

**Anna H. Brillowska-Dąbrowska**

Politechnika Gdańska

Wydział Chemiczny

**„Diagnostyka molekularna zakażeń wywołanych  
przez dermatofity”**

Autoreferat

Gdańsk 2013

1. Imię i nazwisko: Anna Brillowska-Dąbrowska
2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe:
  - 2001 r. – stopień doktora nauk technicznych, Politechnika Gdańska, Wydział Chemiczny
  - 1996 r. – tytuł zawodowy magistra inżyniera chemii, Politechnika Gdańska, Wydział Chemiczny
3. Informacje o zatrudnieniu w jednostkach naukowych
  - 2002 - 2006 – Statens Serum Institut, Wydział Bakteriologii, Mykologii i Parazytologii
  - 2006 - nadal – Politechnika Gdańska, Wydział Chemiczny, Katedra Mikrobiologii
4. Osiągnięcia naukowe wynikające z art. 16, ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym (Dz. U. Nr 65, poz. 595, ze zm. w Dz. U. z 2005 r. Nr 164, poz. 1365 oraz w Dz. U. z 2011 r. Nr 84, poz. 455)

#### **A. Badania naukowe prowadzone do momentu uzyskania stopnia doktora**

Po uzyskaniu tytułu magistra inżyniera w 1996 roku (praca magisterska pt.: „Badania nad białaczką bydła, diagnostyka techniką PCR i próby otrzymania profilaktycznej szczepionki”), podjęłam dalszą edukację na Studium Doktoranckim przy Wydziale Chemicznym Politechniki Gdańskiej w zespole prof. Józefa Kur w Katedrze Mikrobiologii. W związku z moimi zainteresowaniami związanymi z biologicznymi aspektami biotechnologii, prof. Józef Kur udzielił mi zezwolenia na kontynuację mojej pracy magisterskiej związanej z badaniami nad szczepionkami przeciwko wirusowi białaczki bydłowej BLV oraz rozwijanie nowej dla Katedry Mikrobiologii tematyki związanej z wykorzystaniem narzędzi molekularnych do diagnostyki i zwalczania zarażeń powodowanych przez pasożyta *Toxoplasma gondii*.

Pracę doktorską pt. „Biotechnologia szczepionek DNA przeciwko chorobom infekcyjnym wywołanym przez wirusa BLV i *Toxoplasma gondii*” obroniłam z wyróżnieniem w maju 2001 roku na Wydziale Chemicznym Politechniki Gdańskiej uzyskując stopień doktora nauk technicznych w zakresie technologii chemicznej, a część badań w niej zawartych zostało opublikowanych [1].

Oprócz badań stanowiących materiał do mojej pracy doktorskiej, rozwijałam swoje doświadczenie naukowe w projektach dotyczących produkcji analogu ludzkiej proinsuliny w komórkach *Escherichia coli*. Cennym doświadczeniem była dla mnie

praktyka w fabryce Polfa-Tarchomin, polegająca na optymalizacji produkcji tego rekombinowanego białka w skali półtechnicznej. Niezmiernie ważnym zagadnieniem w przypadku produkcji białek rekombinowanych na dużą skalę jest monitorowanie procesu ich syntezy. W przypadku białek enzymatycznych możliwe jest przeprowadzenie testów określających aktywność enzymatyczną próbek pobranych z bioreaktorów, jednakże w przypadku większości białek nie można rozwiązać tego problemu w tak prosty sposób. Sprawdzanie obecności białka z użyciem elektroforezy białkowej i sprawdzenie obecności prążka reprezentującego dane białko po rozwinięciu elektroforezy nie jest metodą szybką, natomiast jednoznaczne testy typu Western blot czy ELISA wymagają jeszcze większych nakładów czasowych i sprawdzają się jedynie w małej skali, gdzie poniesione straty wynikające z opóźnienia stwierdzenia braku bioproduktu są niewielkie. Rozwiązanie tego problemu stanowiła konstrukcja układu produkującego wraz z białkiem docelowym, żółtym białkiem fluoryzującym – YFP [2].

Praca nad wykorzystaniem białka YFP przyczyniła się również do powstania pomysłu konstrukcji wektora do bezpośredniego klonowania produktów PCR umożliwiającego prosty i szybki sposób selekcji klonów zawierających plazmidy rekombinantowe [3].

1. **A. Brillowska**, S. Dabrowski, J. Rułka, P. Kubiś, E. Buzala, J. Kur. 1999. Protection of cattle against bovine leukemia virus (BLV) infection could be attained by DNA vaccination. *Acta Biochim Pol.* 46(4):971-6. **IF<sub>1999</sub>=0,569**
2. S. Dabrowski, **A. Brillowska**, J. Kur. Use of the green fluorescent protein variant (YFP) to monitor MetArg human proinsulin production in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif.* 1999;16(2):315-23. **IF<sub>1999</sub>=1,416**
3. S. Dabrowski, **A. Brillowska-Dabrowska**, J. Kur. Fluorescent protein vector for directional selection of PCR clones. *Biotechniques.* 2000;29(4):800-806. **IF<sub>2000</sub>=1,756**

#### **B. Badania naukowe prowadzone po uzyskaniu stopnia naukowego doktora nie uwzględnione we wniosku o wszczęcie postępowania habilitacyjnego**

Badania naukowe prowadzone przeze mnie oraz projekty, w których brałam udział po uzyskaniu stopnia doktora można podzielić na:

- wynikające ze współpracy z innymi zespołami badawczymi [4] i katedrami Politechniki Gdańskiej powstałej dzięki mojej wiedzy i doświadczeniu [12]. Ich wynikiem oprócz publikacji w czasopiśmie o charakterze naukowym są liczne doniesienia na krajowych i międzynarodowych konferencjach naukowych;
- będące kontynuacją tematyki rozpoczętej w czasie realizacji pracy doktorskiej [5,7,8];

- związane bezpośrednio z obszarem moich zainteresowań, czyli wykorzystaniem narzędzi biologii molekularnej w diagnostyce chorób infekcyjnych **[6,9,10,11,13]**.

Realizacja tych projektów była możliwa dzięki zastosowaniu technik biologii molekularnej. Ostatnia grupa publikacji związana z diagnostyką chorób infekcyjną jest najbardziej zbliżona do cyklu publikacji będących podstawą do wszczęcia postępowania habilitacyjnego.

Wyróżnić w niej można publikacje dotyczące identyfikacji drobnoustrojów: *Blastocystis hominis* **[6]** oraz *Candida krusei* **[13]**.

Pozostałe publikacje związane są z genotypowaniem grzybów z rodzaju *Candida*. Pierwsza z nich opisuje opracowaną przeze mnie nową metodę genotypowania opartą na amplifikacji fragmentów DNA ze zligowanymi adaptorami. Użyteczność tej metody została potwierdzona w genotypowaniu szczepów *Escherichia coli* oraz izolatów klinicznych z rodzaju *Candida* **[9]**. Jednakże coraz szerzej stosowana technika genotypowania Multilocus Sequence Typing (MLST), dająca dzięki odpowiednio zarządzanej stronie internetowej możliwość porównywania genotypów między ośrodkami, spowodowała, że zrezygnowałam z pomysłu na rozwijanie tematyki dotyczącej opracowywania nowych metod genotypowania. Zarówno technikę MLST, jak i RAPD wykorzystałam do realizacji projektu mającego odpowiedzieć na pytanie czy zakażenia inwazyjne *Candida* spp. powodowane są przez szczepy kolonizujące pacjentów **[11]**. Wyniki potwierdziły, że rzadko dochodzi do zakażenia innymi niż kolonizujące pacjenta szczepami z rodzaju *Candida*. Praktyczne znaczenie odpowiedzi na to pytanie wiąże się z podjęciem decyzji o zastosowaniu profilaktycznej terapii antymikotykami w określonych grupach pacjentów, np. pacjenci przed rozległymi operacjami jamy brzusznej.

Kolejna publikacja związana z tematyką genotypowania izolatów klinicznych dotyczyła badania izolatów *Candida parapsilosis* wyizolowanych w czasie jednego miesiąca od czterech pacjentów Oddziału Hematologii jednego ze szpitali w południowej Szwecji **[10]**. Dochodzenie epidemiologiczne przeprowadzone w tej pracy z użyciem techniki RAPD i analizy sekwencji mikrosatelitarnych przeprowadzonych przeze mnie, wykazało klonalne pochodzenie większości z badanych izolatów. Dodatkowo wniosek ten został potwierdzony przez badanie wyizolowanego z izolatów DNA techniką MLST przeprowadzoną przez inny zespół. Dzięki tym badaniom nawiązałam współpracę z zespołami badawczymi ze Szwedzkiego Instytutu Kontroli Chorób Zakaźnych w Solnie oraz Oddziału Chorób Wewnętrznych Szpitalu w Kalmar (Szwecja).

4. S. Dąbrowski, M. Olszewski, R. Piątek, **A. Brillowska-Dąbrowska**, G. Konopa, J. Kur. 2002. Identification and characterization of single-stranded-DNA-binding proteins from *Thermus thermophilus* and *Thermus aquaticus* - new arrangement of binding domains. *Microbiology*; 148:3307-3315. **IF<sub>2002</sub>=2,897**
5. E. Hiszczyńska-Sawicka, **A. Brillowska-Dąbrowska**, S. Dąbrowski, H. Pietkiewicz, P. Myjak, J. Kur. 2003. High yield expression and single-step purification of *Toxoplasma gondii* SAG1, GRA1, and GRA7 antigens in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*; 27:150-157. **IF<sub>2003</sub>=1,470**
6. R. Stensvold, **A. Brillowska-Dąbrowska**, H. Nielsen, M.C. Arendrup. 2006. Detection of *Blastocystis hominis* in unpreserved stool specimens using PCR. *Journal of Parasitology*, 92:1081-7. **IF<sub>2006</sub>=1,3**
7. L. Holec, E. Hiszczyńska-Sawicka, A. Gąsior, **A. Brillowska-Dąbrowska**, J. Kur. 2007. Use of MAG1 recombinant antigen for detection of *Toxoplasma gondii* infection in human. *Clinical and Vaccine Immunology*; 3:220-225. **IF<sub>2007</sub>=1,995**
8. L. Holec, A. Gąsior, **A. Brillowska-Dąbrowska**, J. Kur. 2008. *Toxoplasma gondii*: enzyme-linked immunosorbent assay using different fragments of recombinant microneme protein 1 (MIC1) for detection of immunoglobulin G antibodies. *Experimental Parasitology*; 119:1-6. **IF<sub>2008</sub>=1,751**
9. **A. Brillowska-Dąbrowska**, M. Wianecka, S. Dąbrowski, Z. Mladenovska, J. Kur, B.K. Ahring. 2008. ALIS-FLP: Amplified ligation selected fragment-length polymorphism method for microbial genotyping. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*; 16:1-11. **IF<sub>2008</sub>=1,363**
10. **A. Brillowska-Dąbrowska**, T. Schön, S. Pannanusorn, N. Lönnbro, L. Bernhoff, J. Bonnedal, J. Haggstrom, A. Wistedt, V. Fernandez, M.C. Arendrup. 2009. A nosocomial outbreak of *Candida parapsilosis* in southern Sweden verified by genotyping. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*; 41:135-142. **IF<sub>2009</sub>=1,7**
11. **A. Brillowska-Dąbrowska**, O. Bergmann, I.M. Jensen, J.O. Jarløv, M.C. Arendrup. 2010. Typing of *Candida* isolates from patients with invasive infection and concomitant colonization. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*; 42:109-113. **IF<sub>2010</sub>=1,562**
12. J. Paradziej-Łukowicz, A. Skwarska, G. Peszyńska-Sularz, **A. Brillowska-Dąbrowska**, J. Konopa. 2011. Anticancer imidazoacridinone C-1311 inhibits hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ), vascular endothelial growth factor (VEGF) and angiogenesis. *Cancer Biology & Therapy*; 1;12(7):586-97. **IF<sub>2011</sub>=2,636**
13. **A. Brillowska-Dąbrowska**, A. Sieniecka. 2012. Molecular detection of *Candida krusei*. *International Research Journal of Microbiology* 3: 275-277.

**C. Cykl publikacji będący podstawą wniosku o wszczęcie postępowania habilitacyjnego poświęcony „Diagnostyce molekularnej zakażeń wywołanych przez dermatofity”.**

Badania prowadzone przeze mnie od 8 lat będące moim głównym obszarem zainteresowań w pracy naukowej związanym z tworzeniem molekularnych metod pozwalających na diagnostykę zakażeń dermatofitowych rozpoczęłam w Statens Serum Institut (Kopenhaga) w Jednostce Mikrobiologii, Parazytologii i Mykologii pod kierunkiem dr Maiken C. Arendrup – wybitnego specjalisty w dziedzinie zakażeń powodowanych przez grzyby patogenne i oportunistyczne. Zmiana tematyki związana była z nurtującym

nie tylko mnie pytaniem, dlaczego przy błyskawicznym rozwoju technik biologii molekularnej, powodującym wdrożenie molekularnej diagnostyki czynników etiologicznych zakażeń bakteryjnych, diagnostyka zakażeń grzybowych oparta jest na klasycznych metodach mikrobiologicznych (obserwacje mikro- i makroskopowe, testy biochemiczne). Rozpoczęcie pracy naukowej w nowym obszarze wymagało ode mnie przygotowania, gdyż wiązało się ze zmianą tematyki – z badań związanych z diagnostyką pasożytów na badania związane z grzybami. Badania w nowej tematyce rozpoczęłam uczestnictwem w kursie organizowanym przez prof. A. Velagraki w Atenach „Molecular Mycology in Diagnosis, Treatment, Epidemiology and Prevention of Fungal Diseases”. W czasie trwania kursu miałam okazję obserwować, jak członkowie zespołu prof. A. Velagraki w ramach próby opracowania molekularnej diagnostyki dermatofitów izolowali DNA z czystych hodowli tych grzybów z użyciem wiertła dentystycznych umocowanych w wiertarce firmy Bosch. Między innymi dzięki temu znalazłam odpowiedź na nurtujące mnie pytanie: największą barierę wprowadzenia metod molekularnych do rutynowej diagnostyki zakażeń grzybiczych (w szczególności dermatofitów) był brak metod izolacji ich DNA, które nadawałyby się do wdrożenia do laboratoriów mikrobiologicznych. Ponadto w tamtym czasie nie było żadnej opisanej metody umożliwiającej oczyszczanie DNA bezpośrednio z próbek klinicznych (paznokcie, skóra, włosy) nadającej się do wdrożenia w rutynowym laboratorium mykologicznym czy mikrobiologicznym.

Uogólniając, na podstawie analizy publikacji naukowych z tego obszaru dostępnych w tym czasie, można było wysnuć wniosek, że problemy związane z wprowadzeniem narzędzi biologii molekularnej biorą się z braku całościowego podejścia do zagadnienia diagnostyki, a mianowicie koncentrowania się wyłącznie na opracowywaniu szeregu testów opartych na reakcji PCR identyfikujących poszczególne gatunki dermatofitów.

Jednakże racjonalna diagnostyka mikrobiologiczna, w tym mykologiczna, składa się z wielu etapów:

- I. Wywiad lekarski i pobieranie próbek
- II. Dostarczenie próbek do laboratorium
- III. Przygotowanie próbek do reakcji identyfikacji
- IV. Reakcje identyfikacji
- V. Interpretacja wyników

### Ad. I Wywiad lekarski i pobieranie próbek

Pierwszy etap racjonalnej diagnostyki rozpoczyna się od badania podmiotowego oraz odpowiednio przeprowadzonego wywiadu lekarskiego, który dostarcza wielu niezmiernie ważnych informacji. W przypadku podejrzenia o zakażenie powodowane przez dermatofity na karcie identyfikacyjnej dołączonej do próbek powinny znaleźć się informacje dotyczące:

- umiejscowienia zmiany, np. skóra owłosiona/nieowłosiona, paznokcie, włosy) – umożliwiające wybór odpowiedniego algorytmu diagnostycznego;
- leki zażywane czy stosowane przez pacjenta – mające szczególny wpływ na wyniki diagnostyki klasycznej;
- podróże – ryzyka zarażenia gatunkami nie stanowiącymi powszechnego problemu w miejscu zamieszkania pacjenta (np. *Trichophyton violaceum* w Polsce);
- zawód – np. rolnicy bardziej narażeni są na choroby odzwierzęce (powodowane przez dermatofity zoofilne), a w przypadku np. hodowców bydła należy liczyć się z możliwością zarażenia *Trichophyton verrucosum*;
- kontakt ze zwierzętami – zwiększone ryzyko zakażenia dermatofitami zoofilnymi (np. *Microsporum canis*).

Dodatkowym ważnym elementem zarówno tego, jak i ostatniego etapu diagnostycznego, jakim jest interpretacja wyników, jest odpowiednie przygotowanie lekarzy kierujących próbki na dane badanie. Dlatego niezbędne jest uczestnictwo w tematycznych konferencjach naukowych i warsztatach, takich jak corocznie odbywająca się Akademia Dermatologii i Alergologii, zarówno osób prezentujących uzyskane wyniki badań naukowych, jak i lekarzy kierujących próbki kliniczne do laboratoriów diagnostycznych.

### Ad. II Dostarczenie próbek do laboratorium

Dermatofity w środowisku mogą przeżyć do kilku lat, nie są wrażliwe na zmiany środowiska. Zatem transport może odbywać się bez specjalnych zabezpieczeń przed warunkami zewnętrznymi. Próbkę dostarcza się do laboratorium w jałowej próbówce typu eppendorf o pojemności 2 ml (otwór wlotowy szerszy niż próbówki typu eppendorf o mniejszej pojemności) wraz z próbką umieszczoną między szkiełkami podstawowymi zawiniętymi w ciemny papier, drogą pocztową.

### Ad. III Przygotowanie próbek do reakcji identyfikacji

Pełne wykorzystanie potencjału, czy też zalet diagnostyki molekularnej jest ściśle związane z możliwością uzyskania DNA patogenów podlegających identyfikacji. W przypadku diagnostyki dermatofitów, której największym problemem jest czas wzrostu mikroorganizmów trwający w niektórych przypadkach do kilku tygodni, niezmiernie istotna jest możliwość izolacji DNA bezpośrednio z próbek klinicznych. Ze względu na brak takich zestawów (zarówno komercyjnie dostępnych, jak i opisanych w literaturze naukowej) podjęłam się zadania badawczego, jakim było opracowanie metody izolacji DNA dermatofitów bezpośrednio z próbek klinicznych.

Opracowywana metoda miała spełniać następujące warunki:

- jak najmniejsza ilość etapów ze względu na konieczność ograniczenia ryzyka kontaminacji,
- prostota wykonania, w celu ułatwienia wdrożenia do laboratorium.

W przypadku diagnostyki powierzchniowych zakażeń grzybiczych czułość metody nie ma tak istotnego znaczenia, jak w przypadku np. grzybic układowych, ze względu na znaczną ilość patogenów występujących na zakażonych tkankach.

Jako, że najprostszą metodą powodującą uszkodzenie ściany komórkowej jest inkubacja w wysokiej temperaturze postanowiłam przetestować możliwość jej zastosowania. W celu sprawdzenia metody należało zapewnić odpowiedni skład buforu. Istotnym elementem było dodanie składników denaturujących białka oraz takich, które zapobiegałyby denaturacji już uwolnionego DNA. Kolejnym ważnym aspektem był brak możliwości stosowania związków będących potencjalnymi inhibitorami reakcji PCR. W tabeli 1 przedstawione zostały przetestowane bufony.



Tabela 1. Zestawy przetestowane pod kątem użyteczności w procedurze szybkiego oczyszczania DNA.

Zestaw 0: Tris 50 mM, KCl 250 mM oraz 1%:		Zestaw II: HEPES 50 mM, KCl 250 mM oraz 1%:		Zestaw IV: CAPSO 50 mM, KCl 250 mM oraz 1%:		Zestaw VI: Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> pH 9,5, KCl 250 mM oraz 1%:	
A	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	A2	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	A4	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	A6	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>
B	NaHCO <sub>3</sub>	B2	NaHCO <sub>3</sub>	B4	NaHCO <sub>3</sub>	B6	NaHCO <sub>3</sub>
C	Na <sub>2</sub> S	C2	Na <sub>2</sub> S	C4	Na <sub>2</sub> S	C6	Na <sub>2</sub> S
D	Cysteina	D2	Cysteina	D4	Cysteina	D6	Cysteina
E	Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	E2	Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	E4	Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	E6	Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>
F	DTT	F2	DTT	F4	DTT	F6	DTT
G	Beta-merkaptioetanol	G2	Beta-merkaptioetanol	G4	Beta-merkaptioetanol	G6	Beta-merkaptioetanol
H	NaClO <sub>3</sub>	H2	NaClO <sub>3</sub>	H4	NaClO <sub>3</sub>	H6	NaClO <sub>3</sub>
I	NaClO <sub>2</sub>	I2	NaClO <sub>2</sub>	I4	NaClO <sub>2</sub>	I6	NaClO <sub>2</sub>
J	NaIO <sub>3</sub>	J2	NaIO <sub>3</sub>	J4	NaIO <sub>3</sub>	J6	NaIO <sub>3</sub>
K	-	K2	-	K4	-	K6	-
Zestaw 1: Tris 50 mM, (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 350 mM oraz 1%:		Zestaw III: HEPES 50 mM, (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 350 mM oraz 1%:		Zestaw V: CAPSO 50 mM, (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 350 mM oraz 1%:		Zestaw VII: Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 9,5, (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 350 mM oraz 1%:	
A1	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	A3	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	A5	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	A7	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>
B1	NaHCO <sub>3</sub>	B3	NaHCO <sub>3</sub>	B5	NaHCO <sub>3</sub>	B7	NaHCO <sub>3</sub>
C1	Na <sub>2</sub> S	C3	Na <sub>2</sub> S	C5	Na <sub>2</sub> S	C7	Na <sub>2</sub> S
D1	Cysteina	D3	Cysteina	D5	Cysteina	D7	Cysteina
E1	Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	E3	Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	E5	Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	E7	Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>
F1	DTT	F3	DTT	F5	DTT	F7	DTT
G1	Beta-merkaptioetanol	G3	Beta-merkaptioetanol	G5	Beta-merkaptioetanol	G7	Beta-merkaptioetanol
H1	NaClO <sub>3</sub>	H3	NaClO <sub>3</sub>	H5	NaClO <sub>3</sub>	H7	NaClO <sub>3</sub>
I1	NaClO <sub>2</sub>	I3	NaClO <sub>2</sub>	I5	NaClO <sub>2</sub>	I7	NaClO <sub>2</sub>
J1	NaIO <sub>3</sub>	J3	NaIO <sub>3</sub>	J5	NaIO <sub>3</sub>	J7	NaIO <sub>3</sub>
K1	-	K3	-	K5	-	K7	-

Dodatkowo przetestowano możliwość zastosowania detergentów: 1% IGEPAL, 1% NONIDET NP40, 1% Tween 20, 1% SDS, 1% CTAB w opisanych w Tabeli 1 buforach.

Do próbek typu eppendorf zawierających włosy (5-7 sztuk) świnek morskich zakażonych *Microsporium canis* zostało dodane po 100 µl przygotowanych buforów [15]. Następnie próbki inkubowano 10 minut w 95°C, mieszano i dodawano do przygotowanych mieszanin reakcyjnych zawierających startery ITS1 i ITS2 [Vilgalys R, Hopple JS Jr, Hibbett DS. Phylogenetic implications of generic concepts in fungal taxonomy: The impact of molecular systematic studies. *Mycol Helvet* 1994; 6: 73-91] powszechnie używanych do amplifikacji regionów ITS grzybów. Specyficzne produkty PCR uzyskano dla próbek wyizolowanych z użyciem buforów: 0B, VIB i VII B. Pozostała część próbek użytych w reakcji PCR była przechowywana w temperaturze +4°C przez 10 dni, a następnie sprawdzana powtórnie w reakcji ze starterami ITS1 i

ITS4. Amplifikacja tak przechowywanego DNA nie powiodła się. Oznaczało to, że prawdopodobnie DNA uległo degradacji lub w próbkach występują inhibitory polimerazy DNA używanej w reakcji PCR.

W celu sprawdzenia wpływu dodatku tzw. „antynhibitorów” po inkubacji włosów zakażonych świnek morskich w 95°C w buforach 0B, VIB i VII B do próbek dodawano 100 µl 2% roztworu BSA (używanego powszechnie jako „antynhibitor” reakcji PCR) i próbkę natychmiast intensywnie mieszano. Tak otrzymaną mieszaninę zawierającą DNA *M. canis* użyto w reakcji PCR ze starterami ITS1 i ITS4. Kolejne reakcje PCR zostały przeprowadzona z użyciem tak wyizolowanego DNA przechowywanego przez 10 dni w temperaturze 4°C. Specyficzne produkty uzyskano dla próbek wyizolowanych z użyciem buforu 0B.

Ostatecznie dalszej ocenie poddano następującą procedurę izolacji DNA z próbek włosów świnek morskich zakażonych *M. canis*.

1. Do próbówki zawierającej próbkę (włosy, skóra, paznokcie) dodać 100 µl buforu pH 9,5 zawierającego 50 mM Tris, 250 mM KCl, 60 mM NaHCO<sub>3</sub>.
2. Probówkę inkubować 10 minut w temperaturze 95°C.
3. Do próbówki dodać 100 µl 2% roztworu BSA.
4. Probówkę wymieszać dokładnie (worteksowanie 5 sekund).
5. Tak przygotowany roztwór zawierający DNA przechowywać w temperaturze 4°C do dalszych analiz.

Procedura ta została opisana w aplikacji patentowej WO2006133701 oraz w publikacji JCM [14]. Opracowana przeze mnie procedura jest wykorzystywana w laboratorium diagnostycznym Statens Serum Institut w Kopenhadze do rutynowej diagnostyki zakażeń dermatofitowych od 2005 roku. Patent **EP1891232** został przyznany w 2012 roku.

#### Ad. IV Reakcje identyfikacji

Kolejnym istotnym elementem diagnostyki jest wykorzystanie odpowiednich algorytmów diagnostycznych, czyli szeregu odpowiednich reakcji identyfikujących poszczególne czynniki etiologiczne. Racjonalne zaprojektowane algorytmy przyczyniają się do zmniejszenia ilości przeprowadzanych reakcji identyfikacji.

W swojej pracy opracowałam algorytmy postępowania diagnostycznego w kierunku wykrywania DNA dermatofitów w badanych próbkach.

Pierwsza, opracowana przeze mnie reakcja multipleks PCR, pozwala na wykrywanie DNA dermatofitów (*ang.* pan-dermatophyte), a jednocześnie umożliwia

wykrycie i identyfikację DNA *Trichophyton rubrum* [14]. Takie podejście umożliwia odrzucenie wszystkich próbek, które nie zawierają DNA dermatofitów. Jako, że *Trichophyton rubrum* jest głównym patogenem infekcji grzybiczych paznokci [Wisselink GJ, van Zanten E, Kooistra-Smid AMD. 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 Meth* 2011; 85: 62–66] zastosowanie opracowanej i opisanej przeze mnie metody w przypadku próbek paznokci pozwala na identyfikację DNA patogenu występującego w większości próbek dodatnich.

Pozostałe próbki mogą być poddawane kolejnym reakcjom identyfikacji lub poddawane klasycznej identyfikacji. W związku z tym, że opracowana przeze mnie metoda izolacji i reakcja multiplex PCR może być przeprowadzona w ciągu kilku godzin (licząc rejestrację i opisanie próbki oraz interpretację wyników PCR), opóźnienie obserwacji mikroskopowych i założenie hodowli, nawet do kolejnego dnia roboczego, wynikające z oczekiwania na wynik reakcji PCR, nie ma istotnego znaczenia w stosunku do kilkutygodniowego oczekiwania na wyniki analizy klasycznej.

Kolejnym opracowanym przeze mnie testem jest test umożliwiający wykrycie i identyfikację DNA dermatofitów z rodzaju *Trichophyton* oraz wykrycie i identyfikację DNA *Microsporum canis* i *Microsporum audouinii* [15]. Dermatofity z rodzaju *Microsporum* są znacznie bardziej wrażliwe na gryzeofulwinę, a z rodzaju *Trichophyton* na terbinafinę [Krob AH, Fleischer AB, Jr, D'Agostino R, Feldman SR. Terbinafine is more effective than itraconazole in treating toenail onychomycosis: results from a metaanalysis of randomized controlled trials. *J Cutan Med Surg* 2003; 7: 306-311; Siqueira ER, Ferreira JC, Pedroso RS, Lavrador MA, Candido RC. Dermatophyte susceptibilities to antifungal azole agents tested in vitro by broth macro and microdilution methods. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2008; 50: 1-5]. Przeprowadzenie tego rozróżnienia daje ważną informację lekarzowi prowadzącemu leczenie. Test ten ma szczególnie duże znaczenie dla grzybic skóry i włosów, w których właśnie przedstawiciele tych dwóch rodzajów stanowią najczęstszą przyczynę zakażeń. Istnieje też możliwość stosowania tych testów, po przeprowadzeniu wstępnej selekcji testem opisywanym we wcześniejszym paragrafie – czyli po odrzuceniu wszystkich próbek, w których nie znaleziono DNA dermatofitów. Kolejna reakcja specyficznie wykrywająca DNA grzybów z rodzaju *Epidermophyton* umożliwia de facto identyfikację gatunkową *Epidermophyton floccosum* - jedyne go patogenu należącego do tego rodzaju [18] może być stosowana do identyfikacji patogenów w próbkach, w których potwierdzono obecność DNA dermatofitów oraz

wykluczono obecność DNA grzybów z rodzaju *Trichophyton* i gatunków *M. canis* oraz *M. audouinii*.

W przypadku niektórych zakażeń identyfikacja gatunkowa jest istotna także ze względu na konieczność przybliżonej identyfikacji źródła zakażenia. Takim przypadkiem jest zakażenie powodowane przez *Microsporu canis*. Źródłem zakażenia w przypadku dermatofitoz powodowanych przez ten drobnoustrój są zazwyczaj małe zwierzęta domowe (takie jak: koty, króliki czy świnki morskie). W przypadku identyfikacji zakażenia *M. canis*, konieczne jest przebadanie zwierzęcia i jego terapia. Zaproponowana przeze mnie metoda identyfikacji gatunkowej opiera się na amplifikacji fragmentu DNA w obrębie sekwencji ITS2. Specyficzność gatunkową starterów uzyskałam dzięki zastosowaniu ~2x większej niż standardowa ilości polimerazy, deoksynukleotydów, składników buforu reakcyjnego [19].

Wszystkie opisane metody identyfikacji zostały sprawdzone na DNA wyizolowanym z użyciem opracowanej przeze mnie procedury ze szczepów referencyjnych, czystych hodowli szczepów klinicznych oraz bezpośrednio z próbek klinicznych.

#### Ad. V Interpretacja wyników

Jedną z przyczyn braku możliwości wdrożenia do rutynowej praktyki laboratoryjnej opracowywanych przez naukowców i publikowanych w czasopismach o charakterze naukowym testów, identyfikujących czynniki etiologiczne zakażeń, opartych na reakcji PCR jest brak odpowiednich kontroli zabezpieczających przed wynikami fałszywie ujemnymi lub fałszywie dodatnimi. Fałszywie ujemne wyniki powstają na skutek:

- błędów ludzkich (brak poszczególnych składników mieszaniny reakcyjnej lub nieodpowiednie ustalenie warunków reakcji),
- błędów aparatury (niedokładność pipet czy termocyklerów),
- zastosowania nieodpowiednich odczynników (przeterminowanych lub źle przechowywanych),
- nieprawidłowej interpretacji wyników,
- obecności inhibitorów w roztworze zawierającym DNA matrycowe.

Zagadnienie wyników fałszywie dodatnich wpływających na sposób leczenia pacjenta, a co ważniejsze na zaprzestanie dalszej diagnostyki prowadzącej do zidentyfikowania rzeczywistego czynnika etiologicznego zakażenia, jest kolejnym problemem niedoszacowanym w publikacjach naukowych. Mimo, że rozpowszechniona

jest praktyka przeprowadzania tzw. „kontroli ujemnych“ reakcji PCR, polegająca na przeprowadzeniu reakcji z dodatkiem buforu czy roztworu, w którym zawieszają się matrycowe DNA, często zdarza się, że są one przeprowadzone nieprawidłowo. Nie ma potrzeby powtarzania kontroli ujemnej stanowiącej potwierdzenie braku kontaminacji na etapie przygotowania mieszaniny reakcyjnej, jednakże niezbędne jest uzależnienie ilości kontroli ujemnych, sprawdzających prawidłowość dodawania DNA matrycowego, od ilości badanych próbek tak, aby ograniczyć ilość próbek, dla których należy powtórzyć reakcję w przypadku kontaminacji jednej z kontroli. Uznaje się, że nawet w przypadku kontaminacji jednej z kontroli ujemnych, wszystkie dodatnie reakcje przygotowane między dwiema nieskontaminowanymi kontrolami ujemnymi, są prawdziwie dodatnie. Należy jednak pamiętać, że kontaminacje mogą powstać nie tylko w czasie przygotowania reakcji PCR, ale również w czasie ekstrakcji czy oczyszczania DNA z badanych próbek. Dlatego też należy pamiętać o przeprowadzaniu kontrolnej izolacji DNA.

Sposobem na wyeliminowanie problemów związanych z ryzykiem „falszywie ujemnych“ wyników reakcji identyfikacji jest zastosowanie w reakcjach kontroli wewnętrznych (internal control – IC). Jeszcze kilka lat temu matrycą dla reakcji kontrolnych stanowiło DNA ludzkie izolowane razem z DNA patogenu bezpośrednio z próbek klinicznych. Do reakcji PCR dodawane były na przykład startery komplementarne do fragmentów genu  $\beta$ -tubuliny. Takie podejście pozwalało na sprawdzenie braku amplifikacji, jednakże ze względu na różnice w ilości DNA pacjenta i patogenu uniemożliwiało prawidłową optymalizację reakcji. Dlatego obecnie stosuje się kontrole wewnętrzne skonstruowane z DNA nie występującego w badanych próbkach (np. DNA bakteriofaga  $\Lambda$ ), do których dołącza się sekwencje rozpoznawane przez startery służące do identyfikacji patogenu. Rozróżnienie produktów PCR DNA patogenu i kontroli wewnętrznej możliwe jest dzięki temu, że produkty PCR uzyskane dla IC są większe niż specyficzne produkty amplifikacji. Odpowiednia wielkość uzyskanych produktów dla IC minimalizuje ryzyko ich selektywnej amplifikacji. W związku z tym niezbędne jest podanie w protokole dołączonym do testu diagnostycznego kryteriów umożliwiających właściwą interpretację uzyskanych wyników [17]; np. (Tabela 2):

- wielkość specyficznego produktu PCR – 366 pz,
- wielkość produktu PCR IC – 566 pz .

Tabela 2. Przykładowa interpretacja wyników reakcji PCR zawierających kontrolę wewnętrzną.

Obecność produktu 366 pz	Obecność produktu 566 pz	Wynik (interpretacja)
-	-	Inhibicja lub błąd amplifikacji
-	+	Próbka ujemna
+	+	Próbka dodatnia
+	-	Próbka dodatnia

Oczywiście interpretacja ta jest prawdziwa pod warunkiem braku specyficznych produktów amplifikacji w kontrolach ujemnych oraz detekcji specyficznych produktów w kontrolach dodatnich, które stanowią reakcje PCR przeprowadzane na DNA matrycowym wyizolowanym z czystej hodowli identyfikowanego patogenu.



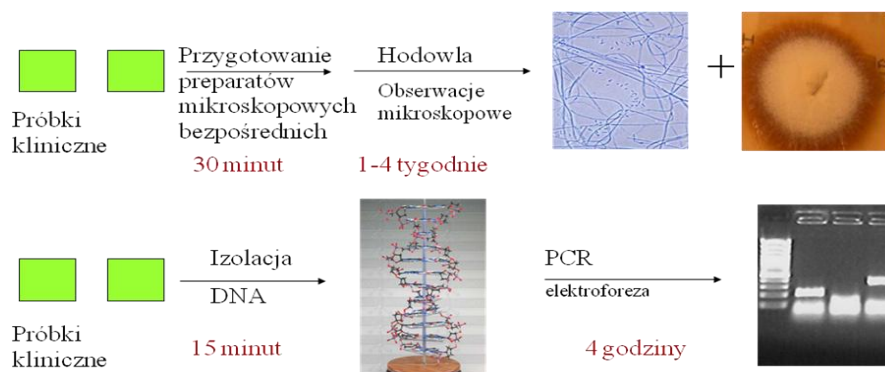
Zdjęcie 1. Wyniki reakcji multiplex PCR. 1: marker wielkości DNA (100 bp DNA); 2: kontrola ujemna; 3: wynik dla genomowego DNA *T. mentagrophytes*; 4: wynik dla genomowego DNA *T. rubrum*; 5: wynik dla DNA wyizolowanego z paznokcia osoby zdrowej; 6: wynik dla DNA wyizolowanego z paznokcia osoby z grzybicą spowodowaną *T. mentagrophytes*; 7: wynik dla DNA wyizolowanego z paznokcia osoby z grzybicą spowodowaną *T. rubrum*.

Informacja na temat obecności lub braku wyników fałszywie dodatnich spowodowanych kontaminacjami w czasie oczyszczania DNA z próbek klinicznych gwarantuje przeprowadzenie procedury oczyszczania DNA czystych roztworów służących do jego zawieszania (woda lub bufor TE). Ilość takich kontroli zależy od ilości próbek klinicznych, z których izolowane jest DNA. W dużych laboratoriach mikrobiologicznych przyjmuje się, że ta kontrola przeprowadzana jest co dziesiątą oczyszczaną próbką, a także na początku i końcu szeregu oczyszczanych próbek. Wyniki pozytywne uzyskane między dwiema „czystymi“ kontrolami uznaje się za wyniki „prawdziwie dodatnie“. Takie podejście minimalizuje straty wynikające z przypadkowej kontaminacji, pozwalając jedynie na odrzucenie uzyskanych wyników tylko dla części

badanych próbek, zmniejszając przez to liczbę próbek, dla których konieczne jest powtórzenie reakcji identyfikacji.

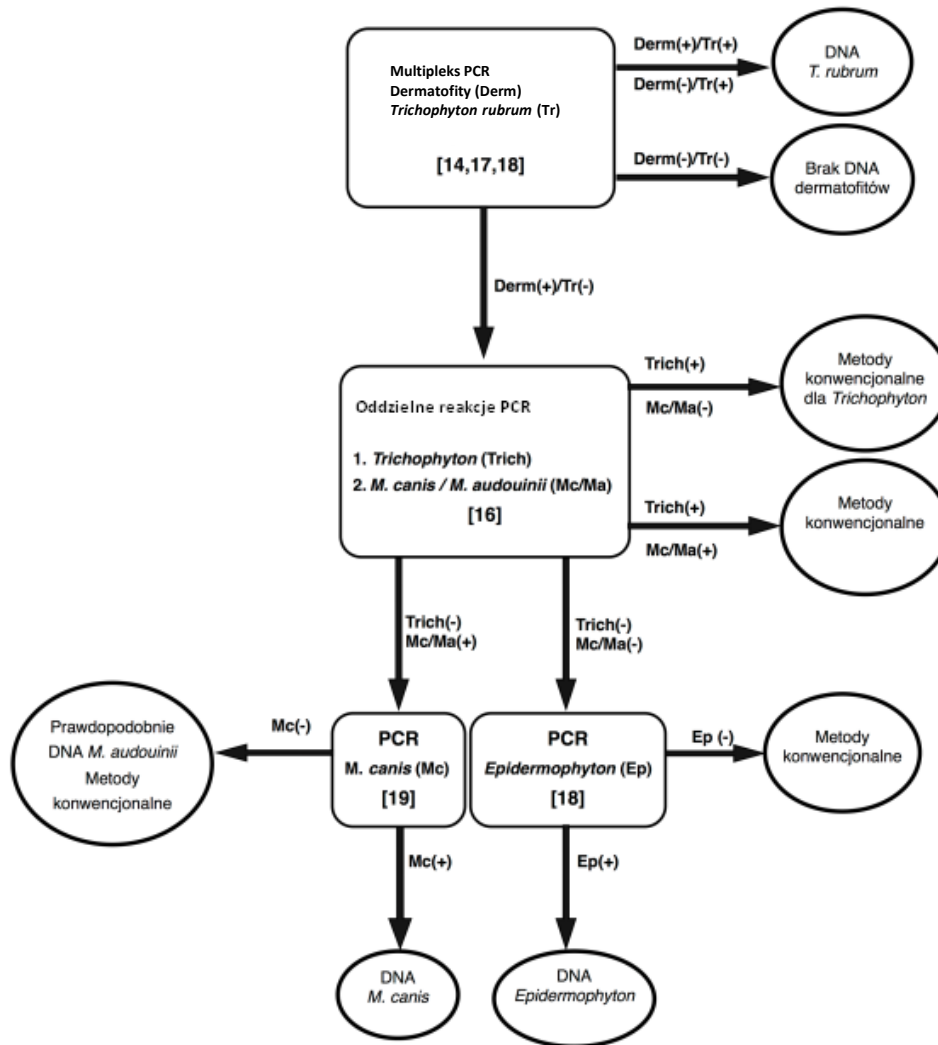
### Podsumowanie

Podsumowując wyniki mojej pracy naukowej stanowiącej jednotematyczny zbiór publikacji oraz biorąc pod uwagę realia pracy diagnostycznego laboratorium mikrobiologicznego, zastosowanie opracowanej przeze mnie metodologii pozwala na skrócenie diagnostyki zakażeń powodowanych przez dermatofity z kilku tygodni do 2 dni roboczych (Ryc. 1) dla ok. 80% próbek zawierających DNA dermatofitów (biorąc pod uwagę czas potrzebny do rejestracji próbek i dopasowując procedury do działania laboratorium diagnostycznego). Dodatkowo w przypadku blisko 100% przypadków identyfikacja uzyskana w ciągu dwóch dni roboczych jest wystarczająca do podjęcia przez lekarza zlecającego badanie racjonalnej decyzji dotyczącej terapii poszczególnych pacjentów.



Rycina 1. Schemat porównujący diagnostykę próbek w kierunku wykrywania DNA dermatofitów z użyciem tradycyjnej oraz opracowanej przeze mnie metodologii.

Przedstawione w punkcie IV reakcje identyfikujące DNA dermatofitów pozwoliły na opracowanie procedury diagnostycznej, której część wykorzystująca techniki biologii molekularnej oparta jest wyłącznie na wynikach mojej pracy, natomiast w przypadkach niezidentyfikowanych z użyciem tych metod, konieczne jest zastosowanie klasycznych metod diagnostycznych (Ryc.2).



Rycina 2. Schemat opracowanej procedury diagnostyki molekularnej zakażeń grzybowych powodowanych przez dermatofity.

W pierwszej kolejności wyizolowane DNA sprawdzane jest z użyciem techniki multiplex PCR pod kątem obecności DNA któregośkolwiek z dermatofitów, dającej również możliwość identyfikacji gatunkowej *Trichophyton rubrum*. W zależności od uzyskanego wyniku wyizolowane DNA poddaje się kolejnym etapom procedury diagnostycznej lub dokonuje się identyfikacji:

- wynik dla reakcji „Derm“ dodatni, „*T. rubrum*“ ujemny – w próbce znajduje się DNA dermatofitów, wyizolowane DNA poddaje się kolejnemu etapowi procedury diagnostycznej;
- wynik dla reakcji „Derm“ ujemny, „*T. rubrum*“ ujemny – w próbce nie stwierdzono obecności DNA dermatofitów;
- wynik dla reakcji „Derm“ dodatni, „*T. rubrum*“ dodatni – w próbce stwierdzono obecność DNA *Trichophyton rubrum*;



- wynik dla reakcji „Derm“ ujemny, „*T. rubrum*“ dodatni – w próbce stwierdzono obecność DNA *Trichophyton rubrum*.

Na tym etapie istnieje możliwość wykrycia obecności inhibitorów termostabilnej polimerazy DNA w badanych próbkach ze względu na możliwość zastosowania kontroli wewnętrznej. W takim przypadku należy powtórzyć reakcję PCR z połową objętości roztworu zawierającego wyizolowane DNA. Jeżeli ponownie otrzymamy wynik świadczący o kontaminacji, należy przekazać informację o konieczności pobrania kolejnej próbki do lekarza zlecającego badanie lub zaproponować przeprowadzenie diagnostyki klasycznej (w zależności od procedury ustalonej przez dane laboratorium. W Statens Serum Institut rutynowo wysyła się prośbę o pobranie kolejnej próbki).

Próbki, w których stwierdzono obecność DNA dermatofitów bez identyfikacji gatunkowej poddawane są kolejnym etapom procedury. Wyizolowane z nich DNA sprawdzane jest w dwóch oddzielnych reakcjach PCR:

- wykrywającej DNA dermatofitów z rodzaju *Trichophyton sp.*,
- wykrywającej DNA *Microsporum canis* lub *M. audouinii* (bez rozróżnienia gatunkowego).

W zależności od uzyskanych wyników przechodzi się do kolejnych etapów procedury diagnostycznej:

- wynik dla reakcji „*Trichophyton*” dodatni, „*M. canis/audouinii*” ujemny – w próbce stwierdza się obecność DNA dermatofitów należących do rodzaju *Trichophyton*, z wykluczeniem *T. rubrum*; próbka umieszczona między dwoma szkiełkami podstawowymi kierowana jest do diagnostyki klasycznej (obserwacja mikro- i makroskopowa, hodowla), wynik reakcji pozwala na rozpoczęcie terapii;
- wynik dla reakcji „*Trichophyton*” dodatni, „*M. canis/audouinii*” dodatni – w próbce stwierdza się obecność DNA dermatofitów należących do rodzaju *Trichophyton* oraz DNA *M. canis* lub/i *M. audouinii*; próbka umieszczona między dwoma szkiełkami podstawowymi kierowana jest do diagnostyki klasycznej (obserwacja mikro- i makroskopowa, hodowla);
- wynik dla reakcji „*Trichophyton*” ujemny, „*M. canis/audouinii*” dodatni - w próbce stwierdza się obecność DNA *M. canis* lub/i *M. audouinii*; wynik reakcji pozwala na rozpoczęcie terapii, DNA wyizolowane z próbki kieruje się do kolejnego etapu procedury jakim jest reakcja PCR wykrywająca specyficznie DNA *M. canis*;
- wynik dla reakcji „*Trichophyton*” ujemny, „*M. canis/audouinii*” ujemny - w próbce nie stwierdza się obecności DNA dermatofitów z rodzaju *Trichophyton*, ani DNA gatunków *M. canis* lub/i *M. audouinii*; DNA wyizolowane z próbki kieruje się do kolejnego etapu

procedury jakim jest reakcja PCR wykrywająca specyficznie *Epidermophyton floccosum*. W przypadku dodatniego wyniku stwierdza się obecność DNA *E. floccosum*. W przypadku wyniku ujemnego, próbka umieszczona między szkiełkami podstawowymi kierowana jest do diagnostyki klasycznej (obserwacja mikro- i makroskopowa, hodowla).

Należy jednak podkreślić, że metody molekularne nie powinny przyczyniać się do likwidacji klasycznych laboratoriów mykologicznych, a jedynie do zmniejszenia ilości próbek badanych metodami klasycznymi. Jedynie zachowanie sprawnie działającego „klasycznego laboratorium mykologicznego“ wykorzystującego metody diagnostyki molekularnej gwarantuje poprawną i sprawną identyfikację gatunkową.

Opracowana przez mnie metoda izolacji DNA wraz poszczególnymi reakcjami identyfikującymi [14,16,17,18] jest stosowana w rutynowej praktyce od kilku lat w Danii oraz w niektórych laboratoriach diagnostycznych w Szwecji, kolejna opublikowana reakcja identyfikacji [19] będzie wdrożona w najbliższym czasie.

14. A. Brillowska-Dąbrowska, D. Saunte, M.C. Arendrup. 2007. Five-hour diagnosis of dermatophyte nail infections with specific detection of *Trichophyton rubrum*. *Journal of Clinical Microbiology*; 45:1200-1204. **IF<sub>2007</sub>=3,708**
15. D.M. Saunte, J.P. Hasselby, A. Brillowska-Dąbrowska, N. Frimodt-Møller, E.L. Svejgaard, D. Linnemann, S.S. Nielsen, M. Haedersdal, M.C. Arendrup. 2008. Experimental guinea pig model of dermatophytosis: a simple and useful tool for the evaluation of new diagnostics and antifungals. *Medical Mycology*; 46:303-13. **IF<sub>2008</sub>=2,156**
16. A. Brillowska-Dąbrowska, A. Świerkowska, D.M.L. Saunte, M.C. Arendrup. 2010. Diagnostic PCR tests for *Microsporum audouinii*, *M. canis* and *Trichophyton* infections. *Medical Mycology*; 48:486-490. **IF<sub>2010</sub>=2,329**
17. A. Brillowska-Dąbrowska, H.V. Nielsen, S.S. Nielsen, M.C. Arendrup. 2010. Optimised 5-hour multiplex PCR test for the detection of tinea unguium: performance in a routine PCR laboratory. *Medical Mycology*; 48:828-31. **IF<sub>2010</sub>=2,329**
18. Patent **EP1891232**: wynalazca: Anna Brillowska-Dąbrowska, właściciel Statens Serum Institut. PCR diagnostics of dermatophytes and other pathogenic fungi.
19. A. Brillowska-Dąbrowska, E. Michałek, D.M.L. Saunte, S.S. Nielsen, M.C. Arendrup. 2013. PCR test for *Microsporum canis* identification. *Medical Mycology*; Jan 7 (epub ahead of print). **IF<sub>2011</sub>=2,329**

#### D. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych.

Do pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych po uzyskaniu stopnia doktora, **nieuwzględnionych we wniosku o wszczęcie postępowania habilitacyjnego**, jednakże **ściśle związanych z obszarem jednotematycznego zbioru** przedstawionego w punkcie C niniejszego autoreferatu, należą:

- zgłoszenie patentowe (United States Patent/Trademark Office): 20100311041 – wynalazca: **A. Brillowska-Dąbrowska**, właściciel Statens Serum Institut. “PCR diagnostics of dermatophytes and other pathogenic fungi”;
- wdrożenie opracowanej metody do rutynowej diagnostyki laboratorium mykologicznego w Statens Serum Institut (Dania) – 2005 rok;
- opracowanie zestawu do diagnostyki onychomikoz powodowanych przez dermatofity „Dermatophyte PCR kit” dostępny w firmie SSI-Diagnostika, Dania (w Polsce dostępny w ofercie firmy Argenta);
- rozdział w książce „Współczesna terapia dermatoz alergicznych”. red. R. Nowicki: Gdańsk: AS Consulting - Łódź, S. 217-221 - *Rozdział 5. Nowoczesne metody diagnostyki zakażeń grzybiczych wywołanych przez dermatofity.* - **A. Brillowska-Dąbrowska**, J. Kur. 2008;
- monografia: **A. Brillowska-Dąbrowska**. 2009. Nowoczesne metody diagnostyki zakażeń dermatofitowych w rutynowej praktyce laboratoryjnej. *Mikologia Lekarska*; 16:47-49;
- udział w następujących konferencjach międzynarodowych:
  - 45th Annual Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy ICAAC (Waszyngton, 2005) - plakat,
  - 4th Trends in Medical Mycology (Ateny, 2009), - plakat,
  - 18<sup>th</sup> Congress of ISHAM (Berlin, 2012) - wystąpienie;
- udział w szeregu konferencji w Polsce, z czego najistotniejsze dla wdrożenia wyników efektów mojej pracy do rutynowej diagnostyki dermatofitów w Polsce, jest udział w Akademiach Dermatologii i Alergologii w Ustce (2008, 2009, 2012, planowany w 2013).

*Anna Brillowska-Dąbrowska*