wyniku zastosowania tej temperatury uzyskano jedynie produkty reakcji z użyciem matrycy DNA izolatów kompleksu *T. mentagrophytes*.

Pozytywny wynik gatunkowo specyficznym reakcji Real-Time PCR został uzyskany z wykorzystaniem matrycy DNA wszystkich 15 izolatów należących do kompleksu *T. mentagrophytes*, natomiast wynik był ujemny w przypadku matrycy DNA 14 izolatów innych gatunków dermatofitów oraz 14 gatunków innych grzybów aniżeli dermatofity oraz matrycy DNA bakterii (Tabela 27). Reprezentacyjna krzywa topnienia produktów amplifikacji zaprezentowana została na Rys 43.



Rys 43. Krzywa topnienia produktów amplifikacji kompleksu *T. mentagrophytes*-specyficznego Real-Time PCR.

Wyniki PCR oraz Real-Time PCR dla kompleksu *T. mentagrophytes* zebrano w zbiorczej Tabeli 27.

Tabela 27. Wyniki PCR oraz Real-Time PCR dla kompleksu *T. mentagrophytes*

Dermatofity	Kompleks <i>T. mentagrophytes</i> - specyficzny Real-Time PCR		Kompleks <i>T. mentagrophytes</i> -specyficzny PCR
	Liczba próbek, dla których uzyskano wynik pozytywny / liczba próbek poddanych analizie	T _m [°C]	Liczba próbek, dla których uzyskano wynik pozytywny / liczba próbek poddanych analizie
<i>T. mentagrophytes</i>	12/12	-	17/17
<i>T. interdigitale</i>	3/3		2/2
<i>T. rubrum</i>	0/5		0/7
<i>A. insingulare</i>	0/2		0/2
<i>T. tonsurans</i>	0/2		0/2
<i>M. canis</i>	0/3	-	0/13
<i>E. floccosum</i>	0/2		0/2
Nie-dermatofity			
<i>A. charticola</i>	0/1	-	0/1
<i>A. kiliense</i>	0/1	-	0/1
<i>A. alternata</i>	0/1	-	0/1
<i>C. albicans</i>	0/1	-	0/1
<i>C. glabrata</i>	0/1	-	0/1
<i>C. kruzei</i>	0/1	-	0/1
<i>F. culmorum</i>	0/1	-	0/1
<i>F. oxysporum</i>	0/1	-	0/1
<i>M. circinelloides</i>	0/1	-	0/1
<i>M. racemosus</i>	0/1	-	0/1
<i>P. verrucosum</i>	0/1	-	0/1
<i>R. oligosporus</i>	0/1	-	0/1
<i>R. oryzae</i>	0/1	-	0/1
<i>S. brevicaulis</i>	0/1	-	0/1

5.6. Nowa metoda przygotowania DNA bezpośrednio z hodowli z próbek klinicznych reakcji PCR

Wyniki przedstawione w rozdziałach Wyniki 5.1, 5.3, 5.4 oraz 5.5 wskazują, iż w metodzie Real-Time PCR możliwe jest zastosowanie DNA, które znajduje się w lizacie komórkowym. Wyniki te są niezwykle ważne, ponieważ umożliwiają skrócenie czasu uzyskania próbki od pacjenta do wydania wyniku pacjentowi. Jednak metoda opublikowana przez Brillowska-Dąbrowska *et al.*, składa się z dwóch etapów. Jednym z celów doktoratu była modyfikacja już istniejącej lub opracowanie metody, która umożliwi uwolnienie DNA do roztworu w jednym etapie, co znacząco zmniejszyłoby ryzyko kontaminacji i ułatwiłoby wdrożenie diagnostyki molekularnej grzybic powierzchniowej.

5.6.1. Opracowanie metody przygotowania DNA reakcji PCR oraz Real-Time PCR

Ze względu na skuteczność metody przygotowania DNA reakcji PCR opracowanej przez zespół badawczy Brillowskiej-Dąbrowskiej (Brillowska-Dąbrowska *et al.*, 2007) podjęto decyzję o jej modyfikacji mającej na celu zmniejszenie liczby etapów wymagających otwierania próbek w czasie jej stosowania. Badania rozpoczęto od zastosowania w pierwszym etapie buforu A (Brillowska-Dąbrowska *et al.*, 2007) i inkubacji próbki wraz z buforem A przez 10 minut w 95°C. Tak przygotowane DNA można było stosować jedynie bezpośrednio po jego przygotowaniu. Zwrócono uwagę, że wykorzystane w metodzie Brillowskiej-Dąbrowskiej BSA znajdujące się w Buforze B działa jak „antyinhibitor” reakcji PCR. W związku z koniecznością usunięcia inhibicji cząsteczek znajdujących się w pobranych próbkach zastosowano proteinazę K. W procesie sprawdzania możliwości zastosowania proteiny K jako czynnika likwidującego efekt inhibicyjny do izolacji DNA użyto grzybn 3 izolatów *M. canis*, 3 izolatów *T. rubrum* oraz 3 izolatów *T. mentagrophytes*, które hodowane były na płytkach na podłożu Sabouraud.

Czynnikami podlegającymi modyfikacji były:

- stężenie proteiny K,
- czas inkubacji próbek w buforze z proteinazą K,
- temperatura inkubacji próbek w buforze z proteinazą K.

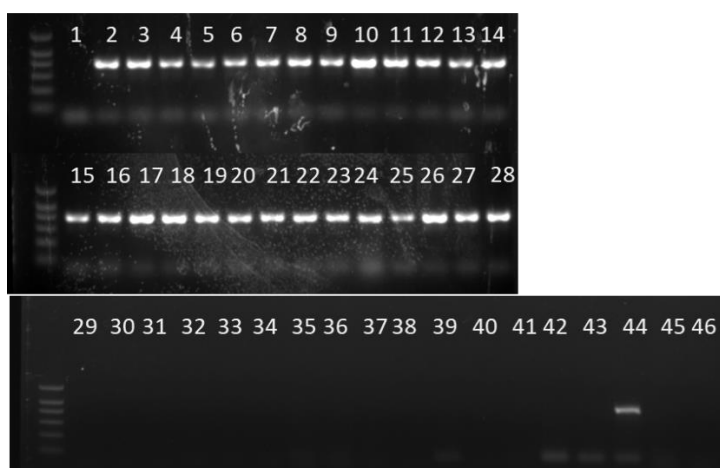
DNA przygotowywano w poniżej opisanych warunkach:

- A. 10 µl proteiny K (20 mg/ml) + 90 µl buforu A – inkubacja 10 min w temperaturze pokojowej – inkubacja 10 min w 95°C,



- B. 20 μ l proteiny K (20 mg/ml) + 80 μ l buforu A – inkubacja 10 min w temperaturze pokojowej – inkubacja 10 min w 95°C,
- C. 10 μ l proteiny K (20 mg/ml) + 90 μ l buforu A – inkubacja 10 min w 56°C,
- D. 20 μ l proteiny K (20 mg/ml) + 80 μ l buforu A – inkubacja 10 min w 56°C.

Równolegle przeprowadzono izolację DNA tych samych izolatów stosując opublikowaną metodę (OM) opracowaną przez Brillowska-Dąbrowska *et al.*, 2007. Natychmiast po przygotowaniu zostało ono wykorzystane w klasycznej reakcji PCR oraz w Real-Time PCR z zastosowaniem starterów wykrywających DNA dermatofitów tzw. starterów pan-dermatofitowych (Brillowska-Dąbrowska *et al.*, 2007). Otrzymane wyniki zostały przedstawione poniżej.



	K-	MC 1	MC 2	MC 3	TR 1	TR 2	TR 3	TM 1	TM 2	TM 3
MP	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A		11	12	13	14	15	16	17	18	19
B		20	21	22	23	24	25	26	27	28
C		29	30	31	32	33	34	35	36	37
D		38	39	40	41	42	43	44	45	46

Rys 44. Wyniki reakcji PCR wykrywającej pan-dermatofitowe DNA z zastosowaniem matryc DNA wyizolowanych testowanymi wariantami nowej metody oraz metodą porównawczą (MP) jako kontrolą. Litery A-D wskazują na użytą ilość proteiny oraz parametry warunków inkubacji próbki.

Poniżej przedstawiono wyniki reakcji Real-Time PCR wykrywającej pan-dermatofitowe DNA.

Tabela 28. Temperatury topnienia produktów reakcji Real-Time PCR wykrywającej pan-dermatofitowe DNA z zastosowaniem matryc DNA wyizolowanych testowanymi wariantami nowej metody oraz metodą opublikowaną jako kontrolą (litery A-D wskazują na użytą ilość proteiny oraz parametry warunków inkubacji próbki)

[C]	K-	MC 1	MC 2	MC 3	TR 1	TR 2	TR 3	TM 1	TM 2	TM 3
MP	-	91.35	91.29	91.29	87.04	87.29	87.07	88.31	88.09	88.25
A	-	91.46	91.18	91.11	86.88	86.87	87.24	87.78	87.76	87.80
B	-	91.10	91.18	91.09	87.15	87.34	87.19	87.95	87.90	-
C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	87.92
D	-	91.30	-	91.90	-	87.22	-	88.05	-	88.39

W klasycznej reakcji PCR uzyskano 100% pozytywnych wyników zarówno w przypadku wariantu A, jak i B. Natomiast w przypadku wariantu C i D nie uzyskano pozytywnych wyników. W reakcji Real-Time PCR 100% pozytywnych wyników uzyskano dla wariantu A, w wariacie B negatywny wynik pojawił się przy zastosowaniu matrycy DNA oznaczonej jako TM 3, natomiast w wariacie C uzyskano tylko jeden pozytywny wynik, a wariacie D 5 z 9. **W związku z powyższym do dalszego testowania wybrano następujący protokół przygotowania DNA:**

- przygotować bufor ekstrakcyjny (60 mM NaHCO₃, 250 mM KCl and 50 mM Tris, pH 9,5) zawierający 10% proteiny K (20mg/ml),
- do próbki typu Eppendorf z fragmentem grzybni dodać 200 µl buforu ekstrakcyjnego,
- 10 min inkubować w temperaturze pokojowej,
- 10 min inkubować w temperaturze 95°C,
- mieszać za pomocą wortexu przez 5 s,
- przechowywać do dalszej analizy w 4°C.

5.6.2. PCR oraz Real-Time PCR z zastosowaniem DNA wyizolowanego nową metodą

W celu sprawdzenia czy DNA otrzymane nową metodą izolacji może być stosowane do izolacji DNA dermatofitów przeprowadzono DNA 111 szczepów i zastosowano je reakcji PCR oraz Real-Time PCR z użyciem starterów wykrywających DNA dermatofitów. Zbiorcze wyniki zostały zaprezentowane w Tabeli 29.

Tabela 29. Zbiorcze wyniki PCR oraz Real-Time PCR z użyciem starterów wykrywających dermatofitowe DNA przy zastosowaniu DNA przygotowanego nową metodą

	PCR	Real-Time PCR
Badane szczepy	111/111	111/111
<i>M. canis</i>	37/37	37/37
<i>T. rubrum</i>	37/37	37/37
<i>T. mentagrophytes</i>	37/37	37/37

Specyficzne produkty PCR zostały uzyskane dla wszystkich 37 szczepów *M. canis*, wszystkich 37 szczepów *T. mentagrophytes* oraz wszystkich 37 szczepów *M. canis*. W przypadku Real-Time PCR temperatura topnienia specyficznych produktów wynosiła pomiędzy 87 a 92°C. W odniesieniu do badanej grupy izolatów, nową metodą izolacji DNA, może być stosowana skutecznie zarówno w PCR jak również w Real-Time PCR.

5.6.3. Stabilność DNA wyizolowanego nową metodą

W celu sprawdzenia stabilności przygotowano DNA nową metodą (tj. metodą opracowaną w tej pracy) oraz metodą opublikowaną (Brillowska-Dąbrowska *et al.*, 2007). Mieszaniny zawierające DNA wykorzystano w reakcjach PCR oraz Real-Time PCR od razu po przeprowadzeniu izolacji.

Reszta mieszanin była przechowywana w 4°C. Kolejne reakcje PCR oraz Real-Time PCR zostały przeprowadzone po 28 dniach, oraz po 3 i 6 miesiącach. Zbiorcze wyniki zaprezentowano w Tabeli 30.

Tabela 30. Zestawienie wyników reakcji PCR oraz Real-Time PCR z zastosowaniem DNA wyizolowanego nową i opublikowaną metodą natychmiast po izolacji DNA oraz po 28 dniach, 3 i 6 miesiącach po jego izolacji.

Czas po przygotowaniu DNA	Natychmiast				Po 28 dniach				Po 3 miesiącach				Po 6 miesiącach			
	PCR		RT PCR		PCR		RT PCR		PCR		RT PCR		PCR		RT PCR	
Reakcja Zastosowana metoda	OM	NM	OM	NM	OM	NM	OM	NM	OM	NM	OM	NM	OM	NM	OM	NM
Liczba uzyskanych wyników pozytywnych	18	18	18	18	15	17	18	18	13	17	17	11	13	16	9	11
<i>M. canis</i>	6	6	6	6	6	6	6	6	5	6	6	4	4	5	2	4
<i>T. mentagrophytes</i>	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	4	6	6	6	4
<i>T. rubrum</i>	6	6	6	6	3	5	6	6	2	5	5	3	3	5	1	3

OM - opublikowana metoda

NM - nowa metoda

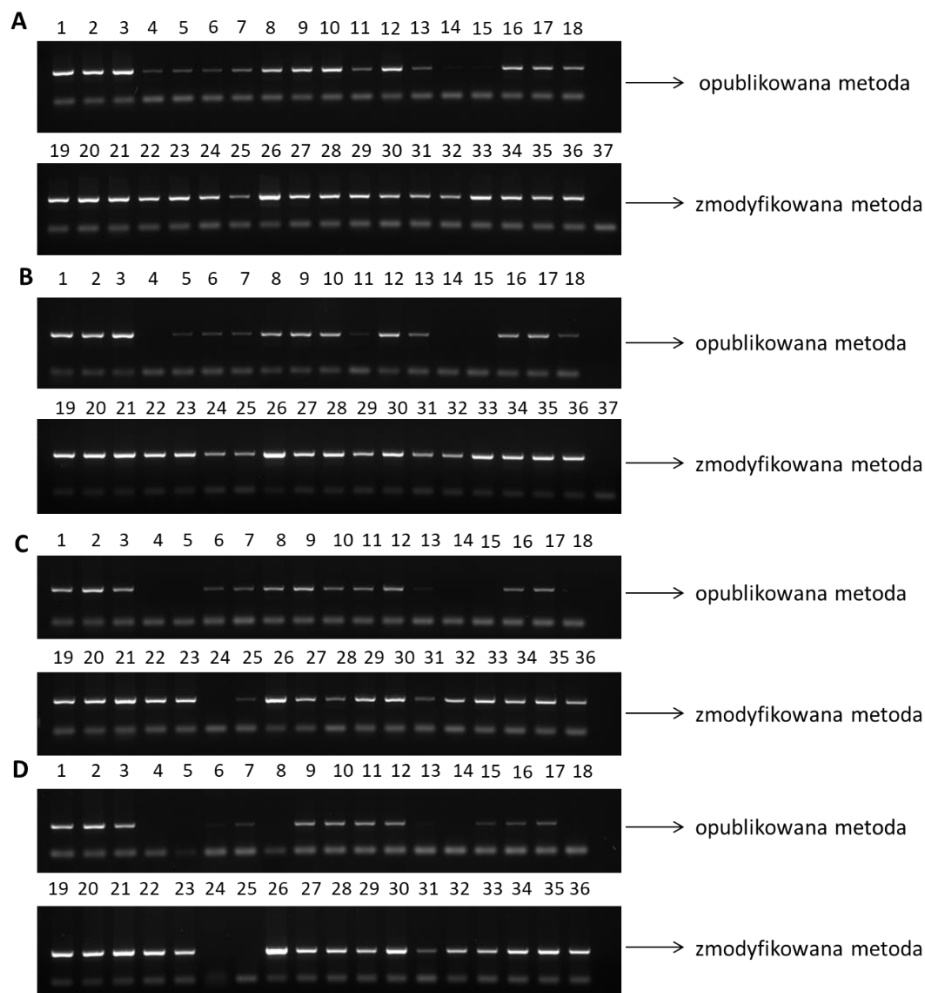
Natychmiast po izolacji w obu metodach uzyskano wyniki w 100% reakcji zarówno w przypadku PCR (Rys 45 A) jak i Real-Time PCR.

Po 28 dniach, w reakcji PCR, w której zastosowano DNA przygotowane opublikowaną metodą uzyskano pozytywne wyniki dla 15 z 18 próbek DNA, podczas gdy w przypadku DNA wyizolowanego nową metodą pozytywne wyniki uzyskano dla 17 z 18 próbek DNA (Rys 45 B). W Real-Time PCR z zastosowaniem DNA przygotowanego opublikowaną poprzednią metodą, jak i nową metodą uzyskano pozytywne wyniki dla wszystkich 18 próbek DNA.

Po 3 miesiącach, w PCR w którym zastosowano DNA przygotowanego opublikowaną metodą uzyskano pozytywne wyniki dla 13 z 18 próbek DNA, podczas gdy w przypadku DNA przygotowanego nową metodą pozytywne wyniki uzyskano dla 17 z 18 próbek DNA (Rys 45 C). W Real-Time PCR z zastosowaniem DNA przygotowanym opublikowaną metodą pozytywne wyniki uzyskano dla 17 z 18 próbek DNA, natomiast w przypadku DNA przygotowanego nową metodą pozytywne wyniki uzyskano dla 11 z 18 próbek DNA.

Po 6 miesiącach, w PCR w którym stosowano DNA przygotowane poprzednią metodą uzyskano pozytywne wyniki dla 13 z 18 próbek DNA, podczas gdy w przypadku DNA przygotowanego zmodyfikowaną metodą pozytywne wyniki uzyskano dla 16 z 18 próbek DNA (Rys 45 D). W Real-Time PCR z zastosowaniem DNA przygotowanego opublikowaną metodą pozytywne wyniki uzyskano dla 9 z 18 próbek DNA, natomiast w przypadku DNA wyizolowanego nową metodą pozytywne wyniki uzyskano dla 11 z 18 próbek DNA.





Rys 45. Porównanie stabilności DNA przygotowanego opublikowaną (starą) metodą (próbki 1-18) z DNA przygotowanego nową metodą (próbki 19-36). Próbki 1, 2, 3, 10, 11, 12, 19, 20, 21 gatunek *T. mentagrophytes*, próbki 4, 5, 6, 13, 14, 15, 22, 23, 24, 31, 32, 33 gatunek *T. rubrum*, próbki 7, 8, 9, 16, 17, 18, 25, 26, 27, 34, 35, 36 gatunek *M. canis*, 37 – kontrola negatywna. PCR wykonany

(A) natychmiast, (B) 28 dni, (C) 3 miesiące oraz (D) 6 miesięcy po izolacji DNA.

Podsumowując, DNA przygotowanego reakcji PCR i Real-Time PCR z użyciem nowej metody jest stabilniejsze niż DNA przygotowanego opublikowaną dwuetapową metodą.

5.7. Wstępne sprawdzenie użyteczności testu na próbkach klinicznych

Izolacja DNA, bezpośrednio z próbek klinicznych została przeprowadzona nową metodą opracowaną w ramach niniejszej pracy (rozdział Metody 4.10). Spis próbek, wraz z opisem skąd zostały pobrane, zostały przedstawiony w Tabeli 31. Pierwszym testem, który został wykonany z wykorzystaniem matryc DNA pozyskanych bezpośrednio z próbek klinicznych był pan-dermatofitowy Real-Time PCR (rozdział Metody 4.3). Uzyskane temperatury topnienia produktów

amplifikacji mieściły się w zakresie od 87 do 88°C, dlatego też następnym etapem było przeprowadzenie *T. rubrum*-specyficznego Real-Time PCR (rozdział Metody 4.6).

Tabela 31. Zestawienie wyników pan-dermatofitowego Real-Time PCR oraz *T. rubrum*-specyficznego Real-Time PCR z wykorzystaniem matryc DNA uzyskanych bezpośrednio z próbek klinicznych

	Miejsce pobrania	panDerm	<i>T. rubrum</i> -specyficzny	klasyczne metody
1	paznokcie stóp	-	-	-
2	paznokcie stóp	-	-	-
3	paznokcie stóp	-	-	-
4	paznokcie stóp	-	-	-
5	paznokcie stóp	-	-	-
6	paznokcie stóp	-	-	-
7	paznokcie stóp	87.43	91.68	<i>T. rubrum</i>
8	paznokcie stóp	87.62	92.02	<i>T. rubrum</i>
9	paznokcie stóp	-	-	-
10	paznokcie stóp	-	-	-
11	paznokcie stóp	-	-	-
12	paznokcie stóp	-	-	-
13	paznokcie dłoni	-	-	-
14	paznokcie stóp	87.26	91.64	<i>T. rubrum</i>
15	paznokcie stóp	-	-	-
16	paznokcie stóp	87.32	91.18	<i>T. rubrum</i>
17	paznokcie stóp	-	-	-
18	skóra tułowia	-	-	-
19	paznokcie stóp	-	-	-
20	paznokcie stóp	-	-	-
21	paznokcie stóp	-	-	-

Pozytywny wynik reakcji Real-Time PCR z wykorzystaniem starterów pan-dermatofitowych został uzyskany dla 4 próbek, które zawierały DNA uzyskane bezpośrednio z próbek klinicznych. Dla tych samych próbek uzyskano pozytywny wynik w reakcji Real-Time PCR z zastosowaniem starterów *T. rubrum*-specyficznych. Ilość przebadanych próbek klinicznych jest zbyt mała by stwierdzić skuteczność w pracy z materiałem klinicznym, aczkolwiek wyniki te są obiecujące.

6. Dyskusja

Głównym czynnikiem limitującym rozpowszechnienie diagnostyki dermatofitoz opartej na obserwacjach mikro- i makroskopowych jest czas. Przy zastosowaniu metod klasycznych od momentu pobrania próbki do wydania wyniku mija od 4 do 6 tygodni. Ponadto istotnym ograniczeniem, tego rodzaju diagnostyki jest niska skuteczność - 40% przypadków, które wcześniej w badaniach mikroskopowych zostały uznane za pozytywne, jest ujemnych (Petrini i von Rosen, 2002; Weinberg *et al.*, 2003). Nie zawsze jednak wyniki te można nazwać fałszywie dodatnimi, jako że brak możliwości wyhodowania izolatów z próbek może być spowodowany stosowaniem przez pacjentów środków przeciwrzybiczych. Wyniki fałszywie ujemne, uzyskane w bezpośrednich badaniach mikroskopowych próbek klinicznych, dotyczą 5 do 15% przypadków (Gentles, 1971; Singh *et al.*, 2003). Rozwiązaniem niedoskonałości diagnostyki dermatofitoz jest wprowadzenie molekularnych metod diagnostycznych. W publikacji Brillowska-Dąbrowska *et al.*, zaobserwowano aż 10% wzrost próbek zidentyfikowanych metodami molekularnymi – 45 próbek pozytywnych uzyskano metodami klasycznymi, podczas gdy metodami molekularnymi zidentyfikowano aż 50 próbek. Dodatkowo warto wspomnieć, iż prawie dwukrotnie wzrosła ilość próbek zidentyfikowanych do poziomu gatunku. Wynika to z faktu, iż wiele próbek było identyfikowalnych jako pozytywne pod mikroskopem, ale negatywne w hodowli umożliwiającej w dalszych etapach diagnostykę do poziomu gatunku (Brillowska-Dąbrowska *et al.*, 2007). Metody te pozwalają na skrócenie czasu diagnozy, zmniejszają koszty oraz odznaczają się wysoką specyficnością. Jednakże, mimo licznych zalet molekularnych metod diagnostycznych, wciąż jest niewiele dostępnych klinicznie użytecznych testów, które się na nich opierają. Spowodowane jest to wieloma czynnikami. Jedną z pierwszych napotykanymi trudności w diagnostyce molekularnej jest metoda pozyskiwania DNA, która jest niewątpliwie czynnikiem limitującym. Bardzo często metody izolacji DNA wymagają wcześniejszej hodowli, jak również są wieloetapowe (Garg *et al.*, 2009; Litz i Cavagnolo, 2010; Berk *et al.*, 2011; Bergman *et al.*, 2013; Miyajima *et al.*, 2013) lub też wymagają specjalistycznego sprzętu, który nie jest dostępny w małych laboratoriach (Wisselink *et al.*, 2011).

W trakcie realizacji niniejszego doktoratu wykazałam możliwość zastosowania DNA uzyskanego przez użycie dwuetapowej metody przygotowania DNA opisanej wcześniej (Brillowska-Dąbrowska *et al.*, 2007) w reakcji Real-Time PCR. Nieczasochłonna metoda przygotowania DNA bezpośrednio z próbki klinicznej, które może być wykorzystane w Real-Time PCR jest niezwykle istotna, ponieważ znacznie skraca czas od pobrania próbki do identyfikacji, pozwalając na przeprowadzenie całej procedury w ciągu jednego dnia roboczego. Dodatkowo, nie wymaga ona zastosowania żadnej kosztownej aparatury ani drogich odczynników. W związku z tym może być zastosowana nawet w małych laboratoriach diagnostycznych, w których nie ma miejsca na



wydzielenie osobnego pomieszczenia na sprawdzanie wyników klasycznej reakcji PCR. Zastosowanie reakcji Real-Time PCR charakteryzuje się zaletami w stosunku do konwencjonalnego PCR, które są niezwykle istotne, szczególnie w przypadku rutynowej pracy laboratoryjnej, która jest wykonywana w 8-godzinnych ramach czasowych. Jednym z nich jest skrócenie czasu analizy. Można przyjąć, że pojedyncza reakcja identyfikująca oparta na Real-Time PCR zajmuje 1 godzinę, podczas gdy na konwencjonalnym PCR zajmuje do dwóch godzin. Dodatkowo, w przypadku Real-Time PCR wynik uzyskiwany jest natychmiast po zakończeniu analizy, co umożliwia zakończenie diagnozy w ciągu jednego dnia roboczego, podczas gdy przeprowadzenie klasycznego PCR wymaga wykonania elektroforezy po zakończeniu reakcji, która powinna być przeprowadzona w osobnym pomieszczeniu, jako że niesie ze sobą ryzyko kontaminacji. Ze względu na powyższe zalety oraz możliwość zastosowania DNA uzyskanego szybką metodą izolacji (Brillowska-Dąbrowska *et al.*, 2007), w niniejszej pracy zastosowano technikę Real-Time PCR w celu opracowania testu, który umożliwi szybką i specyficzną diagnostykę dermatofitów.

Podstawowym pytaniem, na które należy odpowiedzieć przy identyfikacji gatunkowej czynników etiologicznych wywołujących zmiany powierzchniowe, jest stwierdzenie czy odpowiadają za nie mikroorganizmy należące do grupy dermatofitów, dlatego w pierwszej reakcji opracowywanego testu zastosowano opisane wcześniej startery wykrywające DNA wszystkich gatunków dermatofitów (Brillowska-Dąbrowska *et al.*, 2007). Reakcja ta jest kluczowa w diagnostyce dermatofitów, jako że wynik fałszywie ujemny powoduje odrzucenie danej próbki w algorytmie identyfikacji. W trakcie prowadzenia badań zaobserwowano, iż temperatury topnienia produktów reakcji są charakterystyczne dla danego rodzaju dermatofitów. Dla produktów reakcji, które zostały uzyskane przy zastosowaniu matryc DNA rodzajów *Epidermophyton* oraz *Trichophyton* temperatura ta wynosiła pomiędzy 87 a 89°C, a dla produktów reakcji, uzyskanych przy zastosowaniu matryc DNA rodzaju *Microsporum* pomiędzy 92 a 93°C. Jednakże, w przypadku 15 izolatów z rodzaju *Microsporum* temperatura ta wynosiła pomiędzy 87 a 89°C, a dla 15 izolatów nie uzyskano żadnych produktów reakcji. Ponieważ wyniki te mogły wskazywać, na różnice w genotypach tych izolatów przeprowadzono genotypowanie wybranych z nich. W tym miejscu warto wspomnieć, iż nie wszystkie laboratoria diagnostyczne wyposażone są w sekwenator, w takiej sytuacji przydatne są właśnie metody genotypowania, które umożliwiają potwierdzenie wyników szczególnie w sytuacjach, w których nie ma zgodności wyników diagnostyki z obrazem klinicznym. W wyniku genotypowania uzyskano profile elektroforetyczne, które umożliwiły wyodrębnienie 6-różnych genotypów. Ponieważ gatunek *M. canis* jest opisywany jako mikroorganizm posiadający genom o wysokim stopniu zakonserwowania (Faggi *et al.*, 2001, Brillhante *et al.*, 2005, Leibner-Ciszak *et al.*, 2010), przeprowadzono sekwencjonowanie fragmentów ITS1 i ITS4 DNA. Analiza



wyników sekwencjonowania wykazała, iż izolaty dla których temperatura topnienia produktów amplifikacji wynosiła pomiędzy 87 a 89°C nie należą do rodzaju *Microsporium*, a do rodzaju *Trichiphyton*. Opisana tutaj rozbieżność wyników uzyskanych z zastosowaniem obserwacji mikro- i makroskopowych i metod molekularnych jest zjawiskiem występującym dość często w przypadku stosowania diagnostyki konwencjonalnej.

Startery pan-dermatofitowe zastosowane w Real-Time PCR umożliwiły 100% detekcję DNA dermatofitów wyizolowanych z czystych hodowli oraz wstępne odróżnienie rodzaju *Microsporium*. Po raz pierwszy zastosowano matryce DNA wyizolowane szybką metodą (Brillowska-Dąbrowska *et al.*, 2007) w teście opartym o technikę Real-Time PCR, co umożliwiło znaczne skrócenie czasu analizy.

Jednym z najczęściej spotykanych patogenów powodujących powierzchniowe grzybice skóry jest *T. rubrum*. Dostępny jest komercyjnie test wykorzystujący reakcję PCR, który umożliwia identyfikację DNA tego patogenu w próbkach klinicznych (Brillowska-Dąbrowska, *et al.*, 2007). W niniejszej pracy potwierdzono możliwość wykorzystania starterów z wyżej wymienionej pracy w teście opartym na technice Real-Time PCR (Brillowska-Dąbrowska, *et al.*, 2007). Umożliwił on skrócenie czasu wymaganego do uzyskania wyniku, jako że konwencjonalny PCR, dla którego niezbędna jest elektroforetyczna detekcja produktów PCR wymaga 3 godzin, podczas gdy reakcja Real-Time PCR zajmuje tylko 1 godzinę. W odniesieniu do badanej grupy izolatów potwierdzono 100% specyficzność tego testu.

Kolejnym bardzo często spotykanym patogenem powodującym dermatofitozy jest gatunek *M. canis* (de Costa *et al.*, 2013), który wraz z gatunkami *M. audouinii* oraz *M. ferrugineum* należy do kompleksu *A. otae*. *M. canis* jest kosmopolitycznym gatunkiem zoofilnym, w przypadku którego transmisja, może nastąpić na człowieka. Jest to patogen powodujący bardzo często infekcje u dzieci (Sharma *et al.*, 2007, Reys *et al.*, 2011). Gatunki *M. audouinii* oraz *M. ferrugineum* są gatunkami antropofilnymi, które występują w różnych szerokościach geograficznych. *M. audouinii* spotykany jest zazwyczaj w Europie oraz Afryce, a *M. ferrugineum* w Azji (Reys *et al.*, 2011). Mimo iż gatunki te leczone są tymi samymi antymikotykami, stworzenie testu, który odróżni gatunki należące do tego kompleksu jest niezwykle istotne dla ustalenia źródła zakażenia i ryzyka przeniesienia. W niniejszej pracy stworzone zostały dwa testy, które umożliwiły identyfikację tych klinicznie istotnych gatunków. Zaprojektowano startery, które wykorzystwały różnice w sekwencji genu β -tubuliny, jednakże sekwencje *M. audouinii* oraz *M. ferrugineum* są identyczne w pozycjach polimorfizmów zidentyfikowanych między *M. canis* i *M. audouinii*, dlatego też nie było możliwości zaprojektowania starterów, które rozróżniałyby wszystkie trzy gatunki. W zaprezentowanym teście uzyskano 100%



specyficzność dla starterów zaprojektowanych do wykrywania DNA *M. canis* i *M. audouinii*/*M. ferrugineum* zarówno w tradycyjnej reakcji PCR i Real-Time PCR. Pomimo braku możliwości odróżnienia dwóch gatunków antropofilnych, zastosowanie tego testu w połączeniu z testem specyficznym dla gatunku *M. canis* stanowi użyteczne narzędzie do kontroli rozprzestrzeniania się infekcji wywołanych przez *M. canis*, *M. audouinii* i *M. ferrugineum* i może poprawić wynik leczenia, znacząco skracając czas między pobraniem próbki a diagnozą.

Gatunkiem, który również zasługuje na uwagę jest jedyny reprezentant rodzaju *Epidermophyton*, występujący w ciepłym klimacie. Jest on głównym czynnikiem powodującym aż 80% wszystkich dermatofitowych pieluszkowych zapaleń skóry (Kahana *et al.*, 1987, Bonifaz *et al.*, 2016). W niniejszej pracy opracowano startery, które umożliwiają identyfikację *E. floccosum* z zastosowaniem DNA wyizolowanego szybką metodą (Brillowska-Dąbrowska *et al.*, 2010) z czystych kultur. Produkt PCR o temperaturze topnienia 89-89,5°C wskazuje na obecność DNA *E. floccosum* w badanej próbce. Specyficzność opracowanej tradycyjnej reakcji PCR jak również Real-Time PCR z użyciem tych starterów określono jako 100%.

Ze względu na toczącą się debatę dotyczącą kompleksu *T. mentagrophytes* (w kontekście rozróżnienia od *T. interdigitale*) została podjęta próba stworzenia testu, który umożliwiłby odróżnienie tych dwóch gatunków od siebie. Stworzenie takiego testu byłoby niezwykle istotne z uwagi na fakt, iż oba te gatunki (bądź warianty) odróżnia źródło zakażenia - *T. interdigitale* jest uważany za gatunek antropofilny, podczas gdy *T. mentagrophytes* za gatunek zoofilny. Do kompleksu określanego mianem *Trichophyton mentagrophytes* należą również gatunki *T. erinacei*, *T. quinckeanum* oraz *T. benhamie* (Frías De León G *et al.*, 2020). Ze względu na częstotliwość występowania poszczególnych gatunków/wariantów podjęto pracę jedynie nad gatunkami *T. mentagrophytes* oraz *T. interdigitale*. Pojawiające się w literaturze informacje dotyczące identyfikacji obu gatunków wskazują na bardzo dużą potrzebę stworzenia testu, które odróżniałyby od siebie te dwa najbardziej rozpowszechnione gatunki kompleksu (Nenoff *et al.*, 2019, Chowdhary *et al.*, 2019). W praktyce klinicznej często izolaty produkujące aksamitne kolonie uzyskiwane z próbek pobranych ze stopy uznawane są za *T. interdigitale*, natomiast pudrowate izolaty, bez względu na miejsce pochodzenia uznawane są za *T. mentagrophytes* (Symoens *et al.*, 2011). Metoda ta jednak może okazać się niewystarczająca do odróżnienia *T. mentagrophytes* od pozostałych gatunków (Frías De León G *et al.*, 2020). W czasie realizacji niniejszej pracy opracowano liczne startery w miejscach występowania polimorfizmu, jednakże nie udało się opracować testu, który umożliwiłby odróżnienie tych gatunków. Z uwagi na brak komercyjnie dostępnego testu z prostą i efektywną metodą izolacji DNA służącego do wykrywania DNA kompleksu *T. mentagrophytes* stworzono taki test. Zaprojektowano startery w obrębie regionu ITS, specyficzne dla tego kompleksu.

W zaprezentowanym teście uzyskano 100% specyficzność reakcji z użyciem opracowanych starterów zaprojektowanych do wykrywania DNA *T. mentagrophytes* oraz *T. interdigitale* zarówno w tradycyjnej reakcji PCR jak i Real-Time PCR. Dalsze badania nad stworzeniem testu, a zatem poszukiwaniem nowego celu molekularnego, który odróżniałby te dwa gatunki są niezwykle istotne i powinny zostać podjęte w następnych etapach pracy nad stworzeniem uniwersalnego testu do wykrywania i identyfikacji dermatofitów. Badania takie wymagają zebrania jak największej ilości izolatów klinicznych, najlepiej z różnych miejsc, gdyż nie można wykluczyć, iż ich identyfikacja gatunkowa przeprowadzona z użyciem konwencjonalnych narzędzi nie jest bezbłędna.

Niewątpliwie możliwość zastosowania DNA uzyskanego szybką metodą opracowaną przez Brillowska-Dąbrowska *et al.*, 2007 w reakcji Real-Time PCR jest punktem przełomowym w diagnostyce dermatofitoz. Nie tylko znacznie skraca czas od momentu pobrania próbki od pacjenta do wydania diagnozy, ale również obniża koszty identyfikacji i zmniejsza ryzyko kontaminacji. W niniejszej pracy udoskonalono tę metodę poprzez redukcję dwóch etapów koniecznych do pozyskania DNA bezpośrednio z próbki klinicznej do jednego. Zastosowanie proteiny K w połączeniu z działaniem wysokiej temperatury, dało oczekiwany wynik. W celu oceny użyteczności DNA uzyskanego metodą opracowaną w tej pracy przeprowadzono izolację DNA ze 111 izolatów dermatofitów – *M. canis* (37), *T. mentagrophytes* (37) oraz *T. rubrum* (37). Następnie tak uzyskane DNA zastosowano w reakcjach PCR oraz Real-Time PCR. Przy zastosowaniu obu metod uzyskano 100% specyficzność. Jednakże, aby ocenić użyteczność tak otrzymanego DNA należało również sprawdzić jego stabilność oraz porównać ją ze stabilnością DNA uzyskanego z użyciem opublikowanej wcześniej metody (Brillowska-Dąbrowska *et al.*, 2007). W tym celu przeprowadzono izolację DNA obiema metodami. Następnie tak otrzymane DNA zastosowano w reakcjach PCR oraz Real-Time PCR natychmiast po izolacji, po 28 dniach oraz po 3 i 6 miesiącach. W przypadku reakcji z DNA natychmiast po jego izolacji w obu metodach uzyskano 100% wyników pozytywnych. W reakcji z DNA 28 dni po jego izolacji dla Real-Time PCR uzyskano 100% wyników pozytywnych przy zastosowaniu DNA uzyskanego obiema metodami, natomiast w klasycznej reakcji PCR uzyskano rozbieżne wyniki. Stwierdzono, że przechowywanie DNA dłużej niż 28 dni wpływa negatywnie na wyniki reakcji przeprowadzonych z jego użyciem.

Dopełnieniem niniejszej pracy było zbadanie próbek klinicznych, pobranych od pacjentów, u których podejrzewana była powierzchniowa infekcja grzybicza. Izolacja DNA została przeprowadzona bezpośrednio z próbek klinicznych nową metodą opracowaną w ramach doktoratu. Następnie przeprowadzono pan-dermatofitową reakcję Real-Time PCR. Z 21 próbek, wynik pozytywny uzyskano dla 4 z nich. Dla tych samych matryc DNA uzyskano pozytywny wynik



z zastosowaniem starterów *T. rubrum*-specyficznych. Wyniki te świadczą o tym, iż test opracowany w ramach tego doktoratu ma potencjał do bycia stosowanym w rutynowej pracy laboratoryjnej.

W tym miejscu warto również wspomnieć, iż wyniki uzyskane przy genotypowaniu gatunku *M. canis* były bardzo interesujące, dlatego też przeprowadzono badania nad zmiennością genetyczną innych gatunków, które znajdują się w kolekcji Katedry Biotechnologii Molekularnej i Mikrobiologii Wydziału Chemicznego Politechniki Gdańskiej.

Jednym z gatunków, którego przeprowadzono metodą RAPD był *E. floccosum*. W badaniu zastosowano 3 różne startery, 2 z nich wykazały, iż 3 szczepy wykazywały niewielkie różnice w profilach elektroforetycznych, mogące świadczyć o tym, iż izolaty te wykazują inne genotypy. Podjęto się również sprawdzenia zmienności genetycznej gatunku *T. rubrum*. Wyniki uzyskane w wyniku tego genotypowania były bardzo interesujące, ponieważ jeden szczep wykazywał zupełnie inny profil elektroforetyczny od pozostałych, jednakże zarówno w reakcji Real-Time PCR ze starterami panDerm wykazywał wynik pozytywny potwierdzając, iż szczep ten należy do dermatofitów, jak i w reakcji Real-Time PCR ze starterami specyficznymi dla gatunku *T. rubrum* dawał wynik pozytywny. Przeprowadzono sekwencjonowanie fragmentu regionu rDNA tego izolatu, a uzyskane wyniki wskazywały, iż jest to izolat skontaminowany izolatem *Candida albicans*. Izolat ten został odrzucony z dalszej analizy, jednakże wynik ten jest niezmiernie istotny, ponieważ może wskazywać, iż nawet w infekcjach mieszanych metoda Real-Time PCR może być użyteczna. Kolejnym gatunkiem, którego genotypowanie zostało przeprowadzone był gatunek *T. mentagrophytes* i tu uzyskane wyniki również były bardzo interesujące. Jeden z 26 przebadanych izolatów wykazywał odmienny profil elektroforetyczny. Przeprowadzono sekwencjonowanie fragmentu rDNA tego szczepu. Wyniki sekwencjonowania wykazały, iż izolat ten należy do gatunku *T. mentagrophytes*, co w późniejszym etapie pracy zostało potwierdzone w reakcjach PCR oraz Real-Time PCR. Wynik ten potwierdza, iż genotypowanie jest metodą niewystarczającą do określenia przynależności badanego izolatu do danego gatunku, a jest jedynie metodą uzupełniającą inne metody diagnostyczne.

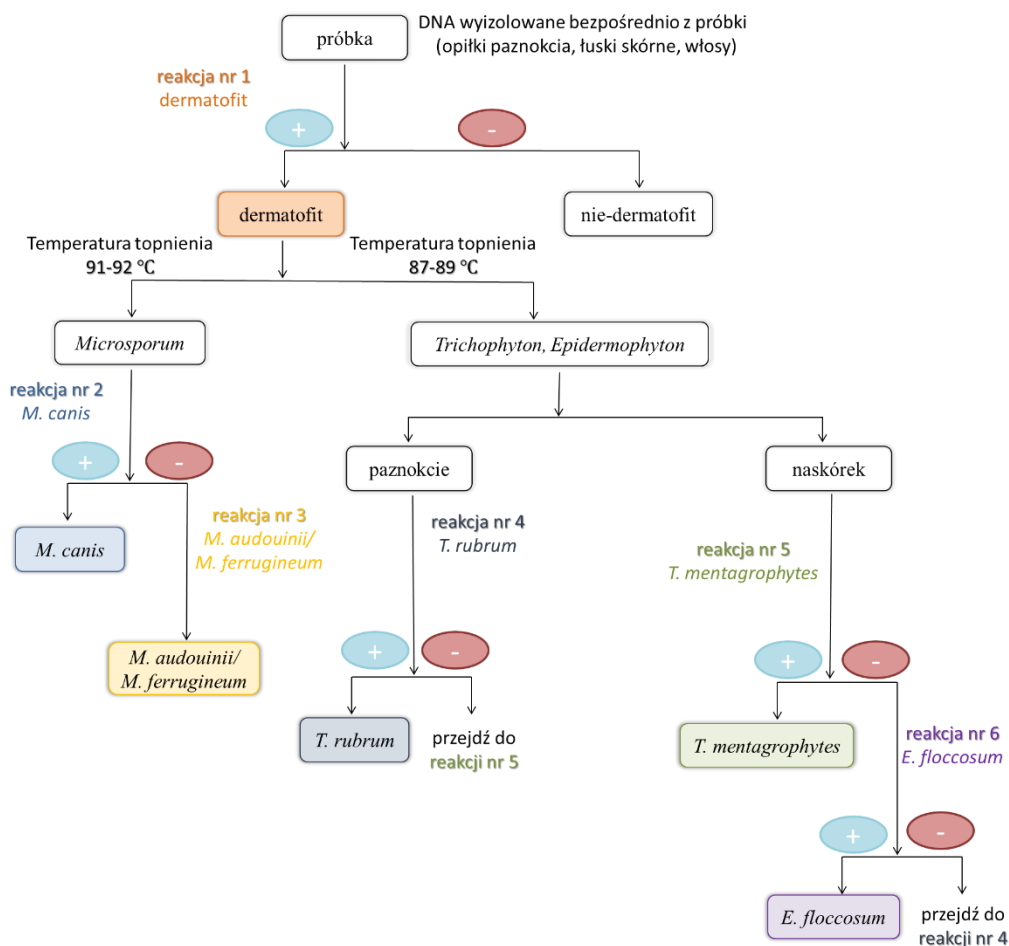
Diagnostyka molekularna zakażeń powodowanych przez dermatofity nie jest wprowadzona w Polsce do rutynowej diagnostyki dermatofitoz ludzi, jednakże opracowany test – począwszy od przygotowania DNA reakcji identyfikujących jest doskonałym punktem, od którego można zacząć pracę nad wdrożeniem molekularnej diagnostyki dermatofitoz do rutynowej pracy laboratoryjnej.



7. Podsumowanie

W ramach niniejszej pracy doktorskiej zrealizowano zamierzenia badawcze, które zaowocowały stworzeniem algorytmu identyfikacji dermatofitów.

ALGORYTYM



Stworzenie algorytmu było możliwe dzięki:

1. wykazaniu, po raz pierwszy, możliwości zastosowania DNA przygotowanego dwuetapową metodą opisaną wcześniej (Brillowska-Dąbrowska *et al.*, 2007) w reakcji Real-Time PCR;
2. opracowaniu nowej enzymatycznej metody przygotowania DNA bezpośrednio z hodowli oraz próbek klinicznych mającej zastosowanie w reakcjach PCR oraz Real-Time PCR
3. opracowaniu algorytmu identyfikacji gatunkowej dermatofitów wraz z jego poszczególnymi etapami:

- a. opracowaniu protokołu wykorzystania układu Real-Time PCR wykrywającego wszystkie dermatofity ze wstępnym odróżnieniem rodzaju *Microsporum* z zastosowaniem opublikowanych wcześniej starterów (Brillowska-Dąbrowska *et al.*, 2007);
 - b. opracowaniu protokołu wykorzystania układu Real-Time PCR wykrywającego gatunek *T. rubrum* z zastosowaniem starterów wcześniej opublikowanych (Brillowska-Dąbrowska *et al.*, 2007) stosując DNA wyizolowane opublikowaną metodą (Brillowska-Dąbrowska *et al.*, 2007);
 - c. zaprojektowaniu starterów umożliwiających specyficzną identyfikację gatunku *E. floccosum* oraz opracowaniu protokołu wykorzystania układów PCR oraz Real-Time PCR wykrywających gatunek *E. floccosum* stosując DNA wyizolowane opublikowaną metodą (Brillowska-Dąbrowska *et al.*, 2007);
 - d. zaprojektowaniu starterów umożliwiających specyficzną identyfikację gatunków należących do kompleksu *M. otae*, opracowaniu protokołu wykorzystującego układy PCR oraz Real-Time PCR wykrywającego specyficznie gatunek *M. canis* oraz protokołu wykorzystującego układy PCR oraz Real-Time PCR wykrywającego specyficznie gatunki *M. audouinii* oraz *M. ferrugineum* stosując DNA wyizolowane opublikowaną, szybką metodą (Brillowska-Dąbrowska *et al.*, 2007)
 - e. zaprojektowaniu starterów umożliwiających identyfikację kompleksu *T. mentagrophytes* oraz opracowaniu protokołu wykorzystującego układ PCR oraz Real-Time PCR wykrywającego kompleks *T. mentagrophytes* stosując DNA wyizolowane opublikowaną, szybką metodą (Brillowska-Dąbrowska *et al.*, 2007);
4. przeprowadzeniu genotypowania gatunków *M. canis*, *T. mentagrophytes*, *T. rubrum* oraz *E. floccosum*.

8. Bibliografia

1. **Abastabar M**, Mirhendi H, Rezaei-Matehkolaei A, Shidfar MR, Kordbacheh P, Makimura K. Restriction analysis of β -*tubulin* gene for differentiation of the common pathogenic dermatophytes. *J Clin Lab Anal* 2014, **28**: 91-96.
2. **Adimi P**, Hashemi SJ, Mahmoudi M, Mirhendi H, Shidfar MR, Emmami M, Rezaei-Matehkolaei A, Gramishoar M, Kordbacheh P. *In-vitro* Activity of 10 antifungal agents against 320 dermatophyte strains using microdilution method in Tehran. *Iran J Pharm Res* 2013, **12**: 537-545.
3. **Alexander CL**, Shankland GS, Carman W, Williams C. Introduction of a dermatophyte polymerase chain reaction assay to the diagnostic mycology service in Scotland. *Br J Dermatol* 2011, **164**: 966-972.
4. **Asawanonda P**, Taylor CR. Wood's light in dermatology. *Int J Dermatol* 1999, **38**: 801-807.
5. **Baeza LC.**, Giannini MJ. S train differentiation of *Trichophyton rubrum* by random amplification of polymorphic DNA (RAPD). *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2004, **46**: 339-341.
6. **Baran E**, Ziarkiewicz M. Immunologia zakażeń grzybiczych. *Post Dermatol* 1990, **7**: 163-170.
7. **Bergman A**, Heimer D, Kondori N, Enroth H. Fast and specific dermatophyte detection by automated DNA extraction and real-time PCR. *Clin Microbiol Infect* 2013, **19**: E205-211.
8. **Bergmans AM**, van der Ent M, Klaassen A, Böhm N, Andriessse GI, Wintermans RG. Evaluation of a single-tube real-time PCR for detection and identification of 11 dermatophyte species in clinical material. *Clin Microbiol Infect* 2010, **16**: 704-710.
9. **Berk E**, Kuştimur S, Kalkancı A, Oztaş OM. DNA extraction and identification of *Trichophyton rubrum* by real-time polymerase chain reaction from direct nail scraping specimens of patients with onychomycosis. *Mikrobiyol Bul* 2011, **45**: 150-8.
10. **Berk SH**, Penneys NS, Weinstein GD. Epidermal activity in annular dermatophytosis. *Arch Dermatol* 1976, **112**: 485-488.
11. **Bhatia A**, Kanish B, Badyal DK, Kate P, Choudhary S., Efficacy of oral terbinafine versus itraconazole in treatment of dermatophytic infection of skin - A prospective, randomized comparative study. 2019, **51**: 116-119.
12. **Bonifaz A**, Rojas R, Tirado-Sánchez A, Chávez-López D, Mena C, Calderón L, Ponce-Olivera RM. Superficial mycoses associated with diaper dermatitis. *Mycopathologia* 2016, **181**, 671-679.
13. **Bontems O**, Hauser PM, Monod M. Evaluation of a polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism assay for dermatophyte and nondermatophyte identification in onychomycosis. *Br J Dermatol* 2009, **161**: 791-796.
14. **Brasch J**, Beck-Jendroschek V, Gläser R. Fast and sensitive detection of *Trichophyton rubrum* in superficial tinea and onychomycosis by use of a direct polymerase chain reaction assay. *Mycoses* 2011, **54**: e313-317.
15. **Brilhante RS**, Cordeiro RA, Medrano DJ, Monteiro AJ, Sidrim JJ, Rocha MF. Antifungal susceptibility and genotypical pattern of *Microsporium canis* strains. *Can J Microbiol* 2005, **51**: 507-510.
16. **Brillowska-Dabrowska A**. DNA preparation from nail samples. Denmark patent. 2006, WO2006133701.
17. **Brillowska-Dąbrowska A**. Nowoczesne metody diagnostyki zakażeń dermatofitowych w rutynowej praktyce laboratoryjnej. *Mikologia Lekarska* 2009, **16**: 47-49.
18. **Brillowska-Dabrowska A**, Saunte DM, Arendrup MC. Five-hour diagnosis of dermatophyte nail infections with specific detection of *Trichophyton rubrum*. *J Clin Microbiol* 2007, **45**: 1200-1204.



19. **Brouta F**, Descamps F, Fett T, Losson B, Gerday C, Mignon B. Purification and characterization of a 43.5 kDa keratinolytic metalloprotease from *Microsporium canis*. *Med Mycol* 2001, **39**: 269-275.
20. **Bunyard BA**, Nicholson MS, Royse DJ. Phylogeny of the genus *Agaricus* inferred from restriction analysis of enzymatically amplified ribosomal DNA. *Fungal Genet Biol* 1996, pp. 243–253.
21. **Cervellati EP**, Fachin AL, Ferreira-Nozawa MS, Martinez-Rossi NM. Molecular cloning and characterization of a novel ABC transporter gene in the human pathogen *Trichophyton rubrum*. *Med Mycol* 2006, **44**: 141–147.
22. **Chantratita N**, Rholl DA, Sim B, Wuthiekanun V, Limmathurotsakul D, Amornchai P, Thanwisai A, Chua HH, Ooi WF, Holden MT, Day NP, Tan P, Schweizer HP, Peacock SJ. Antimicrobial resistance to ceftazidime involving loss of penicillin-binding protein 3 in *Burkholderia pseudomallei*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011, **108**: 17165-17170.
23. **Chollet A**, Cattin V, Fratti M, Mignon B, Monod M. Which fungus originally was *Trichophyton mentagrophytes*? Historical review and illustration by a clinical case. *Mycopathologia* 2015, **180**: 1-5.
24. **Chowdhary A**, Singh A, Singh PK, Khurana A, Meis JF. Perspectives on misidentification of *Trichophyton interdigitale/Trichophyton mentagrophytes* using internal transcribed spacer region sequencing: Urgent need to update the sequence database. *Mycoses* 2019 **62**: 11-15.
25. **Dahl MV**. Dermatophytosis and immune response. *J Am Acad Dermatol* 1994, **31**: 534-541.
26. **Dahl MV**. Suppression of immunity and inflammation by products produced by dermatophytes. *J Am Acad Dermatol* 1993, **28**: 19-24.
27. **da Costa FV**, Farias MR, Bier D, de Andrade CP, de Castro LA, da Silva SC, Ferreira L. Genetic variability in *Microsporium canis* isolated from cats, dogs and humans in Brazil. *Mycoses* 2013, **56**: 582-588.
28. **de Hoog GS**, Dukik K, Monod M, Packeu A, Stubbe D, Hendrickx M, Kupsch C, Stielow JB, Freeke J, Göker M, Rezaei-Matehkolaei A, Mirhendi H, Gräser Y. Toward a novel multilocus phylogenetic taxonomy for the dermatophytes. *Mycopathologia* 2017, **182**: 5-31. doi: 10.1007/s11046-016-0073-9. Epub 2016 Oct 25.
29. **Digby SS**, Hald M, Arendrup MC, Hjort SV, Kofoed K. Darier disease complicated by terbinafine-resistant *Trichophyton rubrum*: A case report. *Acta Derm Venereol* 2017, **97**: 139-140.
30. **Dobrowolska A**, Debska J, Kozłowska M, Staczek P. Strains differentiation of *Microsporium canis* by RAPD analysis using (GACA)₄ and (ACA)₅ primers. *Pol J Microbiol* 2011, **60**: 145-148.
31. **Dubljanin E**, Džamić A, Vujčić I, Grujičić SŠ, Arsenijević VA, Mitrović I, Čalovski IČ. Epidemiology of onychomycosis in Serbia: a laboratory-based survey and risk factor identification. *Mycoses* 2017, **60**: 25-32.
32. **Dworecka-Kaszak B**, Dąbrowska I. Dermatofity - nowa taksonomia i współczesne metody różnicowania. Przegląd aktualnego stanu wiedzy o mechanizmach patogenезy i interakcjach patogen-gospodarz. *Med Weter* 2017, **73**: 613-617.
33. **Ebihara M**, Makimura K, Sato K, Abe S, Tsuboi R. Molecular detection of dermatophytes and nondermatophytes in onychomycosis by nested polymerase chain reaction based on 28S ribosomal RNA gene sequences. *Br J Dermatol* 2009, **161**: 1038-1044.
34. **Elavarashi E**, Kindo AJ, Kalyani J, Sudha R. Application of PCR fingerprinting using (GACA)₄ primer in the rapid discrimination of dermatophytes. *Indian J Med Microbiol* 2014, **32**: 236-239.
35. **El-Awady R**, Saleh E, Hashim A, Soliman N, Dallah A, Elrasheed A, Elakraa G. The role of eukaryotic and prokaryotic ABC transporter family in failure of chemotherapy. *Front Pharmacol* 2016, **7**: 535.

36. **El-Gohary M**, van Zuuren EJ, Fedorowicz Z, Burgess H, Doney L, Stuart B, Moore M, Little P. Topical antifungal treatments for tinea cruris and tinea corporis. *Cochrane Database Syst Rev* 2014, **4**: CD009992.
37. **Fachin AL**, Ferreira-Nozawa MS, Maccheroni W, Jr Martinez-Rossi NM. Role of the ABC transporter TruMDR2 in terbinafine; 4-nitroquinoline N-oxide and ethidium bromide susceptibility in *Trichophyton rubrum*. *J Med Microbiol* 2006, **55**: 1093–1099.
38. **Faggi E**, Pini G, Campisi E, Bertellini C, Difonzo E, Mancianti F. Application of PCR to distinguish common species of dermatophytes. *J Clin Microbiol* 2001, **39**: 3382–3385.
39. **Favre B**, Ryder NS. Characterization of squalene epoxidase activity from the dermatophyte *Trichophyton rubrum* and its inhibition by terbinafine and other antimycotic agents. *Antimicrob Agents Chemother* 1996, **40**: 443–447
40. **Food and Drug Administration**. FDA Drug Safety Communication: FDA limits usage of Nizoral (ketoconazole) oral tablets due to potentially fatal liver injury and risk of drug interactions and adrenal gland problems [Internet]. 2013.
41. **Food and Drug Administration**. FDA Drug Safety Communication: FDA warns that prescribing of Nizoral (ketoconazole) oral tablets for unapproved uses including skin and nail infections continues; linked to patient death [Internet]. 2016.
42. **Frías-De-León MG**, Martínez-Herrera E, Atoche-Diéguez CR, González- Cespón JL, Uribe B, Arenas R, Rodríguez-Cerdeira C. Molecular identification of isolates of the *Trichophyton mentagrophytes* complex. *Int J Med Sci* 2020, **17**: 45–52.
43. **Garg J**, Tilak R, Garg A, Prakash P, Gulati AK, Nath G. Rapid detection of dermatophytes from skin and hair. *BMC Res Notes* 2009, **18**: 2:60.
44. **Georg LK**. Epidemiology of the dermatophytoses sources of infection, modes of transmission and epidemicity. *Ann N Y Acad Sci* 1960, **89**: 69–77.
45. **Gentles JC**. Laboratory investigations of dermatophyte infections of nails. *Sabouraudia* 1971, **9**: 149–152.
46. **Ghannoum MA**. Mechanisms potentiating *Candida* infection. A review. *Mycoses* 1988, **31**: 543-557.
47. **Ghannoum MA**. Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. *Clin Microbiol Rev* 2000, **13**: 122-143.
48. **Ghannoum MA**, Hajjeh RA, Scher R, Konnikov N, Gupta AK, Summerbell R, Sullivan S, Daniel R, Krusinski P, Fleckman P, Rich P, Odom R, Aly R, Pariser D, Zaiac M, Rebell G, Leshner J, Gerlach B, Ponce-De-Leon GF, Ghannoum A, Warner J, Isham N, Elewski B. A large-scale North American study of fungal isolates from nails: the frequency of onychomycosis, fungal distribution, and antifungal susceptibility patterns. *J Am Acad Dermatol* 2000, **43**: 641-648.
49. **Gnat S**, Nowakiewicz A, Ziółkowska G, Trościańczyk A, Majer-Dziedzic B, Zięba P. Evaluation of growth conditions and DNA extraction techniques used in the molecular analysis of dermatophytes. *J Appl Microbiol* 2017, **122**: 1368-1379.
50. **Gong J**, Ran M, Wang X, Wan Z, Li R. Development and evaluation of a novel Real-Time PCR for pan-dermatophyte detection in nail specimens. *Mycopathologia* 2016 **181**: 51-57.
51. **Gräser Y**, Monod M, Bouchara JP, Dukik K, Nenoff P, Kargl A, Kupsch C, Zhan P, Packeu A, Chaturvedi V, de Hoog S. New insights in dermatophyte research. *Med Mycol* 2018, **56**: 2-9.
52. **Gupta AK**, Cooper EA. Update in antifungal therapy of dermatophytosis. *Mycopathologia* 2008, **166**: 353-367.
53. **Gupta AK**, Foley KA, Versteeg SG. New antifungal agents and new formulations against dermatophytes. *Mycopathologia* 2017, **182**: 127-141.
54. **Gupta AK**, Gupta G, Jain HC, Lynde CW, Foley KA, Daigle D, Cooper EA, Summerbell RC. The prevalence of unsuspected onychomycosis and its causative organisms in a multicentre Canadian sample of 30 000 patients visiting physicians' offices. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2016, **30**: 1567-1572.



55. **Gupta LK**, Singhi MK. Wood's lamp. *Indian J Dermatol Venereol Leprol* 2004, **70**: 131-135.
56. **Hainer BL**. Dermatophyte infections. *Am Fam Physician* 2003, **67**: 101–108.
57. **Hay RJ**. Chronic dermatophyte infections. II. Antibody and cellmediated immune response. *Br J Dermatol* 1982, **106**: 191-198.
58. **Hay RJ**, Roberts SOB, MacKenzie DWR. Mycology in: Textbook of dermatology. Rook A, Wilkinson DS, Ebling FJG, Oxford Blackwell, Scientific Publications, 1992, 1127-1170.
59. **Heidemann S**, Monod M, Gräser Y. Signature polymorphisms in the internal transcribed spacer region relevant for the differentiation of zoophilic and anthropophilic strains of *Trichophyton interdigitale* and other species of *T. mentagrophytes sensu lato*. *Br J Dermatol* 2010, **162**: 282-295.
60. **Hejniak B**. Epidemiologia zakażeń grzybiczych skóry i jej przydatków u dzieci w regionie łódzkim w latach 1988-1997. Wydaw. Wojskowa Akademia Medyczna, Łódź 2000.
61. **Hopple JS**, Vilgalys R. Phylogenetic relationships in the mushroom genus *Coprinus* and dark-spored allies based on sequence data from the nuclear gene coding for the large ribosomal subunit RNA: divergent domains, outgroups and monophyly. *Mol Phylogenet Evol* 1999, **13**: 1-19.
62. **Hsiao YH**, Chen C, Han HS, Kano R. The first report of terbinafine resistance *Microsporum canis* from a cat. *J Vet Med Sci* 2018, **80**: 898-900.
63. **Ioannidou DJ**, Maraki S, Krasagakis SK, Tosca A, Tselentis Y. The epidemiology of onychomycoses in Crete, Greece, between 1992 and 2001. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2006, **20**: 170-174.
64. **Iwen PC**, Hinrichs SH, Rupp ME. Utilization of the internal transcribed spacer regions as molecular targets to detect and identify human fungal pathogens. *Med Mycol* 2002, **40**: 87-109.
65. **Jackson C J**, Barton RC, Evans EG. Species identification and strain differentiation of dermatophyte fungi by analysis of ribosomal-DNA intergenic spacer regions. *J Clin Microbiol* 1999, **37**: 931-936.
66. **Jackson CJ**, Barton RC, Kelly SL, Evans EG. Strain Identification of *Trichophyton rubrum* by specific amplification of subrepeat elements in the ribosomal DNA nontranscribed spacer. *J Clin Microbiol* 2000, **38**: 4527–4534.
67. **Johnson JR**, Owens K, Manges AR, Riley LW. Rapid and specific detection of *Escherichia coli* clonal group A by gene-specific PCR. *J Clin Microbiol* 2004, **42**: 2618-2622.
68. **Kahana M**, Levi A, Cohen M, Schewach-Millet M, Shalish L. Dermatophytosis of the diaper area. *Clin Pediatr* 1987, **26**: 149-51.
69. **Kalinowska K**, Hryniewicz-Gwóźdź A, Plomer-Niezgoda E. Dermatofitozy wywołane przez *Microsporum audouinii* oraz *Microsporum gypseum*. *Mikol Lek* 2009, **16**: 179-183.
70. **Kalinowska K**, Hryniewicz-Gwóźdź A, Plomer-Niezgoda E. Różnicowanie dermatofitów z rodzaju *Microsporum* oraz *Epidermophyton*. *Mikol Lek* 2010, **17**: 47-52.
71. **Kanbe T**, Suzuki Y, Kamiya A, Mochizuki T, Kawasaki M, Fujihiro M, Kikuchi A. Species-identification of dermatophytes *Trichophyton*, *Microsporum* and *Epidermophyton* by PCR and PCR-RFLP targeting of the DNA topoisomerase II genes. *J Dermatol Sci* 2003, **33**: 41-54.
72. **Kano R**, Hirai A, Muramatsu M, Watari T, Hasegawa A. Direct detection of dermatophytes in skin samples based on sequences of the chitin synthase 1 (CHS1) gene. *J Vet Med Sci* 2003, **65**: 267-270.
73. **Kardjeva V**, Summerville R, Kantardjiev T, Devliotou-Panagiotidou D, Sotiriou E, Gräser Y. Forty-eight-hour diagnosis of onychomycosis with subtyping of *Trichophyton rubrum* strains. *J Clin Microbiol* 2006, **44**: 1419-1427.



74. **Klatte JL**, van der Beek N, Kemperman PM. 100 years of Wood's lamp revised. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2015, **29**: 842-847.
75. **Krzyściak P**, Skóra M, Macura AB. Atlas grzybów chorobotwórczych człowieka. Wyd. I, MedPharm Polska, Wrocław 2011.
76. **Kobierzycka M**, Cisko M. Rola enzymów w patogenezie infekcji grzybiczych *Mikol Lek* 2005, **12**: 207-210.
77. **Kondori N**, Tehrani PA, Strömbeck L, Faergemann J. Comparison of dermatophyte PCR kit with conventional methods for detection of dermatophytes in skin specimens. *Mycopathologia* 2013, **176**: 237-241.
78. **Kurnatowska A.**, Kurnatowski P. Mykologia medyczna. Wyd. Edra Urban & Partner, Wrocław 2018, wyd. 1.
79. **Leibner-Cisak J**, Dobrowolska A, Krawczyk B, Kaszuba A, Staczek P. Evaluation of a PCR melting profile method for intraspecies differentiation of *Trichophyton rubrum* and *Trichophyton interdigitale*. *J Med Microbio* 2010, **59**: 185-192.
80. **Litz CE**, Cavagnolo RZ. Polymerase chain reaction in the diagnosis of onychomycosis: a large, single-institute study. *Br J Dermatol* 2010, **163**: 511-514.
81. **Liu D**, Coloe S, Baird R, Pedersen J. Application of PCR to the identification of dermatophyte fungi. *J Med Microbio* 2000, **49**: 493-497.
82. **Lott TJ**, Frade JP, Lockhart SR. Multilocus sequence type analysis reveals both clonality and recombination in populations of *Candida glabrata* bloodstream isolates from U.S. surveillance studies. *Eukaryot Cell* 2010, **9**: 619-625.
83. **Łagowski D**, Gnat S, Nowakiewicz A, Osińska M, Dyląg M. Intrinsic resistance to terbinafine among human and animal isolates of *Trichophyton mentagrophytes* related to amino acid substitution in the squalene epoxidase. *Infection* 2020 **48**:889-897.
84. **Macura AB**. Przyleganie grzybów drożdżopodobnych do komórek ssaków. *Post Mikrobiol* 1987, **26**: 337-341.
85. **Macura AB**. Rola przylegania w interakcji pomiędzy grzybem *Candida* a organizmem gospodarza. *Post Dermaol* 1990, **7**: 195-206.
86. **Majewski S**, Macura AB. Adherencja *Candida albicans* do komórek błony śluzowej podłoża protetycznego w porównawczym badaniu *in vitro*. *Prot Stomatol* 1984, **5**: 261-265.
87. **Manzano-Gayosso P**, Méndez-Tovar LJ, Hernández-Hernández F, López-Martínez R. Antifungal resistance: an emerging problem in Mexico. *Gac Med Mex* 2008, **144**: 23-26.
88. **Maraki S**, Mavromanolaki VE. Epidemiology of onychomycosis in Crete, Greece: a 12-year study. *Mycoses* 2016, **59**: 798-802.
89. **Martin JK**, Luthra MG, Wells MA, Watts RP, Hanahan DJ. Phospholipase A2 as a probe of phospholipid distribution in erythrocyte membranes. Factors influencing the apparent specificity of the reaction. *Biochemistry* 1975, **14**: 5400-5408.
90. **Martinez-Rossi NM**, Bitencourt TA, Peres NTA, Lang EAS, Gomes EV, Quaresimin NR, Martins MP, Lopes L, Rossi A. Dermatophyte resistance to antifungal drugs: mechanisms and prospectus. *Front Microbiol* 2018, **29**: 1108.
91. **Mehlig L**, Garve C, Ritschel A, Zeiler A, Brabetz W, Weber C, Bauer A. Clinical evaluation of a novel commercial multiplex-based PCR diagnostic test for differential diagnosis of dermatomycoses. *Mycoses* 2014, **57**: 27-34.
92. **Meyer W**, Marszewska K, Amirmostofian M, Igrej RP, Hardtke C, Methling K, Viviani MA, Chindamporn A, Sukroongreung S, John MA, Ellis DH, Sorrell TC. Molecular typing of global isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* by polymerase chain reaction fingerprinting and randomly amplified polymorphic DNA-a pilot study to standardize techniques on which to base a detailed epidemiological survey. *Electrophoresis* 1999, **20**: 1790-1799.
93. **Metin B**, Heitman J. Sexual reproduction in dermatophytes. *Mycopathologia* 2017 **182**: 45-55.

94. **Mirhendi H**, Motamedi M, Makimura K, Satoh K. Development a diagnostic pan-dermatophyte TaqMan probe real-time PCR assay based on beta tubulin gene. *Mycoses* 2016, **59**: 520-527.
95. **Miyajima Y**, Satoh K, Uchida T, Yamada T, Abe M, Watanabe S, Makimura M, Makimura K. Rapid real-time diagnostic PCR for *Trichophyton rubrum* and *Trichophyton mentagrophytes* in patients with tinea unguium and tinea pedis using specific fluorescent probes. *J Dermatol Sci* 2013, **69**: 229-235.
96. **Monod M**, Baudraz-Rosselet F, Ramelet AA, Frenk E. Direct mycological examination in dermatology: a comparison of different methods. *Dermatologica* 1989, **179**: 183-186.
97. **Monod M**, Capoccia S, Lechenne B, Zaugg Ch. Secreted proteases from pathogenic fungi. *Int J Med Microbiol* 2002, **292**: 405-419.
98. **Muhsin TM**, Aubaid AH, al-Duboon AH. Extracellular enzyme activities of dermatophytes and yeast isolates on solid media. *Mycoses*, 1997, **40**: 465-469.
99. **Mukherjee PK**, Leidich SD, Isham N, Leitner I, Ryder NS, Ghannoum MA. Clinical *Trichophyton rubrum* strain exhibiting primary resistance to terbinafine. *Antimicrob Agents Chemother* 2003, **47**: 82-86.
100. **Nenoff P**, Krüger C, Schaller J, Ginter-Hanselmayer G, Schulte-Beerbühl R, Tietz HJ. Mycology - an update part 2: dermatomycoses: clinical picture and diagnostics. *J Dtsch Dermatol Ges* 2014, **12**: 749-777.
101. **Nenoff P**, Verma SB, Vasani R, Burmester A, Hipler U, Wittig F, Krüger C, Nenoff K, Wiegand C, Saraswat A, Madhu R, Panda S, Das A, Kura M, Jain A, Koch D, Gräser Y, Uhrlaß S. The current Indian epidemic of superficial dermatophytosis due to *Trichophyton mentagrophytes* - A molecular study. *Mycoses* 2019, **62**: 336-356.
102. **Nweze EI**, Ogbonna CC, Okafor JI. *In vitro* susceptibility testing of dermatophytes isolated from pediatric cases in Nigeria against five antifungals. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2007, **49**: 293-295.
103. **Odds FC**, Brown AJ, Gow NA. Antifungal agents: Mechanisms of action. *Trends Microbiol* 2003 **11**: 272-279.
104. **Ohst T**, Kupsch C, Gräser Y. Detection of common dermatophytes in clinical specimens using a simple quantitative real-time TaqMan polymerase chain reaction assay. *Br J Dermatol* 2016, **174**: 602-609.
105. **Osborne CS**, Leitner I, Favre B, Ryder NS. Amino acid substitution in *Trichophyton rubrum* squalene epoxidase associated with resistance to terbinafine. *Antimicrob Agents Chemother* 2005, **49**: 2840-2844.
106. **Osborne CS**, Leitner I, Hofbauer B, Fielding CA, Favre B, Ryder NS. Biological, biochemical, and molecular characterization of a new clinical *Trichophyton rubrum* isolate resistant to terbinafine. *Antimicrob Agents Chemother* 2006, **50**: 2234-2236.
107. **Papini M**, Piraccini BM, Difonzo E, Brunoro A. Epidemiology of onychomycosis in Italy: prevalence data and risk factor identification. *Mycoses* 2015, **58**: 659-664.
108. **Peres NT**, Maranhão FC, Rossi A, Martinez-Rossi NM. Dermatophytes: host-pathogen interaction and antifungal resistance. *An Bras Dermatol* 2010, **85**: 657-667.
109. **Peixoto I**, Maquine G, Francesconi VA, Francesconi F. Dermatophytosis caused by *Trichophyton rubrum* as an opportunistic infection in patients with Cushing disease. *An Bras Dermatol* 2010, **85**: 888-890.
110. **Petrini B**, von Rosen ML. Optimal dermatophyte diagnosis requires both microscopy and culture. *Lakartidningen* 2002, **99**: 4084.
111. **Pfaller MA**, Sutton DA. Review of *in vitro* activity of sertaconazole nitrate in the treatment of superficial fungal infections. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2006, **56**: 147-152.
112. **Piñeiro L**, Larruskain J, Idigoras P, Pérez-Trallero E. *Trichophyton rubrum* syndrome: the tip of the iceberg and a preventable outcome. *Mycoses* 2010, **53**: 186.
113. **Putman M**, Van Veen HW, Konings WN. Molecular properties of bacterial multidrug transporters. *Microbiol Mol Biol Rev* 2000, **64**: 672-693.



114. **Raschi E**, Poluzzi E, Koci A, Caraceni P, Ponti FD. Assessing liver injury associated with antimycotics: Concise literature review and clues from data mining of the FAERS database. *World J Hepatol* 2014, **6**: 601-612.
115. **Rawashdeh I**, Amri A. Genetic characterization of date palm. Varieties using RAPD markers. *Jordan J Agric Sci* 2006, Vol. 2, No.3.
116. **Richardson MD**, Warnock DW. Fungal infection. Diagnosis and management. *Blackwell Scientific Publications* 1993 Pp. 207. ISBN 0-630-03514-5.
117. **Rotta I**, Sanchez A, Gonçalves PR, Otuki MF, Correr CJ. Efficacy and safety of topical antifungals in the treatment of dermatomycosis: a systematic review. *Br J Dermatol* 2012, **166**: 927-933.
118. **Ryder NS**. Terbinafine: mode of action and properties of the squalene epoxidase inhibition. *Br J Dermatol* 1992, **126** Suppl 39: 2-7.
119. **Sahni K**, Singh S, Dogra S. Newer topical treatments in skin and nail dermatophyte infections. *Indian Dermatol Online J* 2018, **9**: 149-158.
120. **Sanglard D**. Emerging threats in antifungal-resistant fungal pathogens. *Front Med (Lausanne)* 2016, **3**:11.
121. **Saunte DM**, Hasselby JP, Brillowska-Dabrowska A, Frimodt-Møller N, Svejgaard EL, Linnemann D, Nielsen SS, Haedersdal M, Arendrup MC. Experimental guinea pig model of dermatophytosis: a simple and useful tool for the evaluation of new diagnostics and antifungals. *Med Mycol* 2008, **46**: 303-313.
122. **Saran B**, Karahan ZC, Ağırbaşı H, Tekeli A, Aksoy AM. Comparison of different primers used for the genotyping of *Candida albicans* clinical isolates by randomly amplified polymorphic DNA method. *Mikrobiyol Bul* 2008, **42**: 645-654.
123. **Sato T**, Takayanagi A, Nagao K, Tomatsu N, Fukui T, Kawaguchi M, Kudoh J, Amagai M, Yamamoto N, Shimizu N. Simple PCR-based DNA microarray system to identify human pathogenic fungi in skin. *J Clin Microbiol* 2010, **48**: 2357-2364
124. **Schaufuss P**, Steller U. Haemolytic activities of *Trichophyton species*. *Med Mycol* 2003, **41**: 511-516.
125. **Sharma R**, de Hoog S, Presber W, Gr€aser Y. A virulent genotype of *Microsporum canis* is responsible for the majority of human infections. *J Med Microbiol* 2007, **56**: 1377-1385.
126. **Shehata AS**, Mukherjee PK, Aboulatta HN, el-Akhras AI, Abbadi, SH, Ghannoum MA. Single-step PCR using (GACA)₄ primer: utility for rapid identification of dermatophyte species and strains. *J Clin Microbiol* 2008, **46**: 2641-2645.
127. **Singh D**, Patel DC, Rogers K, Wood N, Riley D, Morris AJ. Epidemiology of dermatophyte infection in Auckland, New Zealand. *Australas J Dermatol* 2003, **44**: 263-266.
128. **Singh A**, Masih A, Khurana A, Singh PK, Gupta M, Hagen F, Meis JF, Chowdhary A. High terbinafine resistance in *Trichophyton interdigitale* isolates in Delhi, India harbouring mutations in the squalene epoxidase gene. *Mycoses* 2018, **61**: 477-484.
129. **Sivakumaran S**, Bridge P, Robert P. Genetic relatedness among *Filobasidielle* species. *Mycopathologia* 2002, **156**: 157-162.
130. **Spiliopoulou A**, Bartzavali C, Jelastopulu E, Anastassiou ED, Christofidou M. Evaluation of a commercial PCR test for the diagnosis of dermatophyte nail infections. *J Med Microbiol* 2015, **64**: 25-31.
131. **Symoens F**, Jousson O, Planard C, Fratti M, Staib P, Mignon B, Monod M. Molecular analysis and mating behavior of the *Trichophyton mentagrophytes* species complex. *Int J Med Microbiol* 2011, **301**: 260-266.
132. **Tchernev G**, Penev PK, Nenoff P, Zisova LG, Cardoso JC, Taneva T, Ginter-Hanselmayer G, Ananiev J, Gulubova M, Hristova R, Nocheva D, Guarneri C, Martino G, Kanazawa N. Onychomycosis: modern diagnostic and treatment approaches. *Wien Med Wochenschr* 2013, **163**: 1-12.

133. **ter Beek J**, Guskov A, Slotboom DJ. Structural diversity of ABC transporters. *J. Gen. Physiol* 2014, **143**: 419–435.
134. **Totri CR**, Feldstein S, Admani S, Friedlander SF, Eichenfield LF. Epidemiologic analysis of onychomycosis in the San Diego pediatric population. *Pediatric dermatology* 2017, **34**: 46-49.
135. **Weinberg JM**, Koestenblatt EK, Tutrone WD, Tishler HR, Najarian L. Comparison of diagnostic methods in the evaluation of onychomycosis. *J Am Acad Dermatol* 2003, **49**: 193–197.
136. **Weitzman I**, Summerbell RC. The dermatophytes. *Clin Microbiol Rev* 1995, **8**: 240-259.
137. **White TJ**, Bruns T, Lee S, Taylor JW. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, eds. Innis, M. A., D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White. Academic Press, Inc., New York 1990, 315-322.
138. **Wisselink GJ**, van Zanten E, Kooistra-Smid AM. Trapped in keratin; a comparison of dermatophyte detection in nail, skin and hair samples directly from clinical samples using culture and real-time PCR. *J Microbiol Methods* 2011, **85**: 62-66.
139. **Veasey JV**, Miguel BAF, Bedrikow RB. Wood's lamp in dermatology: applications in the daily practice. *Surg Cosmet Dermatol* 2017, **9**: 324-326.
140. **Verrier J**, Krähenbühl L, Bontems O, Fratti M, Salamin K, Monod M. Dermatophyte identification in skin and hair samples using a simple and reliable nested polymerase chain reaction assay. *Br J Dermatol* 2013, **168**: 295-301.
141. **Verrier J**, Monod M. Diagnosis of dermatophytosis using molecular biology. *Mycopathologia* 2017, **182**: 193-202.
142. **Yamada T**, Maeda M, Alshahni MM, Tanaka R, Yaguchi T, Bontems O, Salamin K, Fratti M, Monod M5. Terbinafine resistance of *Trichophyton* clinical isolates caused by specific point mutations in the squalene epoxidase gene. *Antimicrob Agents Chemother* 2017, **27**: 61.
143. **Zafar A**, Jabeen, K, Farooqi J. (Eds.). Practical guide and atlas for the diagnosis of fungal infections. 2017 Available at: <https://ecommons.aku.edu/books/62>.
144. **Zhong Z**, Li R, Li D, Wang D. Typing of common dermatophytes by random amplification of polymorphic DNA. *Jap J Med Mycol* 1997, **38**: 239-246.



SPIS OSIĄGNIĘĆ

Publikacje w czasopismach wyróżnionych w JCR:

Klein G, Müller-Loennies S, Lindner B, **Kobylak N**, Brade H, and Raina S. Molecular and structural basis of inner core lipopolysaccharide alterations in *Escherichia coli*: incorporation of glucuronic acid and phosphoethanolamine in the heptose region. 2013 *J Biol Chem* **288**, 8111-8127.

Klein G, **Kobylak N**, Lindner B, Stupak A, Raina S. Assembly of lipopolysaccharide in *Escherichia coli* requires the essential LapB heat shock protein. 2014 *J Biol Chem* **289**, 14829-14853.

Kobylak N, Bykowska B, Nowicki R, Brillowska-Dąbrowska A. Real-time PCR approach in dermatophyte detection and *Trichophyton rubrum* identification. 2014 *Acta Biochim Pol* **62**, 119-122.

Kobylak N, Bykowska B, Kurzyk E, Nowicki R, Brillowska-Dąbrowska A. PCR and real-time PCR approaches to the identification of *Arthroderma otae* species *Microsporium canis* and *Microsporium audouinii*/*Microsporium ferrugineum*. 2016 *J Eur Acad Dermatol Venereol Article* **30**: 1819-1822.

Prezentacje ustne na konferencjach:

Kobylak N, Klein G, Raina S. Molecular and structural basis of inner core lipopolysaccharide alterations in *Escherichia coli*. International Conference BioTech, 28-29.06.2013, Sopot.

Kobylak N, Klein G, Raina S. Outer membrane assembly by new chaperones LprA and LprB. ISSC conference, 23-25.05.2013, Gdańsk.

Kobylak N, Brillowska-Dąbrowska A. Conventional methods for the diagnosis of dermatophyte infections. International Conference BioTech, 04-05.07.2014, Gdańsk.

Plakaty na konferencjach:

Kobylak N, Wawra S, Aumüller T, Fischer G, Klein G, Raina S. Catalysis of protein folding by cytoplasmic peptidyl-prolyl isomerases. ESF-EMBO Research Conference Bacterial Networks, 16-21.03.2013, Pułtusk.

Raina S, **Kobylak N**, Lindner B, Klein G. Outer membrane assembly by new chaperones LprA and LprB. ESF-EMBO Research Conference Bacterial Networks, 16-21.03.2013, Pułtusk.

Kobylak N, Brillowska-Dąbrowska A. Pan-dermatophyte real-time PCR for detection of dermatophytes. International Conference BioTech, 04-05.07.2014, Gdańsk.

Kobylak N, Bykowska B, Nowicki R, Dąbrowska I, Brillowska-Dąbrowska A. Badanie różnorodności genetycznej *Microsporium canis*. Drobnoustroje w świecie człowieka -Drobnoustroje oportunistyczne, 18-20.09.2014, Bydgoszcz.



Stypendia

Stypendium w ramach projektu „Rozwój interdyscyplinarnych studiów doktoranckich na Politechnice Gdańskiej w zakresie nowoczesnych technologii” (projekt „InterPhD”) dla najlepszych doktorantów – 2013/2014.

Stypendium w ramach projektu „Rozwój interdyscyplinarnych studiów doktoranckich na Politechnice Gdańskiej w zakresie nowoczesnych technologii” (projekt „InterPhD”) dla najlepszych doktorantów – 2014/2015.

Projekty

Członek zespołu biorącego udział w projekcie pt. „System do szybkiej diagnostyki grzybic powierzchniowych”, e-Pionier, 07.2018-03.2019.