

Universitatea de Medicină și Farmacie “Iuliu Hațieganu”
Cluj Napoca

TEZA DE DOCTORAT

UTILITATEA TEHNICII PCR ÎN

IDENTIFICAREA DIVERSELOR SPECII DE

DERMATOFIȚI

MALINOVSKI GABRIELA MIRELA

Conducător științific
Prof.Dr. COSGAREA RODICA

2009

CUPRINS

INTRODUCERE

I PARTEA GENERALĂ

1. Dermatofiti - noțiuni generale.....	9
1.1 Fungii - noțiuni generale.....	9
1.2 Fungii dermatofiti.....	9
1.3 Patogeneza infecției cu dermatofiti.....	11
1.4 Epidemiologia infecțiilor cu dermatofiti.....	13
2. Diagnosticul de laborator în infecțiile cu dermatofiti	16
2.1 Metode clasice de identificare a speciilor de dermatofiti	16
2.1.1 Recoltarea probelor clinice pentru laborator	17
2.1.2 Examinarea cu lampa Wood	18
2.1.3 Examenul microscopic direct.....	18
2.1.4 Cultura in vitro.....	20
2.1.5 Teste fiziologice pentru identificarea unor specii de dermatofiti.....	24
2.2 Metode moleculare de identificare a speciilor de dermatofiti.....	29
2.2.1 Introducere.....	29
2.2.2 Dezavantajele tehnicilor clasice utilizate în diagnosticul infecțiilor cu dermatofiti	30
2.2.3 Importanța utilizării tehnicilor moleculare în diagnosticul infecțiilor cu dermatofiti.....	31
2.2.4 Tehnici moleculare utilizate pentru identificarea speciilor	33

II PARTEA EXPERIMENTALĂ

1. Studiul clinic și etiologic. Identificarea speciilor de dermatofiti prin tehnici clasice	40
1.1 Scopul cercetării.....	40
1.2 Material și metodă.....	40
1.3 Rezultate.....	44
1.3.1 Forme clinice de infecție dermatofitică.....	44
1.3.2 Diagnostic micologic.....	48
1.3.3 Sensibilitatea și specificitatea testului KOH.....	49
1.3.4 Identificarea speciilor de dermatofiti izolate.....	50
1.3.5 Diagnosticul etiologic al formelor clinice de micoză.....	58
1.3.5.1 Etiologia cazurilor de onicomicoză.....	59
1.3.5.2 Etiologia cazurilor de tinea pedis.....	60

1.3.5.3 Etiologia cazurilor de tinea capitis.....	60
1.3.5.4 Etiologia cazurilor de tinea corporis.....	61
1.3.6 Corelația formă clinică de micoză - vârstă.....	62
1.3.7 Corelația tipul de specie - vârstă.....	63
1.3.8 Corelația tipul de specie - grupe de vârstă.....	65
1.3.9 Corelația tipul de specie- mediul de proveniență.....	66
1.4 Discuții.....	67
1.5 Concluzii.....	72
2. Identificarea speciilor de dermatofiți prin tehnica PCR.....	74
2.1 Scopul studiului.....	74
2.2 Testarea a 4 kituri diferite de extracție a ADN.....	74
2.2.1 Obiectivul cercetării	74
2.2.2 Material și metodă	75
2.2.3 Rezultate.....	78
2.2.3.1 Fragmentele de ADN extras cu 4 kituri diferite.....	78
2.2.3.2 Concentrația ADN extras.....	80
2.2.3.3 Puritya ADN extras.....	80
2.2.4 Discuții.....	81
2.2.5 Concluzii.....	82
2.3 Extracția ADN fungic cu kitul MasterPure™Yeast DNA Purification Kit (Epicentre Biotechnologies).....	82
2.3.1 Material și metodă.....	82
2.3.2 Rezultate.....	85
2.3.3 Concluzii.....	86
2.4 Identificarea speciilor de dermatofiți prin amplificarea regiunii ITS a rADN	86
2.4.1 Obiectivul cercetării.....	86
2.4.2 Material și metodă.....	86
2.4.3 Rezultate.....	90
2.4.4 Discuții.....	93
2.4.5 Concluzii.....	95
2.5 Identificarea <i>Microsporum canis</i> și <i>Trichophyton tonsurans</i> prin tehnica PCR cu primeri specifici.....	96
2.5.1 Obiectivul cercetării.....	96
2.5.2 Material și metodă.....	96
2.5.3 Rezultate.....	98
2.5.4 Discuții.....	99
2.5.5 Concluzii.....	101
3. Concluzii generale.....	102
Referințe	104

Cuvinte cheie: Trichophyton, Microsporum, examen micologic direct, cultura in vitro, PCR

Introducere

Infecțiile cutanate cu dermatofiți sunt larg răspândite pe glob și prezintă și în țara noastră o pondere importantă în patologia umană. Aceste infecții sunt determinate de fungi specializați care afectează doar țesuturile keratinizate. Tratamentul acestor afecțiuni este adesea costisitor și de lungă durată punând încă probleme privind eficacitatea. Pe de altă parte diagnosticul acestor infecții este adesea dificil, mai ales în cazul localizării la nivelul unghiilor și părului. Tehnicile clasice folosite pentru identificare au multiple dezavantaje: au sensibilitate și specificitate scăzută, sunt consumatoare de timp, necesită personal specializat în domeniu și oferă uneori un diagnostic echivoc. Tehnicile moleculare deși costisitoare sunt superioare celor clasice sub aspectul valorii diagnostice.

Pornind de la necesitatea unui diagnostic rapid și specific am efectuat acest studiu în scopul demonstrării utilității aplicării tehnicii PCR în identificarea speciilor de dermatofiți.

Partea generală

Diagnosticul clasic de laborator al infecțiilor cutanate cu dermatofiți se bazează pe două tehnici: examenul microscopic direct și cultura in vitro. Pentru examenul microscopic direct se pot folosi mai multe tehnici, cea mai simplă și mai economică dintre acestea este tehnica care utilizează soluție de hidroxid de potasiu 10- 30 %. Această metodă se utilizează de rutină pentru un diagnostic prezumtiv rapid. În pofida faptului că este rapidă și puțin costisitoare această tehnică are două mari neajunsuri:

sensibilitatea este scăzută (în 5- 15 % din cazuri rezultatul este fals negativ) și metoda este nespecifică - nu poate oferi identitatea speciei etiologice. Din aceste motive examinarea microscopică directă este urmată obligatoriu de însămânțarea probei clinice pe medii de cultură specifice. Adicional culturii se folosesc în unele cazuri teste biochimice care evidențiază diverse proprietăți fiziologice ale acestor fungi. Cultura in vitro ca metodă de diagnostic este superioară examenului micologic direct, putând oferi un diagnostic specific în peste 90 % din cazuri. Identificarea speciilor de dermatofiți în cultură oferă informații prețioase privind posibila sursă de infecție și probabilitatea de transmitere a infecției. Fungii dermatofiți prezintă o mare variabilitate morfologică pentru diverse tulpini ale aceleiași specii. Această caracteristică face ca identificarea să fie adesea dificilă sau incertă. Alt dezavantaj al acestei tehnici este perioada lungă de timp (2-4 săptămâni) necesară pentru un diagnostic definitiv.

Tehnicile moleculare folosite pentru identificare sunt costisitoare dar depășesc neajunsurile tehnicilor clasice. Tehnica PCR de amplificare enzimatică a unui segment specific de ADN este înalt sensibilă și rapidă și poate oferi un diagnostic specific într-o singură zi plecând de la cultura primară. Analiza secvențierii regiunii ITS este o metodă utilă pentru stabilirea relațiilor filogenetice între dermatofiți și pentru identificarea diferitelor specii. Această regiune este situată între subunitatea 18S și subunitatea 25S a rADN și cuprinde 2 regiuni: ITS1 și ITS2. Pentru că prezintă o mare variabilitate între diferite specii amplificarea acestei regiuni în reacția PCR urmată de secvențiere permite diferențierea între diferite specii.

Partea experimentală

În prima parte a părții experimentale s-a efectuat un studiu clinic și etiologic asupra unui eșantion de 290 de pacienți cu diagnostic prezumtiv de micoză cutantă. Scopul studiului a fost identificarea speciilor de dermatofiți prin tehnici clasice și

stabilirea valorii diagnostice a acestor tehnici. Obiectivele urmărite au fost stabilirea sensibilității și specificității examenului micologic direct versus cultura in vitro, diagnosticarea etiologică a formelor clinice de dermatomicoză și identificarea unor corelații între speciile de dermatofiți și caracteristici demografice ale pacienților. Din totalul celor 290 de cazuri examinate micologic au fost confirmate 145 de cazuri de infecție dermatofitică susținând ideea că aceste infecții sunt adesea dificil de diferențiat clinic de alte afecțiuni cutanate. Cele mai frecvente forme clinice de dermatofitoze diagnosticate au fost onicomicoza și tinea pedis. Pentru examenul micologic direct s-a obținut o sensibilitate de 82 % și o specificitate de 79 %, rezultate similare cu alte studii efectuate. Speciile predominante izolate în studiul efectuat au fost *T. mentagrophytes* (44,3 %) urmat de *T. rubrum* (28,3 %). În cazurile de onicomicoză și tinea pedis etiologia a fost reprezentată prevalent de *T. mentagrophytes* și *T. rubrum*. Agenții etiologici pentru toate cazurile de tinea capitis din studiu au fost specii zoofile: *T. mentagrophytes*, *M. canis* și *T. verrucosum* confirmând alte studii care au arătat că în Europa de Est tinea capitis este determinată în principal de dermatofiți zoofili. Analiza statistică efectuată a indicat mai multe corelații între speciile de dermatofiți și caracteristici demografice ale subiecților incluși în studiu. Astfel, în ceea ce privește corelația între specie și grupele de vârstă, testele statistice efectuate ne-au indicat că există o corelație între aceste două variabile. Astfel, *T. mentagrophytes* a fost mai frecvent izolat la pacienții cu vârsta peste 65 ani, *T. rubrum* mai frecvent izolat la grupa de vârstă: 11-65 ani iar *M. canis* a fost mai frecvent la pacienții cu vârste între 1 și 10 ani. În analiza de varianță (testul ANOVA) am găsit o asociere cu semnificație statistică între tipul de specie și vârsta pacientului: *M. canis* a fost izolat mai frecvent la pacienții cu vârsta medie sub 20 ani în timp ce speciile *T. mentagrophytes*, *T. rubrum*, *T. interdigitale* au predominat la pacienții cu vârsta medie peste 40 ani.

În cel de-al doilea capitol al părții experimentale scopul nostru a fost demonstrarea valorii diagnostice a tehnicii PCR în identificarea speciilor de dermatofiți.

Obiectivele urmărite au fost: testarea unor metode diferite de extracție a ADN fungic, identificarea unor specii de dermatofiți prin secvențierea regiunii ITS a rADN fungic și identificarea unor specii de dermatofiți prin aplicarea tehnicii PCR folosind primeri specifici. Testând patru kituri comerciale diferite de extracție a ADN cele mai bune rezultate au fost obținute cu kitul MasterPure™ Yeast DNA Purification Kit (Epicentre Biotechnologies) care a furnizat fragmente de ADN cu concentrație și cu puritate optimă. În continuare, s-a aplicat tehnica PCR pentru 17 tulpini de dermatofiți amplificându-se regiunea ITS a rADN fungic. Au fost folosite 5 tulpini de referință și 12 tulpini izolate în laborator. Cele 12 tulpini izolate în laborator au fost identificate prin tehnicile clasice. ADN fungic din cele 17 tulpini a fost extras cu kitul MasterPure™ Yeast DNA Purification Kit. În reacția PCR s-au utilizat primerii universali ITS1 și ITS4. Produșii obținuți prin PCR au fost secvențiați iar secvențele obținute au fost vizualizate și analizate cu programul Chromas LITE version.2.01. Ulterior, pentru identificarea speciilor s-a folosit algoritmul BLAST prin care s-a comparat fiecare secvență obținută cu secvențele din baza de date de secvențe care este accesibilă la adresa URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>. Identificarea morfologică nu a fost concordantă cu identificarea obținută prin secvențiere pentru 3 din cele 17 tulpini folosite în experiment. Din cele 17 tulpini o singură tulpină nu a putut fi identificată prin secvențiere. Am obținut așadar o identificare superioară a speciilor prin analiza secvențierii regiunii ITS comparativ cu metodele clasice de identificare. Rămâne de aplicat această tehnică pe un eșantion mai mare de tulpini pentru a confirma valoarea diagnostică a acestei metode susținută de alte studii. Secvențierea regiunii ITS nu este o tehnică de aplicat în mod curent în laboratoarele clinice dar poate fi utilă și necesară mai ales în unele cazuri de onicomicoză și pilomicoză la care etiologia nu poate fi stabilită prin metodele clasice și pentru care de regulă, tratamentul este de lungă durată, costisitor și potențial toxic. Tehnica de secvențiere are dezavantajul că este laborioasă și are un cost ridicat. De aceea, am identificat doi primeri specifici (pentru

Microsporum canis și *Trichophyton tonsurans*) care au fost optimizați pentru a fi eficienți la aceeeiași parametrii PCR permițând detectarea celor două specii într-o reacție PCR comună. Ca probe s-au folosit patru tulpini diferite de dermatofiți. Prin tehnica PCR cu primerii “proiectați” s-au obținut 2 produși de amplificare specifici pentru cele două specii alese. Nu a existat nicio amplificare fals pozitivă. Metoda este rapidă, plecând de la cultura primară diagnosticul definitiv s-a obținut într-o singură zi. Rămâne de evaluat în viitor reproductibilitatea metodei pe un număr mai mare de tulpini. Aplicarea tehnicii PCR cu primeri specifici direct pe probele clinice ar scurtcircuita cultura in vitro și ar permite obținerea unui diagnostic specific într-un timp foarte scurt.

Curriculum Vitae

- 1. Nume:** MALINOVSCHI
- 2. Prenume:** GABRIELA MIRELA
- 3. Data și locul nașterii:** 1.11.1974, Cluj Napoca
- 4. Cetățenie:** română
- 5. Stare civilă:** căsătorită
- 6. Studii:**

Instituția	Liceul teoretic "Liviu Rebreanu" Cluj Napoca	U.M.F."I.Hatieganu" Cluj - Napoca	U.M.F. "I.Hatieganu" Cluj - Napoca
Perioada: de la (luna, anul) până la (luna, anul)	Septembrie 1989-iunie 1993	Octombrie 1993- iunie 1999	Noiembrie 2005-in prezent
Grade sau diplome obținute	Diploma de bacalaureat	Diploma de medic- medicina generala mai 2006-obținerea gradului de medic specialist: dermatologie- venerologie	Asistent cercetare

7. Experiența profesională:

Perioada: de la(luna, anul) până la(luna, anul)	Ianuarie 2000-martie 2001	Martie 2001- martie 2006	Martie 2006-pana in prezent	Noiembrie 2005-pana in prezent
Locul:	Cluj Napoca	Cluj Napoca	Cluj Napoca	Cluj Napoca
Instituția:	Spitalul Clinic Judetean de Urgenta Cluj	Spitalul Clinic Judetean de Urgenta Cluj- Cl.Dermat ologie	Spitalul Clinic Judetean de Urgenta Cluj- Cl.Dermatologie	U.M.F."I.H atieganu" Cluj – Napoca
Funcția:	Medic stagiar	Medic rezident	Medic specialist dermatologie-	Doctorand cu

			venerologie	frecventa
Descriere:	Activitate spitaliceasca	Activitate de spital si cercetare	Activitate medicala clinica	Activitate de cercetare si didactica

8. Membru al asociațiilor profesionale:

“Societatea Romana de Dermatologie”, “Asociatia Dermatologilor Transilvani”, “International Dermoscopy Society”, “World Society of anti-aging medicine”

9. Limbi straine cunoscute:

engleza-nivel mediu

franceza-nivel mediu

germana-nivel de baza

10. Alte competențe: Curs de chirurgie dermatologica si cosmetica

Curs de dermato-cosmetologie

Curs de dermatoscopie

Initiere laser medical

Initiere tehnici moleculare (PCR in domeniul micologiei)

11. Specializări și calificări: micologie (efectuare si interpretare examen micologic direct si cultura pentru dermatofiti;experienta 4 ani

12. Activitate științifică:

Publicații:

1. Cosgarea R, Covaciu C, Corlateanu O, Coța G, Baldea I. Clinical, pathogenetic and immunological variability in pyoderma gangrenosum. Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology 2002;16, suppl 1:316

2. Crisan M, Miclutea I, Mos E, Maguran E, Cota G, Bumbu A. Psoriasis vulgar- un caz tratat cu UVB-banda ingusta. Acta Dermatologica Transilvanica 2002;2:34-36.

3. Cota G. Tratatamentul infectiilor gonococice. Acta Dermatologica Transilvanica 2002;2:54-59.

4.Cosgarea R, Covaciu C, Baldea I, Cota G, Corlateanu O. Papuloeritrodermie Ofuji si amiloidoza cutanata. Dermatologie 2003;48:43-46.

5. Crisan M, Pop D, Malinovschi G. Radicalii liberi si radiatiile ultraviolete- reactii fotochimice si fotosensibilizante. Acta Dermatologica Transilvanica 2004;4:60-61.

6. Baican A, Baican C, Malinovski G, Ungureanu L. Lichen plan pigmentogen inversat. Dermatovenerologie 2006;1:37-40.
7. Moisil V, Cosgarea R, Senila S, Malinovski G. Necroliza toxica epidermica in sarcina. Caz clinic. Acta Dermatologica Transilvanica 2007;vol VII nr.1-2:25-28.
8. Senila S, Moisil V, Malinovski G, Cosgarea R. Sindromul DRESS indus de carbamazepina. Prezentare de caz. Acta Dermatologica Transilvanica 2007;vol VII nr.3-4:34-36.

Participarea cu lucrari la sesiuni de comunicari stiintifice:

1. Clinical, pathogenetic and immunological variability in pyoderma gangrenosum. Cosgarea R, Covaciu C, Corlateanu O, Cota G, Bâldea I- poster prezentat la al 11-lea congres al Academiei Europene de Dermatologie si Venerologie 2002
2. Aspecte particulare in diagnosticul si evolutia melanoamelor. Cosgarea R, Senila S, Malinovski G, Moisil V, Baldea I, Danescu S et al. – lucrare prezentata la a XII-a conferinta ADT Cluj Napoca 1-2 iunie 2007
3. Lambourile in acoperirea defectelor cutanate faciale. Cosgarea R, Senila S, Malinovski G, Moisil V, Baldea I, Danescu S et al. - lucrare prezentata la a XII-a conferinta ADT Cluj Napoca 1-2 iunie 2007
4. Pyoderma gangrenosum-dermatoza neutrofilica cu fatete etiopatogenetice diverse. Cosgarea R, Senila S, Malinovski G, Susan M, Colibaba L, Crisan A et al- lucrare prezentata la Conferinta Nationala de Dermatologie, Sinaia, 31 octombrie-3 noiembrie 2007.
5. Necroliza toxica epidermica-valoarea terapiei cu imunoglobuline intravenoase. Cosgarea R, Senila S, Moisil V, Malinovski G, Harceaga O, Baldea I.- lucrare prezentata la Conferinta Nationala de Dermatologie. Sinaia. 31 octombrie-3 noiembrie 2007.
6. Prevalența unor specii de dermatofiti la pacienții cu infecții micotice cutanate. Cosgarea R, Malinovski G, Gheorghiu L.- lucrare prezentata la Conferinta Nationala de Micologie Medicala Cluj Napoca 6-8 noiembrie 2008.

Declar pe propria răspundere că datele prezentate sunt în conformitate cu realitatea.
Data completării: 30.09.2009

University of Medicine and Pharmacy "Iuliu Hațieganu "
Cluj Napoca

PhD THESIS

USEFULNESS OF PCR TEHNIQUE IN IDENTIFYING VARIOUS SPECIES OF DERMATOPHYTES

MALINOVSKI GABRIELA MIRELA

Supervisor
Prof.Dr. COSGAREA RODICA

2009

CONTENTS

INTRODUCTION

I THE GENERAL PART

1. Dermatophytes- general notions.....	9
1.1 The fungus- general notions.....	9
1.2 Dermatophytes.....	9
1.3 Pathogenesis of infection with dermatophytes.....	11
1.4 Epidemiology of infections with dermatophytes.....	13
2. Laboratory diagnosis of infections with dermatophytes.....	16
2.1 Classical methods to identify the species of dermatophytes.....	16
2.1.1 Colecting clinical samples for laboratory.....	17
2.1.2 Wood's Lamp Examination	18
2.1.3 Direct microscopic examination.....	18
2.1.4 In vitro culture.....	20
2.1.5 Physiological tests for identification of species of dermatophytes.....	24
2.2 Molecular methods to identify the species of dermatophytes.....	29
2.2.1 Introduction.....	29
2.2.2 Drawbacks of classical techniques used in the diagnosis of infections with dermatophytes.....	30
2.2.3 Importance of using molecular techniques in the diagnosis of infections with dermatophytes.....	31
2.2.4 Molecular techniques used to identify species.....	33

II THE EXPERIMENTAL PART

1. Clinical and etiological study. Identification of dermatophytes species by classical techniques.....	40
1.1 Objective.....	40
1.2 Material and method.....	40
1.3 Results.....	44
1.3.1 Clinical forms of dermatophytosis.....	44
1.3.2 Micological diagnosis.....	48
1.3.3 The sensitivity and specificity of KOH test.....	49
1.3.4 Species identification of isolated dermatophytes.....	50
1.3.5 Etiologic diagnosis of the clinical forms	58
1.3.5.1 Etiology of onychomycosis.....	59
1.3.5.2 Etiology of tinea pedis.....	60
1.3.5.3 Etiology of tinea capitis.....	60

1.3.5.4 Etiology of tinea corporis.....	61
1.3.6 Correlation between age and clinical form of mycosis.....	62
1.3.7 Correlation between age and type of species.....	63
1.3.8 Correlation between type of species and age groups.....	65
1.3.9 Correlation between type of species and living environment.....	66
1.4 Discussions.....	67
1.5 Conclusions.....	72
2. Species identification of dermatophytes by PCR technique.....	74
2.1 Objective.....	74
2.2 Testing four different DNA extraction kits.....	74
2.2.1 Objective.....	74
2.2.2 Material and method.....	75
2.2.3 Results.....	78
2.2.3.1 DNA fragments extracted with 4 different kits.....	78
2.2.3.2 The concentration of DNA extracted.....	80
2.2.3.3 The purity of DNA extracted.....	80
2.2.4 Discussions.....	81
2.2.5 Conclusions.....	82
2.3 Extraction of fungal DNA with yeast DNA Purification Kit TM Master Pure Kit (Epicentre Biotechnologies).....	82
2.3.1 Material and method.....	82
2.3.2 Results.....	85
2.3.3 Conclusions.....	86
2.4 Species identification of dermatophytes by amplifying the ITS region of rDNA.....	86
2.4.1 Objective.....	86
2.4.2 Material and method.....	86
2.4.3 Results.....	90
2.4.4 Discussions.....	93
2.4.5 Conclusions.....	95
2.5 Specific PCR based identification of <i>Microsporum canis</i> and <i>Trichophyton tonsurans</i>	96
2.5.1 Objective.....	96
2.5.2 Material and method.....	96
2.5.3 Results.....	98
2.5.4 Discussions.....	99
2.5.5 Conclusions.....	101
3.General conclusions.....	102
References.....	104

Key words: Trichophyton, Microsporum, direct mycological examination, in vitro culture, PCR.

Introduction

Skin infections with dermatophytes are widespread in the world and present in our country a large proportion in human pathology. These infections are caused by fungi that affect only specialized keratinized tissues. Treatment of such conditions is often costly, lengthy and sometimes ineffective. On the other hand, specific diagnosis of these infections is often difficult especially in the case of onychomycoses and pilomycoses. Classical techniques used for identification have many disadvantages: low sensitivity and specificity, are time consuming, requires trained personnel in the field and sometimes provides an inconclusive diagnosis. Although expensive, molecular techniques are superior than traditional techniques in terms of diagnostic value.

A specific and fast diagnosis is needed for these infections; we conducted this study to demonstrate the usefulness of applying the PCR technique in species identification of dermatophytes.

The general part

Classic laboratory diagnosis of skin infections with dermatophytes is based on two techniques: direct microscopic examination and in vitro culture. Several techniques may be used for direct microscopic examination; the simplest and most economical of these is the KOH examination (potassium hydroxide solution 10 - 30%). Although is fast and inexpensive this technique has two major drawbacks: sensitivity is low (5 to 15% of cases are false negative) and can not provide the identity of ethological species. For these reasons direct microscopic examination is necessarily followed by inoculation on specific culture media. Biochemical tests are used in some cases showing different

physiological properties of these fungi. As a method of diagnosis, culture in vitro is superior than direct mycological examination offering a specific diagnosis in over 90% of cases. Species identification of dermatophytes in culture provides valuable information on the possible source of infection and likelihood of transmission of infection. Dermatophytes are characterized by a great morphological variability for different strains of the same species. Consequently, the identification is often difficult or uncertain. Another disadvantage of this technique is the long period of time (2-4 weeks) required for a definitive diagnosis. Molecular techniques are costly but have not disadvantages of traditional techniques. PCR is a enzymatic amplification techniques of a specific DNA segment; is highly sensitive and rapid and provide a specific diagnosis in a single day starting from the primary culture. Sequence analysis of ITS region is useful to determine phylogenetic relationships between dermatophytes and to identify different species. This region is located between the 18S subunit and 25S subunit of rDNA and contains regions ITS1 and ITS2. Because it presents a great variability between different species, PCR amplification of this region followed by sequencing allows differentiation between various species.

The experimental part

In the first section of the experimental part was carried out a clinical and etiological study on 290 patients who had presumptive diagnosis of cutaneous mycosis. The purpose of this study was to identify the species of dermatophytes by classical techniques and establish diagnostic value of these techniques. Objectives were to establish the sensitivity and specificity of direct mycological examination versus culture in vitro, etiological diagnosis of clinical forms of dermatomycosis and identify correlations between species of dermatophytes and demographic characteristics of patients. Out of a total of 290 cases, 145 were confirmed by mycological examination supporting the idea that these infections are often difficult to distinguish clinically from

other skin disorders. The most common clinical forms of dermatophytosis were onychomycosis and tinea pedis. Direct mycological examination had a sensitivity of 82 % and a specificity of 79 %, similar results with other studies. Predominant species isolated in the study were *T. mentagrophytes* (44.3%) followed by *T. rubrum* (28.3%). Etiologic agents for all cases of tinea capitis in the study were zoophylic species: *T. mentagrophytes*, *M. canis* and *T. verrucosum*. This result confirms other studies that have shown that in Eastern Europe tinea capitis is caused mainly by zoophilic dermatophytes. Statistical analysis carried out revealed several correlations between species of dermatophytes and demographic characteristics of subjects. Thus, regarding correlation between species and age groups, statistical tests indicated that there is a correlation between these two variables. Therefore, *T. mentagrophytes* was more frequently isolated in patients over 65 years, *T. rubrum* most commonly isolated from age group: 11-65 years, and *M. canis* was more frequently in patients aged between 1 and 10 years. Analysis of variance (ANOVA test) found a statistically significant association between type of species and age of patient: *M. canis* was isolated most frequently in patients with average age below 20 years while the species *T. mentagrophytes*, *T. rubrum*, *T. interdigitale* prevailed in patients with average age over 40 years. In the second chapter of the experimental part our aim was to demonstrate diagnostic value of PCR technique in species identification of dermatophytes. The objectives were: testing different methods of extraction fungal DNA, identification of dermatophytes species by sequencing the ITS region of rDNA and identification of species of dermatophytes by PCR using specific primers. Testing four different commercial kits for DNA extraction best results were obtained with MasterPure™ Yeast DNA Purification Kit (Epicenter Biotechnologies) who provided DNA fragments with optimal concentration and purity. Next, the PCR technique was applied to 17 strains of dermatophytes amplifying ITS region of fungal rDNA. Were used 5 reference strains and 12 strains isolated in the laboratory. The 12 strains isolated in the laboratory

were identified by classical techniques. Fungal DNA of 17 strains was extracted with MasterPure™ Yeast DNA Purification Kit (Epicenter Biotechnologies). Were used universal primers ITS1 and ITS4. PCR products were sequence. Sequences obtained were viewed and analyzed by Chromas LITE version.2.01 program. Subsequently, the BLAST algorithm was used to identify species by comparing each sequence obtained with sequences from database sequences, which can be accessed at the URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>. Morphological identification was not consistent with the identification obtained by sequencing for 3 of the 17 strains used in the experiment. Out of the 17 strains, one strain could not be identified by sequencing. We obtained thus a better identification by sequencing analysis of the ITS region compared with conventional methods of identification. It remains to apply this technique on a larger sample of isolates to confirm the diagnostic value of this method supported by other studies. Sequencing of the ITS region is not a routine technique applied in clinical laboratories but may be particularly useful and necessary for some cases of onychomycosis and pilomycosis for which etiology can not be determined by conventional methods, diseases requiring expensive treatment, prolonged and potentially toxic. Sequencing technique has the disadvantage that it is laborious and has a high cost. Therefore, we identified two specific primers (for *Microsporum canis* and *Trichophyton tonsurans*) and were optimized to be efficient under the same PCR conditions allowing the detection of these two fungi in one PCR reaction. As samples were used four different strains of dermatophytes. The PCR technique with these designed primers were obtained 2 specific amplicons. No false amplification were detected. The method is rapid, starting from the primary culture definitive diagnosis was obtained in a single day.

It remains to evaluate reproducibility of the method in the future on a larger number of strains. PCR-based species specific technique applied directly on clinical samples would bypass in vitro culture and would result a specific diagnosis in a very short time.

Curriculum Vitae

- 1. Surname:** MALINOVSKI
- 2. First name:** GABRIELA MIRELA
- 3. Date and place of birth:** 1.11.1974, Cluj Napoca
- 4. Nationality:** română
- 5. Marital status:** married
- 6. Education:**

Institution	„Liviu Rebreanu”- High School	University of Medicine and Pharmacy „Iuliu Hatieganu” Cluj-Napoca	University of Medicine and Pharmacy „Iuliu Hatieganu” Cluj- Napoca
Period: from ... (month, year) to... (month, year)	September 1989- June 1993	October 1993- June 1999	November 2005-at present
Qualification Certificates	Baccalaureate certificate	Bachelor-General Medicine ;May 2006-obtaining specialist degree: dermatology-venereology	Research Assistant

7. Professional experience:

Period: from ... (month, year) to... (month, year)	January 2000-March 2001	March 2001-March 2006	March 2006-at present	November 2005-at present
Place:	Cluj Napoca	Cluj Napoca	Cluj Napoca	Cluj Napoca
Institution:	Clinic Hospital of Emergency” Cluj Napoca-	Clinic Hospital of Emergency” Cluj Napoca- Dermatology Department	Clinic Hospital of Emergency” Cluj Napoca- Dermatology Department	University of Medicine and Pharmacy „Iuliu Hatieganu” Cluj- Napoca

Job title:	Stagiar doctor	Intern	Specialist dermatology-venereology	PhD student
Description:	Hospital medical practice	Hospital medical practice and research	Medical activity	Research and teaching

8. Member of professional associations:

Romanian Society of Dermatology, “Association of dermatologist- Transylvania”
“International Dermoscopy Society”, “World Society of anti-aging medicine”

9. Languages:

english-medium
french-medium
german-basic level

10. Other qualifications: dermatological and cosmetic surgery course, dermatocosmetology course, dermatoscopy course, basic course- medical laser, molecular techniques (PCR in mycology)-basic training

11. Skills and qualifications: mycology (direct mycological examination and culture for dermatophytes); 4 years experience

12. Scientific activity:

Publications:

1. Cosgarea R, Covaciu C, Corlateanu O, Coța G, Baldea I. Clinical, pathogenetic and immunological variability in pyoderma gangrenosum. Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology 2002;16, suppl 1:316
2. Crisan M, Miclutea I, Mos E, Maguran E, Cota G, Bumbu A. Psoriasis vulgaris - case treated with UVB narrow-band. Acta Dermatologica Transilvanica 2002;2:34-36.
3. Cota G. Treatment of gonococcal infections. Acta Dermatologica Transilvanica 2002;2:54-59.
4. Cosgarea R, Covaciu C, Baldea I, Cota G, Corlateanu O. Papuloerythroderma of Ofuji and cutaneous amyloidosis. Dermatologie 2003;48:43-46.

5. Crisan M, Pop D, Malinovski G. Free radicals and UV- photochemical reactions and photosensitising. *Acta Dermatologica Transilvanica* 2004;4:60-61.
6. Baican A, Baican C, Malinovski G, Ungureanu L. Lichen planus pigmentosus-inversus. *Dermatovenerologie* 2006;1:37-40.
7. Moisil V, Cosgarea R, Senila S, Malinovski G. Toxic epidermal necrolysis in a pregnant women. A clinical case. *Acta Dermatologica Transilvanica* 2007;vol VII nr.1-2:25-28.
8. Senila S, Moisil V, Malinovski G, Cosgarea R. DRESS syndrome induced by carbamazepine. Case presentation. *Acta Dermatologica Transilvanica* 2007;vol VII nr.3-4:34-36.

Participation in work sessions at scientific conferences:

1. Clinical, pathogenetic and immunological variability in pyoderma gangrenosum. Cosgarea R, Covaciu C, Corlateanu O, Cota G, Bâldea I.- poster presented at the 11th Congress of the European Academy of Dermatology and Venerology 2002
2. Particular issues in the diagnosis and evolution of melanomas. Cosgarea R, Senila S, Malinovski G, Moisil V, Baldea I, Danescu S et al.- presented at the XII Conference ADT Cluj Napoca 1-2 iunie 2007
3. Flaps to cover defects of skin facial. Cosgarea R, Senila S, Malinovski G, Moisil V, Baldea I, Danescu S et al. - presented at the XII Conference ADT Cluj Napoca 1-2 iunie 2007
4. Pyoderma gangrenosum- neutrophilic dermatosis with various etiopathogenetic facets. Cosgarea R, Senila S, Malinovski G, Susan M, Colibaba L, Crisan A et al- presented at the National Conference of Dermatology, Sinaia, October 31-November 3, 2007.
5. Toxic epidermal necrolysis- intravenous immunoglobulin therapy value. Cosgarea R, Senila S, Moisil V, Malinovski G, Harceaga O, Baldea I.- presented at the National Conference of Dermatology, Sinaia, October 31-November 3, 2007
6. Prevalence of species of dermatophytes in patients with fungal skin infections. Cosgarea R, Malinovski G, Gheorghiu L.- presented at National Conference on Medical Mycology Cluj Napoca 6-8 November 2008.

Declare that the data presented are consistent with reality.
Date: 30/09/2009