



UNIwersytet Medyczny IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCLAWIU

Mgr inż. Katarzyna Kalinowska

Katedra i Klinika Dermatologii, Wenerologii i Alergologii

Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu

**„Porównanie metody opartej na reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR) oraz
metody konwencjonalnej w diagnostyce powierzchniowych zakażeń
grzybiczych skóry i jej przydatków.”**

Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych w zakresie biologii medycznej

Promotor: **dr hab. n. med. Anita Hryniewicz-Gwóźdź**

Recenzenci: **Prof. dr hab. n. med. Zygmunt Adamski**

Katedra i Klinika Dermatologii

Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Dr hab. Krzysztof Matkowski

Zakład Fitopatologii i Mikologii

Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

Wrocław, 19.09.2014

Curriculum Vitae

Data urodzenia: 12.08.1983

Miejsce urodzenia: Wrocław

Wykształcenie:

2007 Ukończenie studiów na kierunku Biotechnologia
(specjalność: Biotechnologia molekularna i biokataliza)
na Wydziale Chemicznym Politechniki Wrocławskiej

PRZEBIEG PRACY ZAWODOWEJ:

od stycznia 2009 Katedra i Klinika Dermatologii, Wenerologii i
Alergologii Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu

DOROBEK NAUKOWY:

Autorka lub współautorka 22 opublikowanych prac oraz 5 doniesień zjazdowych.

Opublikowane prace:

I. Prace oryginalne:

1. Anita Hryniewicz-Gwóźdź, Ewa Plomer-Niezgoda, Katarzyna Kalinowska, Anna Czarnecka, Joanna Maj, Tomasz Jagielski.: Efficacy of Fluconazole at a 400 mg weekly dose for the treatment of onychomycosis.
Acta Dermato-Venereologica 2014, DOI: 10.2340/00015555-1913
2. Anita Hryniewicz-Gwóźdź, Katarzyna Kalinowska, Ewa Plomer-Niezgoda, Jacek Bielecki, Tomasz Jagielski.: Increase in resistance to fluconazole and itraconazole in *Trichophyton rubrum* clinical isolates by sequential passages *in vitro* under drug pressure.
Mycopathologia 2013; 176 (1-2): 49-55
3. Anita Hryniewicz-Gwóźdź, Tomasz Jagielski, Katarzyna Kalinowska, Dagmara Baczyńska, Ewa Plomer-Niezgoda, Jacek Bielecki.: Stability of tandemly repetitive subelement PCR patterns in *Trichophyton rubrum* over serial passaging and with respect to drug pressure.
Mycopathologia 2012; 174 (5-6): 383-388
4. Rafał Ogórek, Bartosz Kozak, Agnieszka Lejman, Katarzyna Kalinowska, Mariusz Dyląg.: Analiza genetyczna szczepów *Candida albicans* za pomocą techniki RFLP-PCR.
Mikologia Lekarska 2012; 19 (3): 109-114
5. Katarzyna Kalinowska
Epidemiology of dermatomycoses in Poland over the past decades.
[W:] Epidemiology Insights. Red. Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha, InTech, Rijeka 2012: 31-50, ISBN 978-953-51-0565-7
6. Rafał Ogórek, Elżbieta Płaskowska, Katarzyna Kalinowska, Patrycja Fornalczyk, Anna Misztal, Justyna Budziak.: The analysis of mycological air pollution in selected rooms of student hostels.
Mikologia Lekarska 2011; 18 (4): 201-210
7. Rafał Ogórek, Katarzyna Kalinowska, Elżbieta Płaskowska, Eugeniusz Baran, Ewa Moszczyńska.: Zanieczyszczenia powietrza grzybami na różnych podłożach hodowlanych w wybranych pomieszczeniach kliniki dermatologicznej. Część II.
Mikologia Lekarska 2011; 18 (2): 79-86
8. Rafał Ogórek, Katarzyna Kalinowska, Elżbieta Płaskowska, Eugeniusz Baran, Ewa Moszczyńska.: Zanieczyszczenia powietrza grzybami na różnych podłożach hodowlanych w wybranych pomieszczeniach kliniki dermatologicznej. Część I.
Mikologia Lekarska 2011; 18 (1): 30-38
9. Ewa Plomer-Niezgoda, Anita Hryniewicz-Gwóźdź, Katarzyna Kalinowska.: Zakażenia grzybicze skóry i ich leczenie.
[W:] Medycyna rodzinna - co nowego? T.2; Red. Andrzeja Steciwko; Cornetis, Wrocław 2010: 647-651, ISBN 978-83-61415-14-5

10. Katarzyna Kalinowska, Filip Boratyński, Eugeniusz Baran, Czesław Wawrzeńczyk, Anita Hryniewicz-Gwóźdź.: Aktywność przeciwgrzybicza in vitro laktonów, ketonów oraz dioli. Mikologia Lekarska 2010; 17 (4): 217-220

11. Katarzyna Kalinowska, Anita Hryniewicz-Gwóźdź, Ewa Plomer-Niezgoda, Tomasz Jagielski.: Epidemiologia zakażeń grzybami dermatofitowymi w populacji dolnośląskiej w latach 2004-2008. Mikologia Lekarska 2010; 17 (3): 165-168

II. Prace przeglądowe, (raporty, suplementy, recenzje naukowe, opracowania źródłowe):

1. Katarzyna Kalinowska, Rafał Ogórek, Eugeniusz Baran.: Diagnostyka mikologiczna: wczoraj i dziś. Od mikroskopu do termocyklera.

Mikologia Lekarska 2011; 18 (3): 156-158

2. Rafał Ogórek, Elżbieta Płaskowska, Katarzyna Kalinowska.: Charakterystyka i taksonomia grzybów z rodzaju *Alternaria*.

Mikologia Lekarska 2011; 18 (3): 150-155

3. Katarzyna Kalinowska, Rafał Ogórek.: Sporotrychoza - choroba hodowców róż.

Mikologia Lekarska 2011; 18 (3): 145-149

4. Katarzyna Kalinowska, Anna Kudła, Eugeniusz Baran.: Anidulafungina w leczeniu kandydoz.

Mikologia Lekarska 2010; 17 (4): 236-239

5. Katarzyna Kalinowska, Anita Hryniewicz-Gwóźdź, Ewa Plomer-Niezgoda.: Różnicowanie dermatofitów z rodzaju *Microsporum* oraz *Epidermophyton*.

Mikologia Lekarska. 2010; 17 (1): 47-52

6. Katarzyna Kalinowska, Anita Hryniewicz-Gwóźdź, Ewa Plomer-Niezgoda.: Różnicowanie dermatofitów z rodzaju *Trichophyton*.

Mikologia Lekarska 2009; 16 (3): 171-177

III. Prace pokonferencyjne i doniesienia zjazdowe:

1. Katarzyna Kalinowska, Anita Hryniewicz-Gwóźdź.: Comparison of polymerase chain reaction-based method (PCR) and conventional method in diagnostics of superficial fungal infections of skin and its appendages.

[w:]10th EADV Spring Symposium "The burden of skin diseases". Cracow, Poland, 23-26 May, 2013, FC01.7

ISBN 978-88-906829-4-0

2. Eugeniusz Baran, Katarzyna Kalinowska, Anita Hryniewicz-Gwóźdź.: Grzyby wywołujące melanonychię = Fungi that cause melanonychia.

Przegląd Dermatologiczny 2012; 99 (4): 434

XXX Zjazd Polskiego Towarzystwa Dermatologicznego. Kraków, 19-22 września 2012 r.

3. Katarzyna Kalinowska.: Diagnostyka molekularna powierzchownych zakażeń grzybiczych w populacji dolnośląskiej. Porównanie metod tradycyjnych i nowoczesnych w mikologii.

Przegląd Dermatologiczny 2012; 99 (4): 439-440

XXX Zjazd Polskiego Towarzystwa Dermatologicznego. Kraków, 19-22 września 2012 r.

4. Katarzyna Kalinowska.: Molecular diagnostics of superficial mycoses in lowesilesian population.

Comparison between modern and traditional methods in mycology.

Mycoses 2012; 55 (4): 290

18th International Society of Human and Animal Mycology, Berlin, Germany, 11-15 June 2012

5. Katarzyna Kalinowska, Anita Hryniewicz-Gwóźdź.: Grzyby dermatofitowe występujące u osób prowadzących zabiegi pielęgnacyjne roślin.

[w:] Problemy roślin na terenach zurbanizowanych. Miejskie tereny zielone-zagrożenia I. Red. Elżbieta Płaskowska, Wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu, Wrocław, 2010: 131-135
I Ogólnopolska Konferencja Naukowa "Problemy ochrony roślin na terenach zurbanizowanych", Wrocław, 15-17 września 2010 r.

IV. Prace kazuistyczne

1. Anna Kobuszevska, Katarzyna Kalinowska, Rafał Białyński-Birula, Larysa Hirschberg: Gryzonie domowe jako źródło zakażeń grzybiczych. Opis przypadku.

Mikologia Lekarska 2013; 20 (2): 77-79

2. Magdalena Zalewska, Katarzyna Kalinowska, Anita Hryniewicz-Gwóźdź.: Grzybica skóry gładkiej z uogólnioną osutką alergiczną.

Mikologia Lekarska 2013; 20 (1): 46-47

3. Anita Hryniewicz-Gwóźdź, Vera Beck-Jendroscheck, Jochen Brasch, Katarzyna Kalinowska, Tomasz Jagielski.: Tinea capitis and tinea corporis with a severe inflammatory response due to *Trichophyton tonsurans*.

Acta Dermato-Venereologica 2011; 91 (6): 708-710

4. Anita Hryniewicz-Gwóźdź, Katarzyna Kalinowska, Ewa Plomer-Niezgoda, Joanna Maj, Tomasz Kołodziej, Anna Czarnecka.: Grzybica skóry owłosionej głowy i skóry gładkiej przebiegająca z dużym odczynem zapalnym wywołana przez *Trichophyton tonsurans*.

Mikologia Lekarska 2010; 17 (1): 57-60

5. Katarzyna Kalinowska, Anita Hryniewicz-Gwóźdź, Ewa Plomer-Niezgoda.: Dermatofitozy wywołane przez *Microsporum audouinii* oraz *Microsporum gypseum*.

Mikologia Lekarska 2009; 16 (3): 179-183

STRESZCZENIE

Wstęp: Zakażenia wywołane przez grzyby chorobotwórcze stanowią jedną z najczęstszych chorób infekcyjnych w dermatologii. Zachorowalność na grzybice nie zależy od płci, czy statusu społecznego. Schorzenia te, mimo iż nie zagrażają życiu, bardzo często znacznie obniżają jakość życia pacjentów.

Obecnie laboratoria diagnostyczne do rozpoznawania zakażeń grzybiczych wykonują badanie bezpośrednio mikroskopowe, badanie hodowlane oraz przeprowadzają dodatkowe testy fizjologiczne oraz biochemiczne dla identyfikowanych mikroorganizmów. Metodyka klasyczna ma pewne wady, takie jak: długi czas oczekiwania na wynik (dla dermatofitów wynosi on do 5 tygodni), czy możliwość zanieczyszczenia hodowli. W pewnym odsetku badań obserwuje się również brak wzrostu grzybów na pożywce pomimo istniejącego zakażenia, a także fałszywie ujemne lub dodatnie wyniki badań bezpośrednich. Makroskopowe oraz mikroskopowe podobieństwa niektórych patogenów grzybiczych utrudniają rozpoznanie gatunkowe mikroorganizmów. Natomiast prawidłowe oznaczenie gatunku odpowiedzialnego za zakażenie grzybicze ma duże znaczenie kliniczne, ponieważ pozwala na dobranie właściwego leczenia.

Dzięki zastosowaniu metod biologii molekularnej pojawia się możliwość skrócenia czasu oczekiwania na wynik badania. Diagnostyka molekularna opiera się na reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR) i dla odpowiednio przygotowanego laboratorium jest dosyć prosta do wykonania. Obecnie dąży się do opracowania metodyki szybkiej, specyficznej oraz czulej wobec rodzajów i gatunków patogenów grzybiczych.

Cel pracy: Celem pracy było porównanie metody molekularnej z metodą klasyczną (badanie bezpośrednio, badanie hodowlane) - w diagnostyce powierzchniowych zakażeń grzybiczych skóry i jej przydatków, pod względem ich czułości, czasu oczekiwania na wynik oraz zgodności w zakresie oznaczenia gatunku patogenu.

Materiał i metody: Materiał do badań pobrany został od pacjentów z podejrzeniem zakażenia grzybiczego. 225 próbek materiału biologicznego (włosy, zeszkrobiny ze zmian na skórze gładkiej oraz owłosionej, zeszkrobiny spod płytki paznokciowej) uzyskano od 201 pacjentów w wieku od 3 do 96 lat. Każdą z próbek przebadano metodą klasyczną oraz metodą molekularną. Na metodę klasyczną składało się badanie bezpośrednio oraz hodowlane, przeprowadzano także dodatkowe testy biochemiczne i fizjologiczne (test perforacji włosa, test ureazowy). Metoda nowoczesna obejmowała ekstrakcję grzybiczego DNA, amplifikację materiału genetycznego za pomocą reakcji PCR oraz elektroforezę w żelu agarozowym.

Startery do reakcji PCR, specyficzne wobec rodzajów i gatunków patogenów, wyselekcjonowano na podstawie doniesień literaturowych.

Początkowo wykonano badanie metodą PCR dla 225 próbek z parą starterów specyficzną wobec dermatofitów oraz z parą starterów specyficzną wobec grzybów drożdżakowych z rodzaju *Candida*, w celu ustalenia, czy patogen będący przyczyną infekcji, należy do jednej bądź drugiej grupy grzybów chorobotwórczych.

W kolejnym etapie w przypadku stwierdzenia infekcji grzybami dermatofitowymi (powstanie specyficznego produktu amplifikacji), wykonano kolejne badania z dwoma parami starterów, w tym z

jedną parą specyficzną wobec dermatofitów, oraz z drugą parą, gatunkowo-specyficzną. W ten sposób przetestowano wszystkie dostępne pary starterów dla grzybów dermatofitowych.

Ponadto wszystkie próbki, dla których zidentyfikowano produkty amplifikacji w opisanej powyżej reakcji (wynik badania metodą PCR był dodatni w kierunku obecności grzyba dermatofitowego lub drożdżakowego w materiale badanym), przeanalizowano za pomocą multipleksowej reakcji PCR, przy użyciu zestawu Mentype®Mycoderm^{QS} (Biotype).

Wyniki: Przebadano 225 próbek materiału biologicznego. 73,78% (166) próbek dało ujemny wynik badania: bezpośredniego, hodowlanego oraz metodą PCR. 12,89% (29) próbek dało wynik dodatni we wszystkich badaniach. Dodatkowo badanie bezpośrednie i metodą PCR, natomiast ujemną hodowlę obserwowano dla 8,89% (20) próbek. Dodatni wynik hodowli i badania metodą PCR oraz ujemne badanie bezpośrednie, obserwowano jedynie dla 2,22% (5) próbek. Dodatkowo badanie bezpośrednie, natomiast negatywny wynik badania metodą molekularną oraz hodowli obserwowano dla 1,33% (3) próbek, z kolei dodatnie badanie bezpośrednie i dodatnią hodowlę oraz ujemny wynik badania metodą PCR obserwowano dla 0,89% (2) próbek. Zastosowanie metody opartej na PCR zwiększyło wykrywalność grzybów patogennych w materiale biologicznym. Dla 20 (8,89%) próbek wynik badania molekularnego był dodatni, natomiast hodowla była ujemna.

W przypadku dodatniej hodowli oraz dodatniego wyniku badania metodą PCR uzyskano 100% zgodność wyników w zakresie oznaczenia gatunku patogenu.

Czas uzyskania wyniku dla próbek wynosił od 4 dni (drożdżaki) do 5 tygodni (dermatofity) dla metody klasycznej i od 3 do 4 dni dla metody nowoczesnej.

Patogenami izolowanymi najczęściej był: dermatofit *Trichophyton rubrum* (66,08%), oraz drożdżaki z rodzaju *Candida* (17,85%).

Najczęściej obserwowaną lokalizacją zakażenia grzybiczego u pacjentów była grzybica paznokci stóp. W najstarszej grupie wiekowej pacjentów (71-96 lat) obserwowano tylko ten rodzaj infekcji.

Wnioski: 1. Metoda molekularna wykrywania grzybów w materiale biologicznym jest bardziej czuła niż klasyczna diagnostyka mikologiczna. 2. Metody badań mikologicznych: klasyczna oraz molekularna wykazują wysoką zbieżność w identyfikowaniu gatunków grzybów. 3. Badanie metodą molekularną jest mniej czasochłonne (3-4 dni) w porównaniu do metody klasycznej (4 dni-5 tygodni).