

STRESZCZENIE

Dermatofity są grzybami strzępkowymi, których naturalnym środowiskiem występowania jest gleba. Grzyby te charakteryzuje zdolność do rozkładu keratyny, bliskie pokrewieństwo genetyczne, fizjologiczne, a także zdolność do wywołania zakażeń. Do tej grupy należą gatunki z rodzajów *Epidermophyton*, *Microsporum* i *Trichophyton*, które są chorobotwórcze dla człowieka i zwierząt. Infekcje zlokalizowane mogą być na skórze, paznokciach i we włosach.

Na skutek nadmiernego rozwoju w tkankach żywiciela, powstaje grzybica powierzchniowa nazywana dermatomykozą. Powszechność występowania dermatofitów w najbliższym środowisku człowieka, a także obecny trend życia powodują, że liczba zakażeń wywoływanych przez dermatofity jest coraz większa. Istotnym epidemiologicznie rezerwuarem dermatofitów są bezobjawowi nosiciele jak, np. koty, które mogą stanowić poważne źródło transmisji zakażeń dla człowieka i innych zwierząt.

Od wielu lat dermatofity stanowią poważnym problemem zarówno w diagnostyce mykologicznej, jak i terapii. Prawidłowa i szybka identyfikacja dermatofitów jest niezbędna ze względów zarówno klinicznych, epidemiologicznych, a także profilaktycznych.

Nie tylko wzrastająca liczba zakażeń, ale także zmiany gatunkowe czynników etiologicznych dermatomykoz obserwowane na przestrzeni lat powodują konieczność poszukiwania nowych, pewnych metod do szybkiej, taniej i jednoznacznej identyfikacji gatunkowej dermatofitów.

Rutynowa diagnostyka laboratoryjna dermatofitów obejmuje kilka etapów, wśród których najważniejsza jest identyfikacja gatunku. Do identyfikacji gatunkowej dermatofitów wykorzystuje się testy fenotypowe, których liczba jest mała w porównaniu do innych grup grzybów chorobotwórczych.

Duża zmienność cech wykorzystywanych przy identyfikacji gatunków dermatofitów jest przyczyną licznych błędów. Ponadto długi czas wzrostu wynikający z biologii dermatofitów dodatkowo wydłuża czas diagnostyki. Grzyby te hodowane na podłożach sztucznych bardzo często mogą wykazywać zmienności cech morfologii, kolonii czy fizjologicznych w zależności od warunków prowadzenia hodowli, a w szczególności, gdy kultury utrzymuje się przez dłuższy okres czasu. Dermatofity w warunkach hodowli laboratoryjnej mogą także utracić zdolność do zarodnikowania – zarodniki są kluczową cechą diagnostyczną, na której opiera się ich fenotypowa identyfikacja. Czynnikiem indukującym te zmiany może być wielokrotne pasażowanie szczepu, co niejednokrotnie jest konieczne

w rutynowej praktyce laboratoryjnej. Opisane zjawiska należą do podstawowych przyczyn błędów powstających przy identyfikacji dermatofitów, wykonywanej za pomocą rutynowych technik diagnostycznych. Wyniki otrzymane w ramach rozprawy doktorskiej potwierdziły, że korzystając z metod fenotypowych czasem nie można prawidłowo określić gatunków, zwłaszcza jeżeli mamy gatunki należące do jednego rodzaju.

Powszechnie obowiązującym standardem w medycznej diagnostyce mikrobiologicznej jest wymóg identyfikacji patogennych organizmów do poziomu gatunku. Znajomość gatunku będącego czynnikiem etiologicznymi zakażenia ma istotne znaczenie dla ostatecznego efektu terapeutycznego, a także dla badania epidemiologii zakażeń wywoływanych przez dermatofity w danym regionie.

Wyzwaniem współczesnej medycznej diagnostyki laboratoryjnej jest wyeliminowanie niedoskonałości rutynowych technik mykologicznych za pomocą szybkich i czułych molekularnych metod diagnostycznych.

Celem badawczym wielu ośrodków naukowych na świecie i w Polsce jest stworzenie prostego proceduralnie i taniego testu diagnostycznego do typowania dermatofitów, który znajdzie powszechne zastosowanie w laboratoriach pracujących z tą grupą grzybów. Stąd celem niniejszej rozprawy było zastosowanie metod molekularnych do diagnostyki klinicznej dermatofitów, pozwalających na jednoznaczną identyfikację, różnicowanie wewnątrzgatunkowe oraz porównywanie pokrewieństwa filogenetycznego izolowanych szczepów województwa podkarpackiego.

Pierwszym etapem pracy była weryfikacja wyników fenotypowej identyfikacji zebranej kolekcji szczepów za pomocą molekularnej metody badającej charakterystyczny dla gatunku polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych (PCR-RFLP). Uzyskane wyniki potwierdziły, że fenotypowe metody diagnostyczne mogą być zawodne, wskazując tym samym na konieczność poszukiwania nowych skutecznych technik do identyfikacji dermatofitów.

Dodatkowo w celu ustalenia stopnia wewnątrzgatunkowego zróżnicowania części zebranej kolekcji dermatofitów,³ wykorzystano metodę PCR-MP opartą o profile fragmentów DNA o różnych temperaturach topnienia (PCR melting profile). Uzyskane wyniki wykazały, że zakażenia wywoływane przez dermatofity w województwie Podkarpackim są wywoływane przez 2 genotypy/kłony molekularne gatunku *T. interdigitale*.

Kolejnym etapem pracy było opracowanie sond gatunkowo specyficznych w oparciu o technikę genomowej fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* do identyfikacji 3 najczęściej wywołujących zakażenia gatunków dermatofitów tj. *M. canis*, *T. rubrum* i *T. interdigitale*.

Uzyskane wyniki potwierdziły, że opracowane sondy GISH charakteryzuje wysoka czułość i specyficzność gatunkowa. Dzięki skonstruowanym sondom gatunkowo-specyficznym udało się potwierdzić przynależność gatunkową szczepów klinicznych, dla których uzyskano odmienne wzory profili restrykcyjnych przy zastosowaniu metody PCR-RFLP. Tym samym dowiedziono, że hybrydyzacja *in situ* może stanowić nowe cenne narzędzie dla diagnostyki.

Dodatkowym elementem badań była analiza aktywności diosminy, naringiny, rutyny, hesperydyny, kwercytyny (flawonoidy) oraz kurkuminy (polifenol) wobec wzorcowych szczepów dermatofitów. Otrzymane wyniki wykazały zróżnicowaną aktywność tych związków wobec określonych gatunków, w zależności od rodzaju i stężenia zastosowanych substancji. Zaobserwowano szerokie spektrum ich aktywności, od braku działania aż do całkowitego zahamowania wzrostu grzybów. Uzyskane, wstępne wyniki wskazują na możliwość wykorzystania tych naturalnych związków pochodzenia roślinnego w terapii grzybic.

Zaprezentowane wyniki dowodzą, iż zastosowanie technik biologii molekularnej, pozwala na prawidłową identyfikację gatunkową tych chorobotwórczych grzybów, a także na dokładne ustalenie pokrewieństwa między poszczególnymi gatunkami i koloniami krążącymi w populacjach ludzi i zwierząt. Metody molekularne i genetyczne powinny wspomagać, uzupełniać, a także korygować wyniki uzyskiwane przy pomocy fenotypowych metod diagnostyki mikrobiologicznej.