

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Biljana Gorgievska-Sukarovska

**Varijacije u kliničkoj slici i epidemiologiji
dubokih dermatomikoza vlasišta**

DISERTACIJA



Zagreb, 2017.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

Biljana Gorgievska-Sukarovska

Varijacije u kliničkoj slici i epidemiologiji
dubokih dermatomikoza vlasišta

DISERTACIJA

Zagreb, 2017.

Istraživanje je provedeno u Referentnom centru za dermatološku mikologiju i parazitologiju Ministarstva zdravstva i socijalne skrbi Republike Hrvatske (Laboratorij za dermatološku mikologiju i parazitologiju Klinike za dermatovenerologiju Kliničkog bolničkog centra Zagreb i Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu) i u Kliničkom zavodu za kliničku i molekularnu mikrobiologiju Kliničkog bolničkog centra Zagreb.

Voditelj istraživanja: prof. dr. sc. Mihael Skerlev

Zahvaljujem svima koji su pomogli u izradi ove disertacije:

Zahvaljujem prof. dr. sc. Mihaelu Skerlevu, mojem mentoru, koji mi je stručnim savjetima puno pomogao u izradi ove disertacije.

Posebno želim zahvaliti prim. dr. sc. Lidiji Žele-Starčević na velikoj pomoći i podršci u izradi distertacije.

Veliko hvala timu Mikološkog laboratorija Klinike za dermatovenerologiju, ing. med. lab. dijag. Miljenku Majdaku, zdravstvenoj tehničarki Nevenki Cerjak i ing. med. lab. dijag. Ivi Repić.

Želim zahvaliti dr. sc. Mirni Halasz na pomoći u analizi rezultata sekvenciranja.

Također želim zahvaliti prof. dr. sc. Davoru Plavecu na pomoći u statističkoj analizi rezultata.

Konačno, hvala mojoj obitelji i mojim roditeljima na poticanju, razumijevanju i ljubavi.

SADRŽAJ

POPIS KRATICA

POPIS SLIKA

POPIS TABLICA

1. UVOD	1
1.1. Klasifikacija dermatomikoza.....	1
1.2. Etiologija dermatomikoza.....	2
1.3. Patogeneza.....	5
1.4. Dijagnostika.....	6
1.4.1. Nativno mikroskopiranje i kultura.....	6
1.4.2. Histološka analiza.....	9
1.4.3. Pregled ultravioletnim svjetlom (Woodovom lampom).....	11
1.4.4. Molekularna dijagnostika.....	12
1.4.4.1. Lančana reakcija polimeraze.....	13
1.4.4.2. Enzimaska razgradnja produkata PCR-a.....	13
1.4.4.3. Nasumična amplifikacija polimorfne DNK.....	13
1.4.4.4. Sekvenciranje.....	14
1.5. Dermatomikoze vlasišta.....	15
1.6. Klinička slika dermatomikoza vlasišta.....	15
1.7. Diferencijalna dijagnoza dermatomikoza vlasišta.....	21
1.8. Terapija dermatomikoza vlasišta.....	22
1.8.1. Lokalna terapija.....	22
1.8.2. Sustavna terapija.....	22
1.8.2.1. Grizeofulvin.....	23
1.8.2.2. Terbinafin.....	23
1.8.2.3. Itrakonazol.....	24
1.8.2.4. Flukonazol.....	24
1.9. Epidemiologija dermatomikoza vlasišta.....	25
1.10. Promjena kliničkog obrasca mikrosporoze vlasišta.....	27
2. HIPOTEZA	31
3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	32

3.1. Opći cilj istraživanja.....	32
3.2. Specifični ciljevi.....	32
4. MATERIJALI I METODE.....	33
4.1. Opis istraživanja.....	33
4.2. Uzorak i ispitanici.....	34
4.3. Materijali i metode.....	34
4.3.1. Mikološka obrada (nativno mikroskopiranje i kultivacija gljive).....	35
4.3.2. Izolacija DNK.....	38
4.3.3. Molekularna potvrda vrste <i>M. canis</i>	38
4.4. Statistička analiza.....	39
4.5. Etička pitanja.....	40
5. REZULTATI.....	41
5.1. Učestalost i etiološki aspekti dermatomikoza vlasišta.....	41
5.2. Genotipska varijabilnost izolata gljive vrste <i>M. canis</i>	49
6. RASPRAVA.....	59
6.1. Učestalost i etiološki aspekti dermatomikoza vlasišta.....	59
6.2. Genotipska varijabilnost izolata gljive vrste <i>M. canis</i>	62
6.3. Značenje dobivenih rezultata.....	66
6.4. Nedostatak istraživanja.....	66
7. ZAKLJUČCI.....	67
8. SAŽETAK.....	68
9. SUMMARY.....	70
10. POPIS LITERATURE.....	72
11. ŽIVOTOPIS.....	88

POPIS KRATICA

A.....	adenin
ABI.....	<i>Applied Biosystems</i> = primijenjeni biosustavi
AS.....	aritmetička sredina
ATCC.....	<i>American Type Culture Collection</i> = američka kolekcija sojeva
AUC.....	<i>area under the curve</i> = površina ispod krivulje
bp.....	<i>base pair</i> = parova baza
BT2.....	<i>β-tubulin</i> = beta tubulin
C.....	citozin
CI.....	<i>confidence interval</i> = interval pouzdanosti
DC.....	<i>dermatomycosis capitis</i> = dermatomikoza vlasišta
ddNTP.....	dideoksiribonukleozid-trifosfat
DNK.....	deoksiribonukleinska kiselina
dNTP.....	deoksiribonukleozid-trifosfat
<i>E.</i>	<i>Epidermophyton</i>
G.....	guanin
HE.....	hemalaun-eozin
IFN-γ.....	interferon gama
IL.....	interleukin
IQR.....	<i>interquartile range</i> = interkvartilni raspon
ISSR.....	<i>inter single sequence repeat</i> = analiza međumikrosatelitne regije DNK
ITS.....	<i>internal transcribed spacer</i> = unutrašnji „prepisani“ segment
KOH.....	kalij hidroksid
<i>M.</i>	<i>Microsporum</i>
NTS.....	<i>nontranscribed spacer</i> = „neprepisani“ segment
OR.....	<i>odds ratio</i> = omjer šansi
PAS.....	<i>periodic-acid Schiff</i>
PCR.....	<i>Polymerase Chain Reaction</i> = lančana reakcija polimeraze
RAPD.....	<i>Random Amplified Polymorphic DNA</i> = nasumična amplifikacija polimorfne DNK
RFLP.....	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i> = enzimsko razgradnja produkata PCR-a
rDNK.....	ribosomna deoksiribonukleinska kiselina

ROC..... *Receiver Operator Curve* = krivulja senzitivnosti i specifičnosti
rpm..... *revolutions per minute* = okretaja u minuti
SD..... standardna devijacija
SDA..... *Sabouraud Dextrose Agar* = modificirani Sabouraudov agar
T..... timin
T. *Trichophyton*
TC..... *tinea capitis* = dermatomikoza vlasišta
TEF1..... *translation-elongation factor 1- α* = faktor premještanja i izduljenja

POPIS SLIKA

Slika 1. Splet hifa (x400).....	7
Slika 2. Mikološka kultura na modificiranom Sabouraudovom agaru.....	8
Slika 3. Brojne hife u sloju rahle roževine. Hemalaun-eozin (HE) bojanje (x40).....	9
Slika 4. Hife u rahloj roževini. PAS bojanje (x40).....	10
Slika 5. Pregled Woodovom lampom (<i>Malassezia</i> spp.).....	11
Slika 6. Dio sekvence DNK, kliničkog izolata gljive vrste <i>M. canis</i>	14
Slika 7. Wood pretraga (<i>Microsporum canis</i>).....	16
Slika 8. Površinska dermatomikoza vlasišta.....	17
Slika 9. Površinska dermatomikoza vlasišta (detalj).....	18
Slika 10. Kerion Celsi uzrokovan gljivom <i>M. canis</i>	19
Slika 11. Kerion Celsi - upalna tumorska promjena i povećani limfni čvor na vratu.....	20
Slika 12. Površinska dermatomikoza vlasišta uzrokovana vrstom <i>M. canis</i>	28
Slika 13. Duboka dermatomikoza vlasišta uzrokovana vrstom <i>M. canis</i>	29
Slika 14. Kerion Celsi uzrokovan vrstom <i>M. canis</i> - multiple lezije.....	30
Slika 15. Sabouraud agar (modificirani) - kultura <i>M. canis</i>	35
Slika 16. Sabouraud agar (modificirani) - kultura <i>M. canis</i> (stražnja strana Petrijeve zdjelice).....	36
Slika 17. <i>M. canis</i> - mikromorfološke značajke (x100).....	37
Slika 18. <i>M. canis</i> - mikro i makrokonidije (x400).....	37
Slika 19. Prikaz raspodjele kulturom potvrđenih mikoza vlasišta prema dobi (N=966).....	43
Slika 20. Prikaz broja obrađenih bolesnika, kulturom potvrđenih dermatofita i kulturom potvrđene mikoze vlasišta od 2006. do 2015. godine.....	45
Slika 21. Prikaz broja kulturom potvrđenih dermatofita i kulturom potvrđene mikoze vlasišta od 2006. do 2015. godine.....	45
Slika 22. Prikaz raspodjele (udio) mikoza vlasišta uzrokovanih gljivama roda <i>Trichophyton</i> i <i>Microsporum</i>	46
Slika 23. Prikaz broja pozitivnih kultura <i>M. canis</i> od 2006. do 2015. godine.....	48
Slika 24. Elektroforeza na agaroznom gelu PCR produkata umnožene DNK	

korištenjem ITS1-ITS4 početnica.....	49
Slika 25. Elektroforeza na agaroznom gelu PCR produkata DNK korištenjem <i>HinfI</i> restrikcijskog enzima.....	50
Slika 26. Dio sekvence kliničkih izolata <i>M. canis</i>	51
Slika 27. RAPD amplifikacija korištenjem (ACA) ₅ početnice.....	52
Slika 28. RAPD amplifikacija korištenjem (GACA) ₄ početnice.....	53
Slika 29. Usporedba raspodjele dobi prema kliničkoj slici mikoze vlasišta	57
Slika 30. Prikaz ROC krivulje za predikciju duboke mikoze vlasišta prema dobi...	58
Slika 31. Dio sekvence ITS2 regije, vrste <i>M. audouinii</i> , <i>M. canis</i> i <i>M. ferrugineum</i>	63

POPIS TABLICA

Tablica 1. Vrste dermatofita izoliranih na Sabouraudovom agaru.....	4
Tablica 2. Diferencijalne dijagnoze dermatomikoza vlasišta.....	21
Tablica 3. Prikaz obrađenih bolesnika, kulturom potvrđenih dermatofita, kulturom potvrđenih mikoza vlasišta, te udio slučajeva mikoze vlasišta unutar svih dematomikoza.....	42
Tablica 4. Prikaz broja kulturom potvrđenih mikoza vlasišta uzrokovanih vrstama roda <i>Trichopyton</i> i <i>Microsporum</i> prema spolu bolesnika od 2006. do 2015. godine.....	44
Tablica 5. Prikaz broja pozitivnih kultura <i>M. canis</i> od 2006. do 2015. godine.....	47
Tablica 6. Rezultati PCR profila genotipiziranih izolata korištenjem (GACA) ₄ početnice uz podatke o dobi, spolu, mjestu stanovanja te kliničkoj slici mikoze vlasišta.....	55
Tablica 7. Klinička slika mikoze vlasišta i spol ispitanika.....	56
Tablica 8. Usporedba kliničke slike mikoze vlasišta i PCR profila izolata <i>M. canis</i>	56

1. UVOD

Dermatomikoze su bolesti kože i adneksa kože (vlasište, nokti) uzrokovane gljivama. Prevalencija u svjetskoj populaciji je visoka i iznosi 20-25%, stoga su dermatomikoze jedna od najčešćih bolesti unutar skupine dermatoveneroloških bolesti i vrlo česti razlog posjeta liječniku (1).

Gljive su članovi velike skupine eukariotskih organizama i u biološkoj taksonomiji pripadaju zasebnom carstvu, carstvo gljiva - *Regnum fungorum* (2). Danas je poznato oko 100 000 vrsta gljiva, ali svega pedesetak može biti patogeno za čovjeka (3). Gljive mogu uzrokovati: a) površinske mikoze - dermatomikoze, b) sistemske mikoze, no, patogenost gljiva može se očitovati i c) micetizmom kao rezultatom produkcije mikotoksina te d) alergenskom stimulacijom u vidu pojave različitih manifestacija na koži (4).

1.1. Klasifikacija dermatomikoza

Dermatomikoze se načelno mogu podijeliti u tri skupine (3). Treba, ipak, napomenuti da je niže navedena klasifikacija „gruba“ i klinički „orijentirana“, no, ujedno i vrlo svrsishodna:

- dermatomikoze **uzrokovane dermatofitima** ili dermatofitoze,
- dermatomikoze **uzrokovane kvascima** i
- dermatomikoze **uzrokovane plijesnima**.

Dermatofiti su najčešći uzročnici gljivičnih bolesti kože, rasprostranjeni diljem svijeta. Invadiraju površinski rožnati sloj kože, i/ili dlaka i/ili noktiju na način da,

pojednostavljeno gledajući, razgrađuju keratinski sloj. Afinitet dermatofita za keratin i njihova keratinolitička sposobnost ključni su čimbenik za pojavu dermatofitoza.

Pojedine vrste dermatofita parazitiraju samo na čovjeku (**antropofilne gljive**) i iznimno rijetko mogu inficirati druge životinje. **Zoofilne gljive** najčešće parazitiraju na životinjama, ali mogu biti patogene i za ljude, dok **geofilne gljive** prirodno žive u tlu, najčešće na mjestima bogatim raspadnutim produktima animalnog podrijetla (5, 6). Pripadnici svih triju skupina mogu biti patogeni za čovjeka, a najčešće su to zoofilne i antropofilne gljive. U djece i adolescenata najčešći uzročnici dermatomikoza su zoofilne gljive. Izvor i prijenosnik zaraze su najčešće kućni ljubimci, prvenstveno mačka, rjeđe pas, zec, kunić i krupnije domaće životinje (7). Istraživanje provedeno u Italiji pokazalo je da je *M. canis* bio izoliran u čak 40% mačaka i pasa s promjenama na koži (8). No pokazalo se da i asimptomatske životinje mogu biti izvor zaraze (9).

1.2. Etiologija dermatomikoza

Dermatofiti patogeni za čovjeka dijele se u tri dolje navedena roda. Još se uvijek koristi ova klasifikacija budući da za sve vrste patogene za čovjeka nije još verificirana „optički savršena forma“ (*Fungi perfecti*) i mnoge, u tom smislu relevantne vrste, stoga pripadaju širokoj skupini zvanj „*Fungi imperfecti*“. Na temelju toga, neki „klasični“ autori skupinu „*Fungi imperfecti*“ nazivaju i „taksonomskim smetlištem“, no, bolja, a ujedno i praktičnija klasifikacija u dermatološkoj mikologiji još uvijek ne postoji.

Ova podjela dermatofita u uporabi je još od 1934. godine, kada je Chester Emmons revidirao prvu podjelu dermatofita, koju je prethodno objavio Raymond Sabouraud 1910. godine, izbacivši rod *Achorion* (10). Emmons je uzeo u obzir morfologiju spora, dok je Sabouraud podjelu temeljio prvenstveno na kliničkim karakteristikama bolesti uz neka mikroskopska i makroskopska obilježja uzročnika (5).

Sukladno svemu prethodno navedenom navodimo slijedeće rodove dermatofita:

- ***Trichophyton* spp.**,
- ***Microsporum* spp.** i
- ***Epidermophyton* spp.**

U Tablici 1. prikazani su predstavnici navedenih triju rodova dermatofita (11). Tradicionalno, prema rodu uzročnika, dermatofitoze se dijele na:

- **trihofitoze** (trihofitije),
- **mikrosporoze** (mikrosporije) i
- **epidermofitoze** (epidermofitije).

Različite vrste gljiva mogu uzrokovati identičnu kliničku sliku. Stoga samo adekvatna mikološka obrada može pomoći u verifikaciji uzročnika. Verificiranje uzročnika bitno je i zbog epidemioloških razloga. To je osobito relevantno kod zoofilnih uzročnika, gdje možemo naslutiti put prijenosa i otkriti rezervoar zaraze, te kod uzročnika koji se mogu pojaviti kao male „epidemije“ u određenim obiteljima ili sportskim kolektivima (12).

Također u praksi, u uporabi je i podjela prema lokalizaciji dermatomikoze, ne uzimajući u obzir naziv uzročnika. Tako npr. dermatomikoza vlasišta naziva se *dermatomycosis capitis* (DC) ili *tinea capitis* (TC); dermatomikoza šaka - *tinea manuum*; stopala - *tinea pedis* itd.

Tablica 1. Vrste dermatofita izoliranih na Sabouraudovom agaru (11)

<i>Trichophyton</i>	<i>Microsporum</i>	<i>Epidermophyton</i>
<i>T. mentagrophytes</i> var. <i>granulosa</i> seu <i>mentagrophytes</i>	<i>M. canis</i> <i>M. ferrugineum</i>	<i>E. floccosum</i>
<i>T. mentagrophytes</i> var. <i>interdigitalis</i>	<i>M. gypseum</i>	
<i>T. rubrum</i>	<i>M. audouinii</i>	
<i>T. verrucosum</i>	<i>M. amazonicum</i>	
<i>T. violaceum</i>	<i>M. cookei</i>	
<i>T. ajelloi</i>	<i>M. equinum</i>	
<i>T. concentricum</i>	<i>M. fulvum</i>	
<i>T. equinum</i>	<i>M. gallinae</i>	
<i>T. gourvilii</i>	<i>M. nanum</i>	
<i>T. megninii</i>	<i>M. persicolor</i>	
<i>T. schoenleinii</i>	<i>M. praecox</i>	
<i>T. simii</i>	<i>M. racemosum</i>	
<i>T. terrestre</i>	<i>M. vanbreuseghemii</i>	
<i>T. yaoundei</i>		

1.3. Patogeneza

Patogeneza dermatomikoza rezultat je odnosa između invazivne sposobnosti gljive i imunog odgovora domaćina. Gljive imaju keratinolitičku sposobnost. Produkcijom enzima keratinaze, razlažu citokeratin, bjelančevinski kompleks koji se nalazi u rožnatom sloju kože, u kosi i u noktima te tako prodiru u tkivo (13). Infekcije uzrokovane antropofilnim uzročnicima najčešće su karakterizirane nešto slabijom upalnom reakcijom i imaju najčešće karakteristiku dugotrajnih, kroničnih infekcija. Intenzivna i burna upalna reakcija karakterističnija je za zoofilne i geofilne predstavnike (14).

Smatra se da manan, glukoprotein koji je sastavni dio stijenke gljivičnih organizama utječe na inhibiciju proliferacije limfocita domaćina, što dovodi do supresije imunog odgovora domaćina, te tako pomaže adherenciji uzročnika u tkivo. Blake i sur. ispitivali su *in vitro* aktivnost manan glukoproteina kod antropofilnog uzročnika *T. rubrum* i kod zoofilnog uzročnika *M. canis*. Manan glukoprotein je bio izoliran u znatno većoj količini kod *T. rubrum*, te pokazao je veću inhibitornu aktivnost u usporedbi s *M. canis* (15).

Hidrolitičkom aktivnošću uzročnici progrediraju u tkivo lučenjem cistein dioksidaze, koja je odgovorna za prekid disulfidnih veza keratina (16). Pokazalo se da dermatofiti *in vitro* izlučuju više od dvadeset proteaza, koje pripadaju velikim skupinama subtilizina ili serin proteaza, te fungilizina ili metaloproteaza (17). Keratinolitičke proteaze slične subtilizinu koje su izolirane u kulturi *M. canis*, izlučuju se od strane uzročnika *in vivo* i predstavljaju polipeptide veličine 31,5 kDa (18, 19).

S druge strane, u obrani domaćina sudjeluju nespecifični i specifični imunološki mehanizmi. Intaktna koža barijera je za prolaz patogenih gljiva. Izloženost ultraljubičastom svjetlu, kao i kompetitivni rast ostalih mikroorganizama, posebice bakterija, također nepovoljno utječe na rast gljiva na koži. No, oštećena koža, vlaga i okluzija mogu pogodovati invaziji dermatofita. Zasićene masne kiseline loja, koje se luče nakon puberteta, djeluju inhibitorno na rast dermatofita, stoga se dermatomikoze vlasišta značajno rjeđe pojavljuju u razdoblju nakon puberteta (4).

U specifičnoj obrani organizma, smatra se da sudjeluju i humoralna i stanična imunost, ali stanična imunost i odgođena imunološka reakcija igra bitniju ulogu u tom

procesu (4). Tijekom dermatofitne infekcije, dermatofitni antigen aktivira T supresorne i T pomoćničke stanice. U prezentaciji antigena sudjeluju Langerhansove stanice koje „predstavljaju“ antigen imunokompetentnim stanicama, nakon čega slijedi upalna reakcija različitog intenziteta, karakterizirana aktivacijom makrofaga, te lučenjem određenih upalnih citokina, prvenstveno interferon gama (IFN- γ) (5, 20).

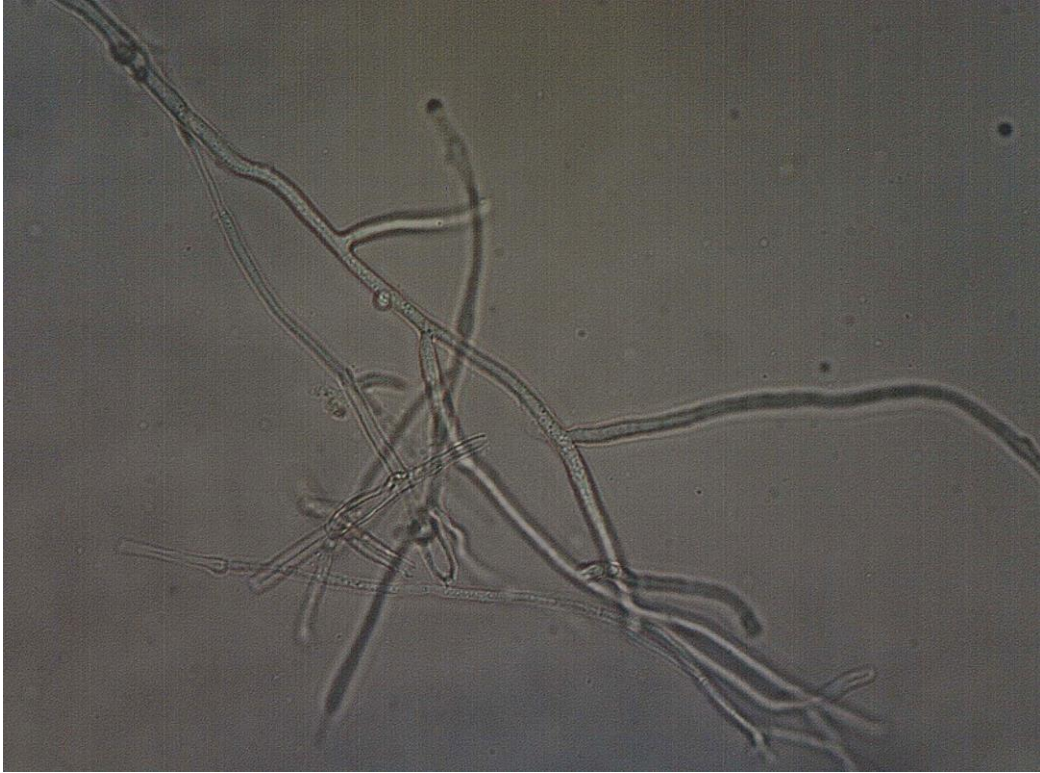
Keratinociti tijekom gljivične infekcije izlučuju široki spektar citokina koji se razlikuju u ovisnosti od uzročnika dermatofitne infekcije. Kao odgovor na upalu kod zoofilnih uzročnika, keratinociti mogu izlučivati protuupalne citokine, kemokine i imunomodulatorne citokine, najčešće IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-13, IL-15, IL-16, IL-17 i interferon- γ . Kod antropofilnih uzročnika, imuni odgovor domaćina je slabiji, spektar izlučenih citokina je smanjen, te se najčešće izlučuje eotaksin-2, IL-8 i IL-16 (21).

1.4. Dijagnostika

Nakon kliničke sumnje na dermatomikozu, dijagnozu je potrebno laboratorijski verificirati. U tu svrhu izvodi se nativni mikroskopski pregled i kultura.

1.4.1. Nativno mikroskopiranje i kultura

Postupak laboratorijske dijagnostike dermatomikoze započinje adekvatnim uzimanjem materijala iz kože, vlasi i/ili nokta. Dobiveni materijal preparira se 20%-tnim kalijevim hidroksidom (KOH), koji razgrađuje keratin, te se gljivični elementi bolje uočavaju tijekom mikroskopskog pregleda (Slika 1). Nativna mikološka obrada u nekim slučajevima može biti i lažno negativna i to prema podacima iz literature u 5-15% slučajeva (22).



Slika 1. Splet hifa (x400)

U svrhu kultivacije, materijal se nanosi na posebnu hranjivu podlogu, najčešće modificirani Sabouraudov agar SDA (od engl. *Sabouraud Dextrose Agar*). To je modifikacija hranjive podloge koju je prvi opisao Raymond Sabouraud 1892. godine, koja sadrži visoku koncentraciju dekstroze kiselog pH, što omogućava selektivni rast gljiva (5). Selektivnost se povećava dodavanjem određenih inhibitora i antibiotika kao npr. cikloheksimida, kloramfenikola, ili gentamicina (23). Materijal se kultivira oko 14 dana na temperaturi od oko 25°C (Slika 2).

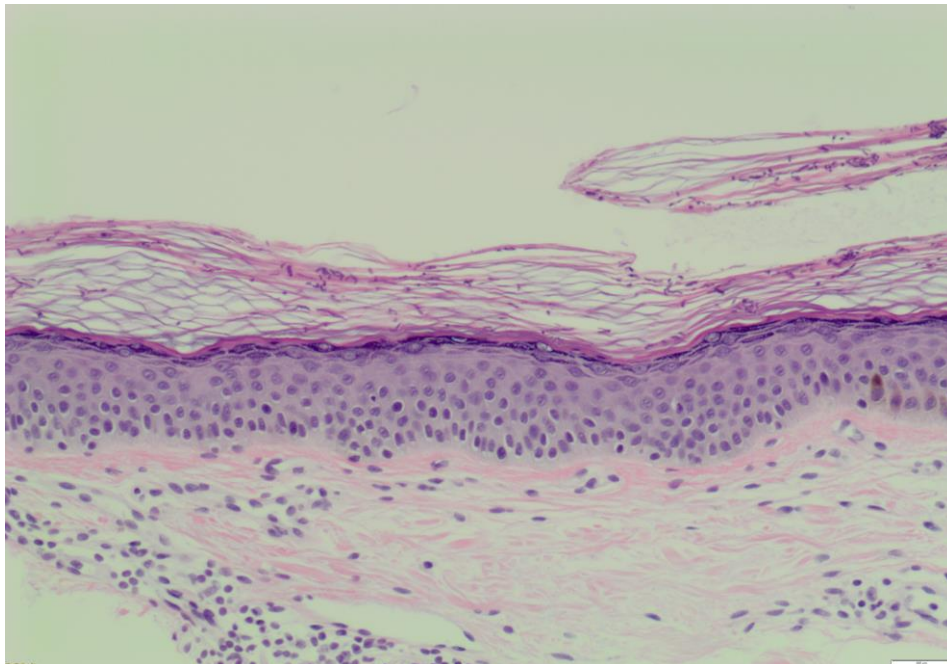


Slika 2. Mikološka kultura na modificiranom Sabouraudovom agaru

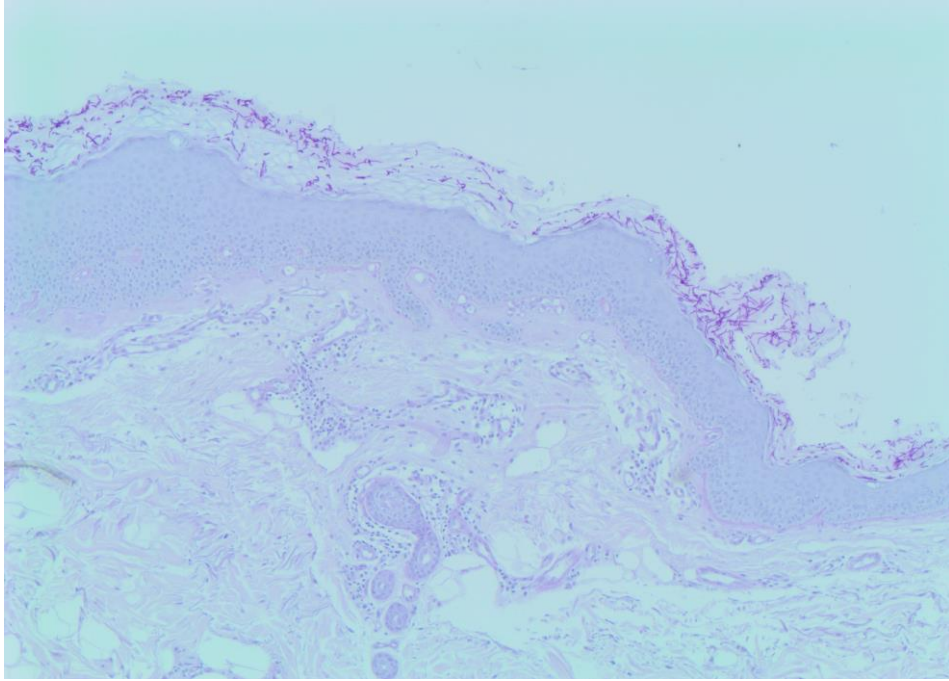
Na temelju makroskopskog i mikroskopskog izgleda kolonija, verificira se uzročnik i postavlja etiološka dijagnoza. Kultivacija je posebice nužna kada je indicirana sistemska antifungalna terapija, npr. kod mikoza vlasišta i noktiju.

1.4.2. Histološka analiza

Iznimno, u nejasnim slučajevima i kod dubokih mikoza koristi se i histološka analiza bioptata kože (Slika 3). U tu svrhu, kako bi se prikazali micelijski elementi koriste se posebna bojanja bioptiranog materijala i to najčešće PAS (od engl. *periodic-acid Schiff*) (Slika 4), ili impregnacijom srebrom po Grocott-u. Prema nekim autorima histološka dijagnostika onihomikoza PAS bojanjem je osjetljivija nego klasična mikološka obrada (24). No, nedostatak histološke metode je relativna invazivnost i nemogućnost verifikacije vrste gljive.



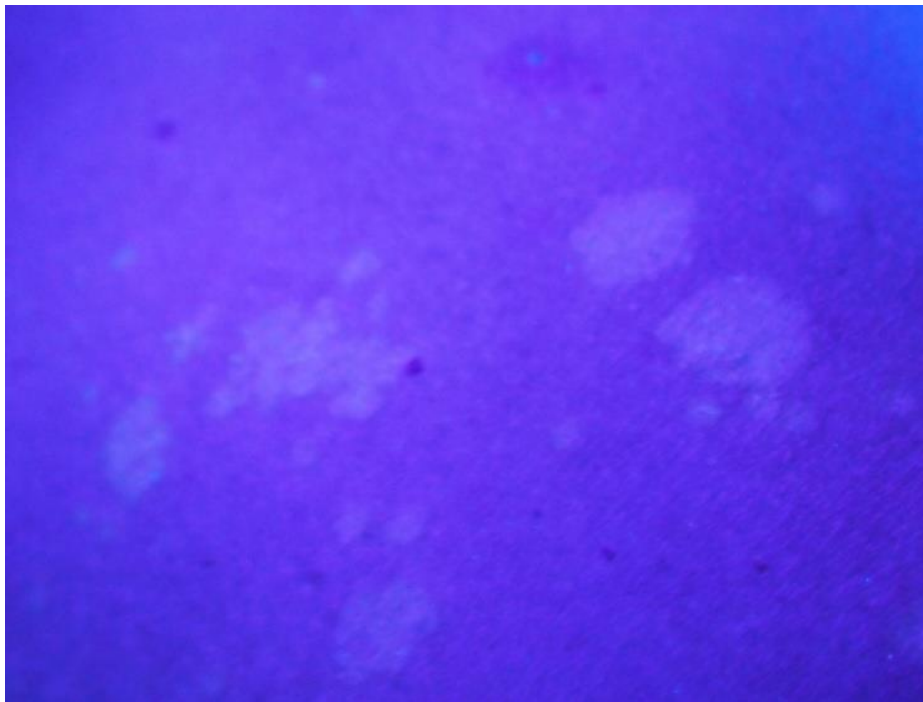
Slika 3. Brojne hife u sloju rahle roževine. Hemalaun-eozin (HE) bojanje (x40)



Slika 4. Hife u rahloj roževini. PAS bojanje (x40)

1.4.3. Pregled ultravioletnim svjetlom (Woodovom lampom)

Koristi se ultraljubičasto svjetlo valne duljine 360 nm. Nakon obasjavanja, neke gljivične promjene fluoresciraju točno određenom bojom. Tako na primjer *Microsporum canis* fluorescira zeleno, *Malassezia* spp. fluorescira zlatno-žuto (Slika 5) itd. Ova metoda nije osjetljiva poput mikroskopske detekcije micelijskih elemenata, odnosno kultivacije.



Slika 5. Pregled Woodovom lampom (*Malassezia* spp.)

1.4.4. Molekularna dijagnostika

Rutinska laboratorijska dijagnostika dermatofita sastoji se, dakle, od direktne mikroskopske pretrage i mikološke kulture. Iako je kultivacija uzročnika precizna dijagnostička metoda, zahtijeva najmanje dva tjedna do konkluzivne interpretabilnosti rezultata (osim kod nekih vrsta kvasaca kad se verifikacija kulturom može zaključiti i ranije), nužan je adekvatan prostor i educirano osoblje, no i unatoč tome ne može se koristiti u dijagnostici određenih podtipova dermatofita.

Razvoj molekularne tehnologije omogućio je primjenu različitih specifičnih i osjetljivih molekularnih metoda u dijagnostici različitih mikroorganizama, uključujući i gljive (25). Nukleinska ribosomalna DNK (rDNK) gljiva sastoji se od 3 gena: velika podjedinica (25S), mala podjedinica (18S) i 5.8S gena, odvojeni ITS (od engl. *internal transcribed spacer*) regijama. ITS regije prisutne su u svim dermatofitima zbog čega su vrlo često upravo ITS1 ili/i ITS2 ciljne regije u molekularnoj dijagnostici gljiva (26, 27). Zbog varijabilnosti, pogodne su za razvoj specifičnih PCR (od engl. *Polymerase Chain Reaction*) početnica za identifikaciju vrste (27-29).

Neka istraživanja upućuju na to da je korištenje ITS1 regije bolje u diferencijaciji *T. rubrum*, *T. soudanense* i *T. violaceum*, s obzirom da navedene vrste dermatofita imaju slične ITS2 regije. Međutim, korištenje ITS2 regije dalo je bolje rezultate u diferencijaciji vrsta *M. canis*, *M. audouinii* i *M. ferrugineum* (29, 30).

Dijagnostika gljiva znatno je promijenjena sredinom osamdesetih godina prošlog stoljeća, uvođenjem PCR metode, posebice u području znanosti. Nova biološka taksonomija gljiva zasniva se poglavito na molekularnim metodama (2, 12, 31, 32).

1.4.4.1. Lančana reakcija polimeraze

Lančana reakcija polimeraze ili PCR (od engl. *Polymerase Chain Reaction*) je eksponencijalno umnožavanje specifičnih ciljnih regija ponavljanim ciklusima sinteze oligonukleotidnih lanaca, do detekcijske razine. Konvencionalna PCR je kvalitativna, ne kvantitativna metoda i koristi se u detekciji i identifikaciji gljiva. Danas su u primjeni različite slične modificirane metode i daljnji razvoj molekularne tehnologije usmjeren je ka komercijalizaciji u dijagnostičkom smislu. Određene molekularne metode omogućuju detekciju uzročnika izravno iz kliničkog materijala, što omogućuje dobivanje brzih nalaza, za samo nekoliko sati, uključujući i dijagnozu onihomikoza (33-36).

1.4.1.2. Enzimaska razgradnja produkata PCR-a

PCR-RFLP (od engl. *Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism*) ili enzimaska razgradnja produkata PCR-a, je molekularna metoda koja se koristi u identifikaciji dermatofita. Ova metoda se temelji na izboru nekoliko „restriksijskih“ enzima koji dio genoma dermatofita umnožen PCR-om, cijepaju na točno određenom mjestu ovisno o specifičnom nukleotidnom rasporedu. Specifični raspored fragmenata odgovara određenim genotipovima (37).

1.4.1.3. Nasumična amplifikacija polimorfne DNK

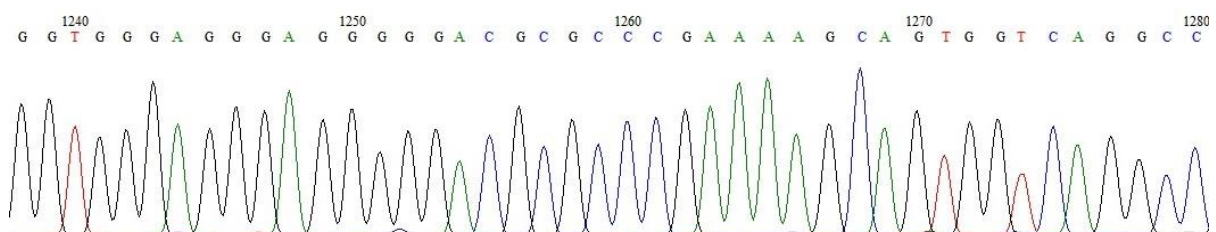
Nasumična amplifikacija polimorfne DNK ili RAPD (od engl. *Random Amplified Polymorphic DNA*) je vrsta PCR reakcije u kojoj su umnožavajući segmenti DNK slučajni (38). RAPD početnice su dekameri, dugački 10 nukleotida. Mjesto gdje će se početnica vezati je slučajno, te za razliku od „tradicionalnih“ PCR analiza, za RAPD analizu nije potrebno prethodno poznavanje DNK sekvencija ciljnih genoma. Produkti dobiveni PCR-om ovise od dužine početnice i od dužine samog ciljnog genoma. Polimorfizam koji je rezultat mutacija ili promjene redoslijeda nukleotida prikazuje se kao prisustvo ili odsustvo fragmenata (vrpce) RAPD reakcije na agaroznom gelu.

1.4.1.4. Sekvenciranje

Sekvenciranje je metoda kojom je moguće utvrditi redoslijed nukleotida DNK i RNK. Za identifikaciju vrste dermatofita određuje se slijed nukleotida ITS1 i ITS2 regija rDNK (29). Do danas je razvijeno više metoda određivanja sekvencija DNK (39-41).

Određivanje slijeda nukleotida u molekuli DNK Sangerovom dideoksi metodom bazira se na zaustavljanju sinteze DNK molekule nakon ugradnje dideoksiribonukleozid-trifosfata (ddNTP). Tijekom prirodnog ciklusa sinteze DNK, u lanac se ugrađuju deoksiribonukleozid-trifosfati (dNTP) pomoću enzima DNK polimeraze, između kojih se stvara fosfodieterska veza te se lanac produžuje ugradnjom svakog slijedećeg dNTP-a. DNK polimeraza može tijekom sinteze lanca DNK u njega ugraditi i dideoksiribonukleozid-trifosfate (ddNTP) koji, zbog nedostatka hidroksilne skupine na 3'-mjestu deoksiriboze, ne mogu stvoriti slijedeću fosfodietersku vezu te se sinteza lanca zaustavlja (39).

U izvođenju kapilarne elektroforeze koriste se komercijalni kompleti za sekvenciranje DNK pomoću automatskih kapilarnih instrumenata iz ABI (od engl. *Applied Biosystems*) serije. Na kraju reakcije može se očitati krivulja u kojoj je svaki nukleotid DNK lanca označen drugom bojom te se može isčitati kompletna sekvenca uzorka (Slika 6).



Slika 6. Dio sekvence DNK, kliničkog izolata gljive vrste *M. canis*. Vidi se slijed nukleotida označenih različitim bojama: zeleno - A (adenin), crno - G (guanin), crveno - T (timin) i plavo - C (citozin)

1.5. Dermatomioze vlasišta

Dermatomikoza vlasišta ili *tinea capitis* (TC) je gljivična bolest vlasišta uzrokovana dermatofitima roda *Microsporum* ili *Trichophyton*, dok pripadnici roda *Epidermophyton* ne uzrokuju dermatomioze vlasišta. Prema nekim autorima sam naziv *tinea capitis* odnosi se na bolest vlasišta, obrva i brade (42, 43).

Dermatomikoza vlasišta se dominantno pojavljuje kod djece prije puberteta (v. ranije u tekstu!), i to najčešće u dobi od 3 do 7 godina (44, 45). Zabilježeni su slučajevi dermatomioze i prije prve godine života (46, 47). Dermatomioze vlasišta se mogu pojaviti i kod adolescenata, a kod odraslih se pojavljuju znatno rjeđe (48, 49). No, zadnjih desetak godina zabilježen je porast dermatomioza vlasišta i kod odraslih (44).

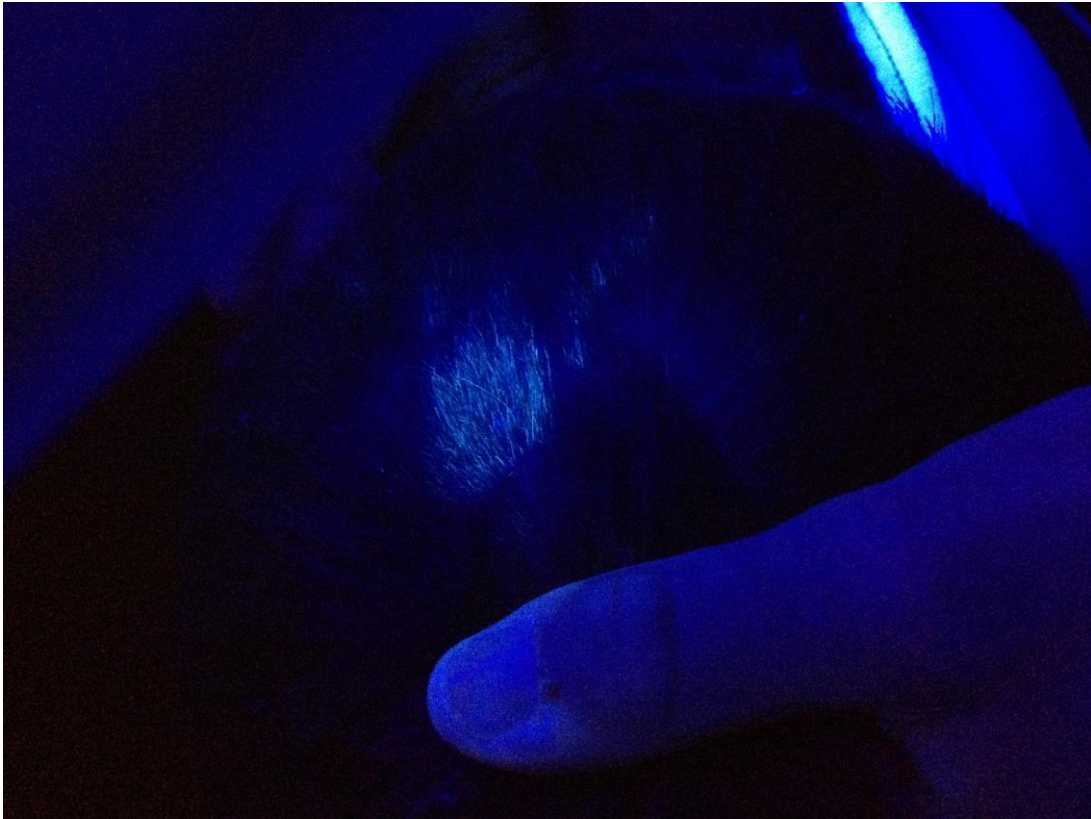
Podaci o prevalenciji prema spolu su relativno kontroverzni. Prema nekim autorima, prevalencija kod dječaka je bila veća (50-52), dok prema drugim autorima dermatomioze vlasišta su bile češće kod djevojčica (53). Relativno noviji podaci pokazuju da nema znatne razlike u pojavi dermatomioza vlasišta kod dječaka i djevojčica (44, 54).

1.6. Klinička slika dermatomioza vlasišta

Prema načinu gljivične invazije dlake, dermatomioze vlasišta se mogu podijeliti na tzv. **ectothrix** tip invazije, **endothrix** tip invazije, te kao poseban oblik opisuju se promjene kod favusa. Do ovakvog pristupa u podjeli dermatomioza vlasišta došlo je u pedesetim godinama prošlog stoljeća, razvojem „testa perforacije dlaka“, što je dovelo i do određenih promjena u taksonomiji gljiva (55-57).

Infekcija započinje penetracijom hifa u *stratum corneum* vlasišta. Nakon nekoliko tjedana gljiva kolonizira korijen i ovojnicu dlake. *Ectothrix* tip invazija dlake karakterizira se dominantnim rastom gljivičnih elemenata, hifa i spora (*arthroconidia*) u području vanjskog dijela dlake (5). Kod ovakvog oblika invazije, dlake obično

fluoresciraju zeleno-žuto pod Woodovim svjetlom, što se može koristiti u dijagnostici, te u probiru asimptomatskih nositelja (Slika 7). *Ectothrix* tip invazije je karakterističan za *M. canis*, *M. gypseum*, *M. audouinii*, *M. ferrugineum*, *T. equinum* i *T. verrucosum*.



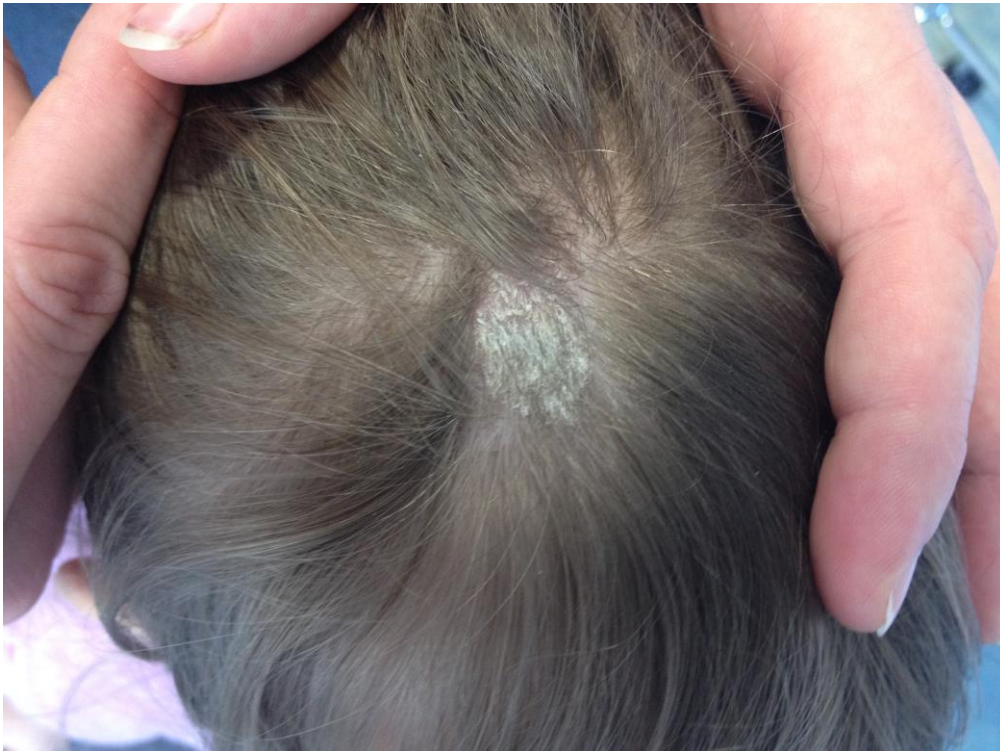
Slika 7. Wood pretraga (*Microsporum canis*)

Kod *endothrix* tip invazije dlaka, karakterističan je dominantan raspored micelijskih elemenata unutar dlake. *Endothrix* tip invazije se pojavljuje kod *T. tonsurans*, *T. violaceum* i kod *T. soudanense*. S obzirom da kutikula dlake ostaje intaktna, ove promjene ne fluoresciraju pod Woodovim svjetlom (58).

Favički oblik destrukcije dlaka je karakterističan za favus (kako i samo ime kaže) uzrokovan gljivom vrste *T. schoenleinii*, što se manifestira pojavom posebne

formacije zvane *scutulum* (11). Ipak, faviformni tip destrukcije može se ponekad pojaviti i kod drugih uzročnika.

Prema kliničkom izgledu promjena, dermatomikoze vlasišta mogu biti **površinske** (neinflamatorne) i **duboke** (inflamatorne), i predstavljaju dva različita i dobro definirana klinička entiteta. Površinske dermatomikoze vlasišta manifestiraju se karakterističnim okruglastim žarištima (Slika 8), prekrivenim pitirijaziformnim ili adherentnim ljuskama, u kojima se vidi „slomljena“, dekolorirana kosa (Slika 9).



Slika 8. Površinska dermatomikoza vlasišta



Slika 9. Površinska dermatomikoza vlasišta (detalj)

Duboka mikoza vlasišta, (**kerion Celsi**) karakterizirana je pojavom jake upalne reakcije. Na mjestu infekcije vidljive su purulentne papule i plakovi, kao i gubitak dlaka, koji može biti i trajan ukoliko se promjene ne liječe na vrijeme (Slika 10). Često su promjene praćene pojavom općih simptoma i povećanjem regionalnih limfnih čvorova (Slika 11) (42).



Slika 10. Kerion Celsi uzrokovan gljivom *M. canis*



Slika 11. Kerion Celsi - upalna tumorska promjena i povećani limfni čvor na vratu

1.7. Diferencijalna dijagnoza dermatomikoza vlasišta

U ovisnosti od kliničke manifestacije dermatomikoza vlasišta, spektar dermatoza koje diferencijalno dijagnostički mogu doći u obzir je velik. Klinička prezentacija sa slabom upalnom reakcijom i ljuskama, diferencijalnodijagnostički uključuje, između ostalog, seboroički dermatitis, atopijski dermatitis i psorijazu. Također, gljivična infekcija se treba isključiti kod alopecije areate i kod nekih oblika trihotilomanije.

Kod kliničke manifestacije praćene jakom upalnom reakcijom, u obzir mogu doći primarne piodermije u vidu abscesa i folikulitisa, no, sam izolat zlatnog stafilokoka ne isključuje dijagnozu duboke mikoze vlasišta, s obzirom na mogućnost sekundarne piodermatske infekcije. Kod ožiljkastih promjena koje mogu biti posljedica dermatomikoza vlasišta s jakom upalnom reakcijom i pogotovo kod neprepoznatih i neprikladno liječenih slučajeva diferencijalnodijagnostički prvenstveno se trebaju isključiti *lupus erythematosus* i *lichen planopilaris* (Tablica 2).

Tablica 2. Diferencijalne dijagnoze dermatomikoza vlasišta (11)

Pitirijaziformne promjene	Inflamatorne promjene	Ožiljkaste promjene
<i>Dermatitis seborhoica</i>	<i>Pyodermia</i>	<i>Lichen planopilaris</i>
<i>Alopecia areata</i>	<i>Folliculitis</i>	<i>Lupus erythematosus discoides</i>
<i>Trichotillomania</i>	<i>Abscessus</i>	<i>Folliculitis decalvans capilitii</i>
<i>Psoriasis</i>		<i>Alopecia cicatricans</i>

1.8. Terapija dermatomikoza vlasišta

Osnovni cilj terapije je postići kliničku i mikološku regresiju promjena u što je moguće kraćem roku, kako bi se, između ostalog, izbjegle posljedice bolesti u vidu trajne ožiljkaste alopecije. Također, liječenjem se smanjuje mogućnost prijenosa infekcije na druge osobe, posebice među članovima obitelji i u dječjim kolektivima. Kako bi se postigli navedeni ciljevi, u liječenju dermatomikoza vlasišta neophodna je i sustavna terapija (59). Korištenje samo lokalne terapije je vrlo važno, no najčešće nije dovoljno (60).

1.8.1. Lokalna terapija

Lokalna terapija koristi se u liječenju dermatomikoza vlasišta, između ostalog i zato da bi se smanjila mogućnost širenja spora u okolini. Za površinske dermatomikoze, u obliku šampona se najčešće koristi 2% ketokonazol, 1% selenium sulfid ili sličan pripravak (60, 61). Lokalni antimikotici su dostupni u različitim oblicima, kao masti, kreme ili otopine.

Prvi i najčešće korišteni antimikotici su azoli, derivati imidazola i to najčešće klotrimazol, mikonazol, zatim polienski derivat (alilamin) naftifinklorid, kao i azoli novije generacije kao što su ekonazol, bifonazol i sertakonazol. Alilamini su specifični inhibitori skvalen epoksidaze, enzima odgovornog za normalnu sintezu ergosterola kod gljiva. Imaju uži spektar djelovanja i djeluju na skupinu dermatofita. Najstariji predstavnik je naftifin, koji se koristio samo kao lokalni pripravak. Noviji predstavnik je terbinafin, koji se, osim u lokalnoj terapiji, koristi i u peroralnom liječenju dermatofitoza (43).

1.8.2. Sustavna terapija

Prije početka sustavne terapije uzročnik se mora, u načelu, laboratorijski verificirati na temelju rezultata mikološke obrade (nativni preparat i kultura), što je

bitno i radi daljnjeg praćenja uspjeha same terapije. Postoje različita mišljenja oko toga da li započeti terapiju odmah nakon pozitivnog mikroskopskog nalaza ili nakon verificiranja uzročnika mikološkom kulturom. Prema nekim autorima ipak, smatra se opravdanim započeti terapiju odmah nakon pozitivnog mikroskopskog nalaza, kako bi se izbjeglo čekanje ponekad 2-4 tjedna, koliko je potrebno za kultivaciju uzročnika (62-64).

1.8.2.1. Grizeofulvin

Grizeofulvin je fungistatski antimikotik koji sprječava biosintezu nukleinskih kiselina. U nekim zemljama kao što su Njemačka, SAD i UK, unatoč pojavi novijih antimikotika, grizeofulvin je i dalje „zlatni standard“ u liječenju dermatomikoza vlasišta i predstavlja prvu liniju terapije mikrosporoze vlasišta (46, 59, 65, 66). Prema nekim istraživanjima, grizeofulvin se pokazao učinkovitijim u usporedbi s terbinafinom, u liječenju mikrosporoze vlasišta, iako podaci nisu sasvim konzistentni (67).

Nalazi se u obliku tableta i oralne suspenzije i to u mikroliofiliziranom i ultramikroliofiliziranom obliku. Preporučene dnevne doze kod djece su 10-20 mg/kg tjelesne težine. U rezistentnim slučajevima doza se može povisiti i do 25 mg/kg tjelesne težine (59).

U Republici Hrvatskoj nije (više) registriran, a koristi se u nekim slučajevima mikoze vlasišta kod djece.

Terapija grizeofulvinom je dugotrajna, s obzirom da se grizeofulvin ne zadržava u keratinocitima. To je razlog zašto je u nekim zemljama potpuno zamijenjen oralnim antimikoticima novije generacije.

1.8.2.2. Terbinafin

Terbinafin je jedini predstavnik iz skupine alilaminskih antimikotika koji se koristi i u sustavnoj terapiji. Fungicidno djeluje na dermatofite, no pokazao se učinkovitijim u liječenju dermatofitoza uzrokovanih vrstama roda *Trichophyton*, a nešto je manje, čini se, učinkovit u liječenju mikrosporoza (67-70). Izrazito je lipofilan i nalazi se u većoj koncentraciji u loju. S obzirom na nerazvijenost lojnica u djece prije puberteta prijenos pomoću loja je otežan. Tako spore u tzv. *ectothrix*

obliku infekcija ostaju izvan dometa lijeka, što ponekad rezultira relativnom neučinkovitošću terbinafina u liječenju mikrosporoza (59, 71).

Komercijalno je dostupan u obliku tableta. Preporučene terapijske doze u djece nakon druge godine života su 62,5 mg do 20 kg tjelesne težine, 125 mg kod djece 21-40 kg tjelesne težine, te 250 mg kod odraslih i kod djece iznad 40 kg tjelesne težine. Prema nekim istraživanjima, potrebne su više doze terbinafina od preporučenih u terapiji mikrosporoza vlasišta, kako bi se postigla terapijska učinkovitost (72, 73).

U SAD terbinafin je dostupan u granulama i preporučene doze u djece iznad četvrte godine su nešto veće i to 125 mg do 25 kg tjelesne težine, 187,5 mg, 25-35 kg i 250 mg iznad 35 kg.

1.8.2.3. Itrakonazol

Itrakonazol je antimikotik fungicidnog i fungistatskog djelovanja. Sprječava sintezu ergosterola i time utječe na propustljivost stanične membrane. Dnevne doze 50-100 mg ili 5 mg/kg tjelesne težine u trajanju 4-8 tjedana, kontinuirano ili kao pulsna terapija, pokazale su učinkovitost, koja se može komparirati s grizeofulvinom i terbinafinom (74). Oralna suspenzija se koristi u dozi 3-5 mg/kg tjelesne težine u trajanju od 4 tjedna (66, 75). Prema nekim istraživanjima itrakonazol je bio učinkovit i siguran u liječenju dermatomikoza vlasišta u najranijoj dobi (76). U Austriji i Njemačkoj, lijek nije registriran za terapiju dermatofitija u dječjoj dobi (77).

1.8.2.4. Flukonazol

Flukonazol se iznimno rijetko koristi u terapiji dermatomikoza vlasišta, unatoč nekim podacima iz literature o učinkovitosti flukonazola u liječenju mikrosporoza vlasišta (78-80). U Njemačkoj je registriran za liječenje dermatomikoza vlasišta nakon prve godine života, dok u UK nije preporučen u terapiji dermatomikoza prije desete godine života (59, 81).

Preporučene pedijatrijske doze su 6 mg/kg tjelesne težine dnevno ili 6-8 mg/kg tjelesne težine jednom tjedno u trajanju 4-8 tjedana (66).

1.9. Epidemiologija dermatomikoza vlasišta

Dermatomikoze vlasišta su rasprostranjene diljem svijeta. Epidemiologija dermatomikoza vlasišta je različita u različitim geografskim područjima svijeta i mijenja se tijekom vremena. Zadnjih 100 godina spektar uzročnika dermatofitoza se znatno mijenjao, što je povezano i s promjenom načina života (7). Uvođenjem grizeofulvina, kao prvog peroralnog antimikotika za liječenje dermatofita, 1958. godine, došlo je do potpune promjene etiologije dermatomikoza vlasišta u Europi pa čak i do, vjerovalo se, potpunog nestanka nekih uzročnika kao što su *M. audouinii* i *T. schoenleinii* u zemljama Srednje Europe (77, 82).

U današnje vrijeme pojavom učestalih migracija stanovništva prema urbanim regijama, ponovno se mijenja etiologija i epidemiologija dermatomikoza, posebice dermatomikoza vlasišta, uključujući i ponovnu pojavu nekih uzročnika (*M. audouinii* i *T. schoenleinii*) za koje se vjerovalo da su eradicirani u Europi.

U SAD, prevalencija dermatomikoza vlasišta u pedijatrijskoj populaciji je 3-8%, dok je prevalencija u školske djece čak 13% (83, 84). Sinski i sur. u nekoliko su istraživanja u razdoblju 1979.-1987. dokazali da je *T. tonsurans* najzastupljeniji uzročnik mikoza vlasišta u SAD, s trendom opadanja od 32% na 18% tijekom razdoblja istraživanja (85-87).

Prema nekim autorima, *T. tonsurans* je „uvezen“ u SAD iz područja Srednje Amerike i Kariba u pedesetim godinama prošlog stoljeća, te je postao najzastupljeniji uzročnik mikoza vlasišta u urbanim sredinama (88, 89).

U zemljama Srednjeg Istoka epidemiologija varira u različitim regijama. U istraživanju provedenom u području sjevernog dijela Irana, dermatomikoza vlasišta je zastupljena u 32,5% slučajeva svih dermatomikoza, te je *T. violaceum* odgovoran za najveći postotak dermatomikoza vlasišta (27% slučajeva) (90). Za razliku od ruralnih područja Irana, u urbanoj regiji, u Teheranu, mikoza vlasišta je bila najmanje zastupljena od svih dermatomikoza i to u samo 3,6% slučajeva (91).

U Africi je mikoza vlasišta izraziti problem, te ovisno o regiji najčešći su uzročnici *M. audouinii*, *T. soudanense*, te *T. violaceum* (92, 93).

Prevalencija dermatomikoza vlasišta u Europi je oko 1%. Istraživanje provedeno u Njemačkoj, nakon uvođenja grizeofulvina u sistemsku terapiju dermatomikoza, pokazuje da je u razdoblju od 1967. do 1971. godine, od 38738 bolesnika sa dermatomikozom bilo samo 18 slučajeva dermatomikoza vlasišta i kod svih je bolesnika kao uzročnik, bio verificiran *M. canis* (94).

Zadnjih tridesetak godina, u zemljama Srednje Europe i Mediterana, bilježi se dominacija zoofilnih uzročnika, prvenstveno *M. canis*. U susjednoj Italiji, istraživanje provedeno u Firenci u razdoblju 1985.-1990. pokazuje da *M. canis* uzrokuje mikoza vlasišta u čak 96% slučajeva, te da nije bio izoliran niti jedan antropofilni uzročnik (95). U istraživanju provedenom u Bariju, u razdoblju od 2005. do 2010. godine, *M. canis* je bio najčešći uzročnik (58% slučajeva). U usporedbi s nekoliko prethodnih istraživanja provedenih na istom mjestu, mikoza vlasišta pokazuje trend opadanja i to od 29% u razdoblju 1975.-1979., na čak 4% u razdoblju od 2005.-2010. godine (96). Istraživanje provedeno u Rimu u razdoblju 1985.-1995. također pokazuje da je *M. canis* u čak 91% slučajeva bio uzročnikom mikoze vlasišta (97).

Slična je bila situacija i u ostalim bližim i susjednim zemljama. U Austriji je u razdoblju od 1985. do 2008. godine, *M. canis* bio najzastupljeniji uzročnik, u 84,4% slučajeva (98). U susjednoj Sloveniji, prvi slučajevi mikrosporoze zabilježeni su 1977. godine u bolesnika iz pograničnih dijelova s Italijom (99). U epidemiološkom istraživanju provedenom u razdoblju od 1995. do 2002. godine dokazano je da je *M. canis* najzastupljeniji uzročnik dermatomikoza, posebice mikoze vlasišta u području Ljubljane, no, ipak, s trendom opadanja (100).

Novija istraživanja provedena u Italiji pokazuju nešto drugačiju sliku. U razdoblju od 2004. do 2011. godine, u istraživanju provedenom u Milanu, pokazalo se da *M. canis* više nije vodeći uzročnik dermatomikoza vlasišta, te da u najvećem broju slučajeva, čak u 47,2% uzročnik je bio *T. violaceum*, većinom u djece koja su imigrirala u Italiju (101). Švedska studija provedena u razdoblju od 2005. do 2009. godine pokazuje slično stanje. Antropofilni uzročnici dominiraju i to *T. violaceum* u 63,8% slučajeva, a zatim *M. audouinii* (8,2%), te *T. tonsurans* (5,8%). *M. canis* je bio uzročnik u samo 0,4% slučajeva (102). U Švicarskoj je u razdoblju od 2006. do 2013. godine, najčešći uzročnik bio *T. violaceum* i to najčešće dijagnosticiran u djece iz Eritreje, gdje se *T. violaceum* nalazi endemski (103).

1.10. Promjena kliničkog obrasca mikrosporoze vlasišta

U Republici Hrvatskoj zadnjih tridesetak godina opažaju se znatne promjene u epidemiologiji, etiologiji i u kliničkoj slici dermatomikoza vlasišta, posebice dermatomikoza uzrokovanih uzročnicima roda *Microsporum* (52, 104).

U Laboratoriju za dermatološku mikologiju i parazitologiju u Klinici za dermatovenerologiju Kliničkog bolničkog centra Zagreb, godine 1978. kulturom je bio verificiran samo jedan slučaj *M. canis* (105). Godine 2008. bilo je čak 328 pozitivnih kultura (52).

M. canis bio je vodeći uzročnik dermatomikoza i u Splitsko-dalmatinskoj regiji, u razdoblju 1996.-2002. (106). U Primorsko-goranskoj regiji, gdje su zabilježeni prvi slučajevi zoofilne mikrosporoze u Hrvatskoj, najvjerojatnije „uvezeni“ iz obližnje Italije, u razdoblju od 1988. do 2008. godine, čak 98,6% dermatomikoza vlasišta bile su uzrokovane vrstom *M. canis* (107). U razdoblju od 1999. do 2008. godine zabilježen je trend pada incidencije dermatomikoza uzrokovanih vrstom *M. canis* u području grada Zagreba, sa 37% na 22%, iako je, unutar te skupine, *M. canis* bio vodećim uzročnikom dermatomikoze vlasišta u čak 92% slučajeva (108).

Dermatomikoze vlasišta uzrokovane uzročnicima roda *Microsporum*, posebice *M. canis*, najčešće su površinske, sa slabom upalnom reakcijom, (*ectothrix* tip infekcije). Tipično se vide okrugla žarišta prekrivena pitirijaziformnim ljuskama, a u žarištima je vlas najčešće „slomljena“ i dekolorirana (Slika 12).



Slika 12. Površinska dermatomikoza vlasišta uzrokovana vrstom *M. canis*

No, zadnjih dvadesetak godina primjećuje se slika duboke mikoze vlasišta (kerion Celsi) uzrokovane vrstom *M. canis* (Slika 13).



Slika 13. Duboka dermatomikoza vlasišta uzrokovana vrstom *M. canis*

Uobičajeni i „očekivani“ uzročnik duboke mikoze vlasišta jest, inače, gljiva roda *Trichopyton* (52). U Laboratoriju za dermatološku mikologiju i parazitologiju, u razdoblju od 8 godina, kulturom je bilo verificirano 58 slučajeva duboke mikoze vlasišta (kerion Celsi) uzrokovane uzročnicima roda *Microsporum* i to u 52 slučajeva uzročnik je bio *M. canis*, a u 6 slučajeva *M. gypseum* (Slika 14) (109).



Slika 14. Kerion Celsi uzrokovan vrstom *M. canis* - multiple lezije

Nameće se pitanje da li su svi sojevi *M. canis* podjednako virulentni ili su genotipske razlike unutar vrste odgovorne za pojavu različite virulentnosti, te pojavu različitih kliničkih manifestacija mikrosporoze vlasišta, karakteriziranih vrlo izraženom, granulomatoznom, upalnom reakcijom.

2. HIPOTEZA

Različiti genotipovi gljive vrste *Microsporum canis* uzrokuju površinsku odnosno duboku mikožu vlasišta kao dva zasebna klinička entiteta. Pretpostavka je da genotipske razlike unutar gljive vrste *M. canis* su odgovorne za pojavu različite virulentnosti gljive, te time i za pojavu različitih kliničkih manifestacija mikrosporoze vlasišta.

3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

3.1. Opći cilj istraživanja

Istražiti genotipsku varijabilnost izolata gljive vrste *M. canis* u ispitanika s površinskom i dubokom mikozom vlasišta.

3.2. Specifični ciljevi

- Istražiti učestalost i uzročnike dermatomikoza vlasišta u razdoblju 2006.-2015. godine u gradu Zagrebu i u Zagrebačkoj regiji.
- Ispitati genotipske varijacije izolata gljive vrste *M. canis* u bolesnika s dubokom mikozom vlasišta.
- Ispitati genotipske varijacije izolata gljive vrste *M. canis* u bolesnika s površinskom mikozom vlasišta.
- Dobivene rezultate u ispitivanim skupinama usporediti međusobno.

4. MATERIJALI I METODE

4.1. Opis istraživanja

Istraživanje je provedeno u Referentnom centru za dermatološku mikologiju i parazitologiju Ministarstva zdravstva i socijalne skrbi Republike Hrvatske (Laboratorij za dermatološku mikologiju i parazitologiju Klinike za dermatovenerologiju Kliničkog bolničkog centra Zagreb i Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu) i u Kliničkom zavodu za kliničku i molekularnu mikrobiologiju Kliničkog bolničkog centra Zagreb.

U Laboratoriju za dermatološku mikologiju i parazitologiju istražena je epidemiologija dermatomikoza vlasišta u desetogodišnjem razdoblju i to od siječnja 2006. do prosinca 2015. godine. Obrađeni su podaci o dobi i spolu ispitanika, te o uzročnicima i dinamici pojave dermatomikoza vlasišta.

U dijagnostici je primijenjena „klasična“ mikološka obrada, nativni mikroskopski pregled primjenom 20% KOH, te potom, identifikacija uzročnika na temelju makroskopskih i mikroskopskih karakteristika kolonija na modificiranom Sabouraudovom agaru. Materijal za analizu najvećeg broja ispitanika uzet je u Laboratoriju za dermatološku mikologiju i parazitologiju. Samo manji dio uzoraka za analizu uzet je u drugim laboratorijima i poslan na obradu u Laboratorij za dermatološku mikologiju i parazitologiju. U razdoblju od 10 godina, kulturom je verificirano i ispitano 966 dermatomikoza vlasišta.

Prospektivni dio istraživanja proveden je u Laboratoriju za dermatološku mikologiju i parazitologiju u Klinici za dermatovenerologiju i u Kliničkom zavodu za kliničku i molekularnu mikrobiologiju Kliničkog bolničkog centra Zagreb.

4.2. Uzorak i ispitanici

Uzorak čini 60 izolata gljive *Microsporum canis* iz mikoloških kultura ispitanika s mikozom vlasišta. Ispitanici su inače zdrava djeca s dermatomikozom vlasišta, uzrokovanom gljivom vrste *M. canis* i potvrđenom mikološkom kulturom. Ispitanici pripadaju dobnoj skupini od 2 do 12 godina. Prema kliničkom nalazu ispitanici su svrstani u dvije klinički jasno definirane skupine:

- ispitanici s dubokom mikozom vlasišta (30 ispitanika)
- ispitanici s površinskom mikozom vlasišta (30 ispitanika)

4.3. Materijali i metode

U svrhu ovog istraživanja korištene su:

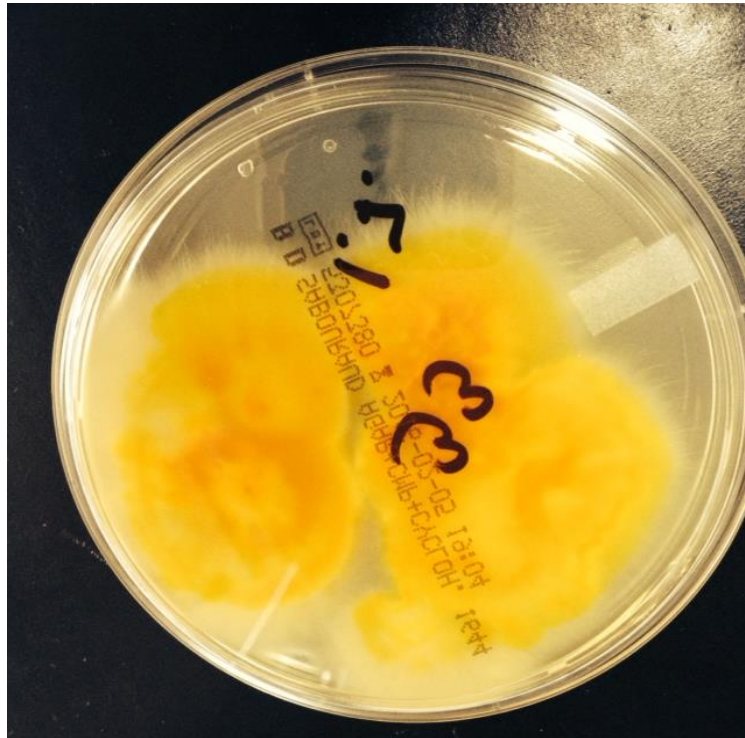
- Kliničke metode (anamneza i dermatovenerološki pregled)
- Laboratorijske metode:
 - nativna mikološka obrada
 - kultivacija gljive
 - molekularna dijagnostika (izolacija DNK, PCR-RFLP, RAPD i sekvenciranje genoma)
- Statističke metode

4.3.1. Mikološka obrada (nativno mikroskopiranje i kultivacija gljive)

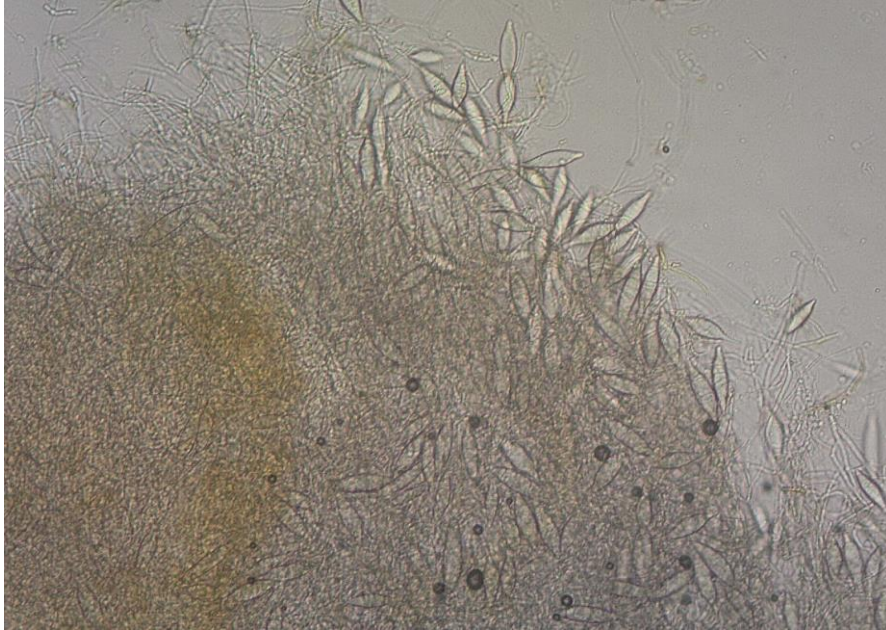
Nakon native mikološke pretrage primjenom 20% KOH, materijal uzet s klinički promijenjene kože vlasišta, kultivira se na modificiranu Sabouraudovu hranjivu podlogu (Difco™ Sabouraud agar, Modified), 14 dana na temperaturi od 25°C. *M. canis* makroskopski se identificira na temelju bijelo-žutih kolonija sa žutim pigmentom na periferiji (Slika 15), te izrazito žute stražnje strane podloge (Slika 16). Mikroskopski se vide hife s brojnim septiranim makrokonidijama koje su dugačke i imaju debeli zid (Slika 17). Broj septa (5-15) jedan je od mikromorfoloških „ključeva“ za determinaciju vrste gljive (Slika 18). Makrokonidije s 5-7 septa karakteristične su za vrstu *M. canis*, dok je za vrstu *M. gypseum* karakterističan broj septa do 5, a za vrstu *M. hominis (audouinii)* više od 7.



Slika 15. Sabouraud agar (modificirani) - kultura *M. canis*



Slika 16. Sabouraud agar (modificirani) - kultura *M. canis*
(stražnja strana Petrijeve zdjelice)



Slika 17. *M. canis* - mikromorfološke značajke (x100)



Slika 18. *M. canis* - mikro i makrokonidije (x400)

4.3.2. Izolacija DNK

DNK se izolira iz kolonija poraslih na Sabouraudovom agaru. Bakterijskom ušicom se uzimaju kolonije koje se suspendiraju u 1 mL sterilne H₂O. Nakon centrifugiranja tijekom 10 minuta na 5000 rpm supernatant se baca, a na sediment se dodaje 200 µL NaOH (50mM), pokriva se mineralnim uljem i inkubira na 95°C tijekom 10 minuta. Ponovo se centrifugira 10 minuta na 5000 rpm, supernatant se baca, a na sediment se dodaje *lysis buffer*, premješta u epruvete s kuglicama i stavlja u *Magnalyser* na 5000/30s, a zatim se stavlja u blok za hlađenje na nekoliko minuta. Nakon prebacivanja u nove epruvete ponovo se materijal centrifugira. Nakon dodatka litikaze inkubira se 30 minuta na 37°C i nakon centrifugiranja (10 minuta na 5000 rpm), dodaju se reagencije za purifikaciju prema uputama proizvođača (High Pure PCR Template Preparation Kit, Roche Diagnostic) (28).

4.3.3. Molekularna potvrda vrste *M. canis*

Morfološka identifikacija svih pozitivnih uzoraka potvrđuje se molekularnom metodom. Za potvrdu da se radi o *M. canis*, u svim izolatima se koristi PCR-RFLP (od engl. *Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorfism*) metoda. Najprije se ITS1-5.8S-ITS2 regija umnožava, a potom, metodom analize restrikcijskih fragmenata - RFLP, identificira se vrsta *M. canis*. U reakcije su uključeni i kontrolni sojevi *M. canis* ATCC 36299 i *T. rubrum* ATCC 28188 (110).

Izolirana DNK umnožava se korištenjem univerzalnog seta početnica ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') i ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (28). Veličina umnoženog fragmenta na elektroforetskom gelu trebala bi biti oko 700 bp. Dio genoma umnožen PCR-om izlaže se djelovanju restrikcijskog enzima *Hinfl* (Invitrogen, life technologies). Cijepanjem s *Hinfl* prema literaturi se očekuje jedinstven RFLP profil (213, 194, 142, 108, 8 bp) (110). Specifičnost RFLP tehnike u ovom istraživanju određuje se korištenjem, *M. canis* ATCC 36299 i *Trichophyton rubrum* ATCC 28188.

Za dokaz različitih sojeva unutar vrste *M. canis* koristi se RAPD metoda (od engl. *Randomly Amplified Polymorphic DNA Typing*). U tu se svrhu za amplifikaciju koriste (GACA)₄ i (ACA)₅ početnice kojima se nasumično umnožavaju fragmenti ovisno o njihovom nukleotidnom rasporedu. Dobiveni amplifikati detektiraju se elektroforezom na gelu koji se oboji etidijevim bromidom, vizualizira se pod ultraljubičastim svjetlom i amplifikati se međusobno uspoređuju (110).

4.4. Statistička analiza

Brojčani podaci su iskazani kao aritmetička sredina (AS) i standardna devijacija (SD) ili kao medijan te interkvartilni raspon (IQR), a podaci kategorijskih varijabli iskazani su brojem i udjelom u postocima. Razlike u raspodjeli između skupina za kategorijske varijable usporedile su se hi-kvadrat testom ili Fisherovim egzaktnim testom, a vrijednosti brojčanih podataka Studentovim t-testom. Povezanost pojedinih varijabli utvrdila se korištenjem multivarijatne logističke regresijske analize te je iskazana kao omjer šansi (OR) uz 95%-tni interval pouzdanosti (CI). Analizom ROC (od engl. *Receiver Operator Curve*) krivulje utvrđena je prediktivnost iskazana kao površina ispod krivulje (AUC) uz 95% CI te kao specifičnost i senzitivnost za kliničku sliku duboke mikoze vlasišta. Statistička obrada podataka provedena je u statističkom programskom paketu Statistica verzija 12 (StatSoft, Inc. Tulsa, OK) te MedCalc Statistical Software verzija 16.4.3 (MedCalc Software bvba, Ostend, Belgium; <https://www.medcalc.org>; 2016). Statistički značajnima smatrani su rezultati usporedbi i povezanosti uz razinu značajnosti $p < 0,05$.

4.5. Etička pitanja

Istraživanje je odobrilo Etičko povjerenstvo Kliničkog bolničkog centra Zagreb i Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Ispitanici i roditelji ispitanika su bili upoznati sa svrhom i ciljem istraživanja, koje je bilo i dodatno objašnjeno na informiranom pristanku za ispitanike - stariji maloljetnici (djeca starija od 8 godina) i za roditelje svih ispitanika.

Za sva pitanja oko istraživanja roditelji i ispitanici su se mogli obratiti liječniku telefonski.

5. REZULTATI

5.1. Učestalost i etiološki aspekti dermatomikoza vlasišta

Tijekom desetogodišnjeg razdoblja, u Laboratoriju za dermatološku mikologiju i parazitologiju u Klinici za dermatovenerologiju bilo je obrađeno ukupno 55976 bolesnika sa suspektom gljivičnom infekcijom (Tablica 3).

U tom razdoblju u 8112 bolesnika (14,49%) bile su dijagnosticirane (kulturom verificirane) dermatofitoze uzrokovane gljivama roda *Trichophyton*, *Microsporum* ili *Epidermophyton*. Dermatomikoza vlasišta kulturom je bila potvrđena u 966 od ukupno 8112 bolesnika (11,91%), od toga u 583 (60,4%) muških te u 383 (39,6%) ženskih ispitanika (Tablica 4). Unutar te skupine, 240 (24,8%) bolesnika bilo je iz Zagreba, a 726 (75,2%) iz ostatka Hrvatske, najvećim dijelom iz Zagrebačke regije.

U Tablici 4. prikazan je broj kulturom potvrđenih mikoza vlasišta uzrokovanih vrstama roda *Trychophyton* i *Microsporum* prema spolu bolesnika u razdoblju od 2006. do 2015. godine.

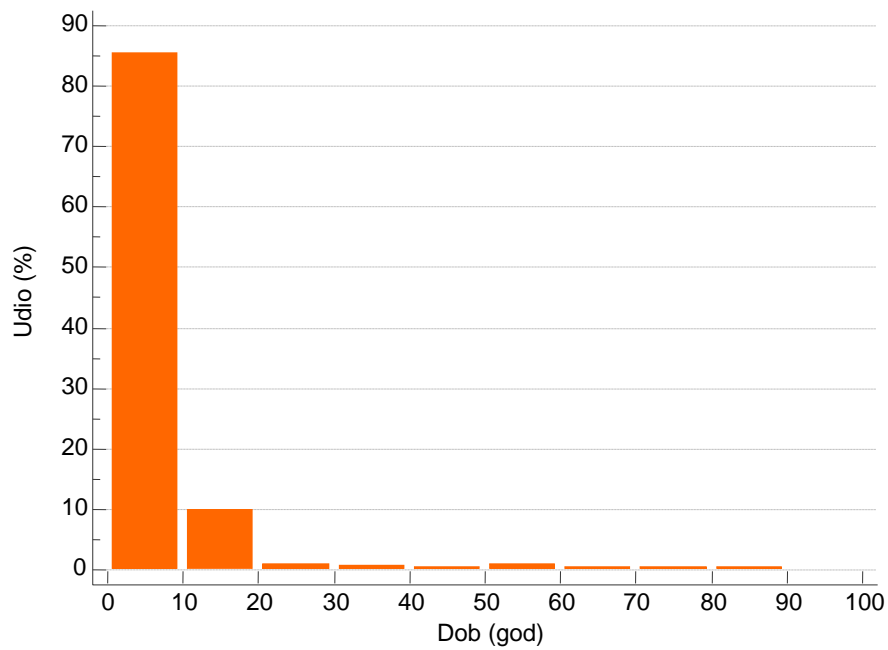
Medijan dobi kulturom potvrđenih mikoza vlasišta bio je 6 godina (IQR 4-8 godina, raspon 0,3-88 godina, Slika 19).

Iz Tablice 3. te Slike 20. vidljiv je trend smanjenja broja obrađenih bolesnika općenito (s >6000 godišnje 2006.-2011. godine na 3867, 2015. godine) te bolesnika s dokazanom dermatomikozom (s >1000 godišnje 2006.-2008. godine na oko 500 godišnje 2014. i 2015. godine).

Iz Tablice 3. je vidljivo da je zadnje 3 godine (2013.-2015.) utvrđen statistički značajno veći udio mikoza vlasišta unutar svih kliničkih manifestacija dermatofitoza u odnosu na prethodne godine (2006.-2012.) ($\chi^2=34,16$, $p<0,001$). Dodatno je to vidljivo iz Slike 21. na kojoj se vidi trend opadanja broja kulturom potvrđenih dermatofita uz stabilizaciju učestalosti u zadnje 3 godine (2013.-2015.) dok je broj pozitivnih kultura mikoza vlasišta „stabilan“ od 2010. do 2015. godine.

Tablica 3. Prikaz obrađenih bolesnika, kulturom potvrđenih dermatofita, kulturom potvrđenih mikoza vlasišta, te udio slučajeva mikoze vlasišta unutar svih dermatomikoza

Godina	Ukupno obrađeni bolesnici sa suspektnom dermatomikozom	Kulturom potvrđeni dermatofiti	Broj pozitivnih kultura mikoze vlasišta	Postotak mikoze vlasišta od ukupnog broja svih izoliranih dermatofita
2006	6607	1067	122	11,43%
2007	6748	1183	140	11,83%
2008	7403	1068	122	11,42%
2009	6311	925	105	11,35%
2010	6185	901	85	9,43%
2011	6072	844	75	8,89%
2012	5058	630	73	11,59%
2013	4063	512	69	13,48%
2014	3662	492	91	18,50%
2015	3867	490	84	17,14%
UKUPNO	55976	8112	966	11,91%

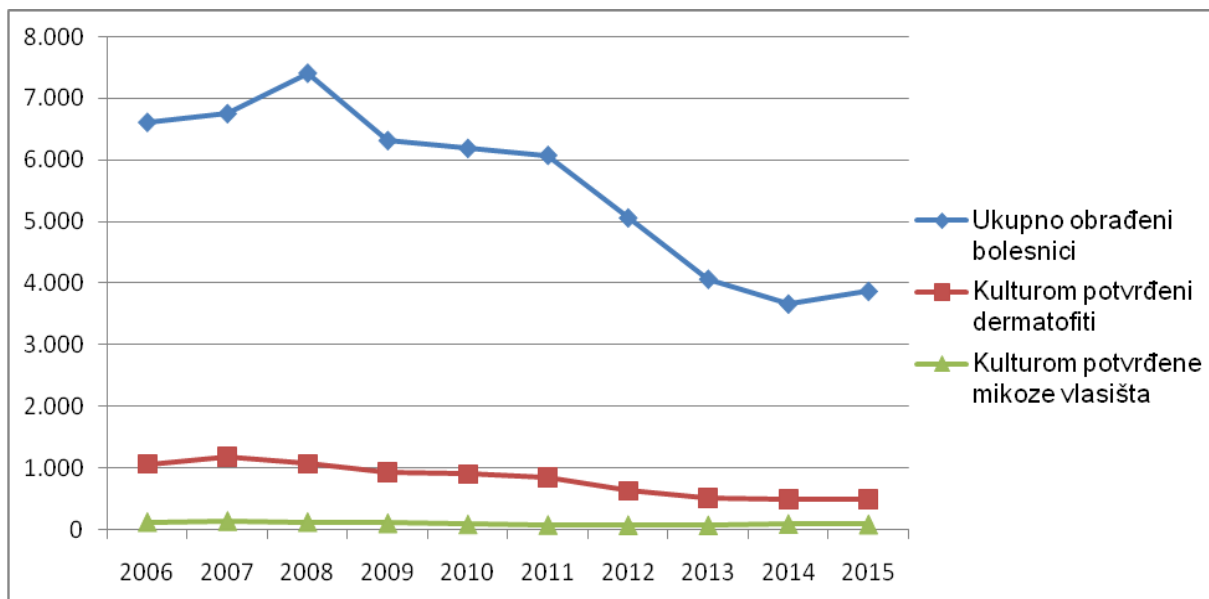


Slika 19. Prikaz raspodjele kulturom potvrđenih mikoza vlasišta prema dobi (N=966)

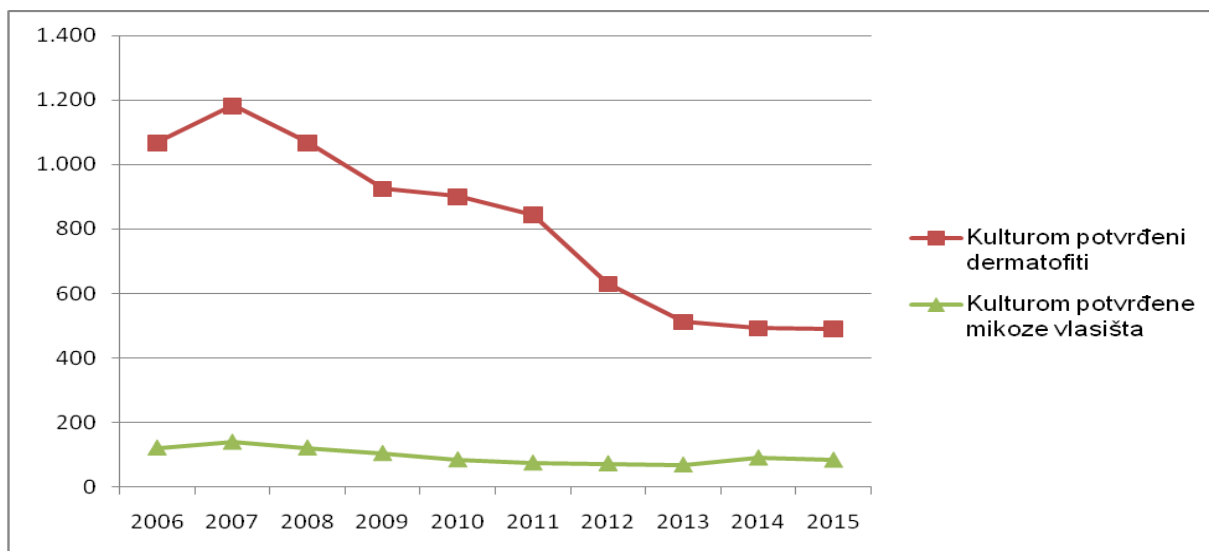
Tablica 4. Prikaz broja kulturom potvrđenih mikoza vlasišta uzrokovanih vrstama roda *Trychophyton* i *Microsporum* prema spolu bolesnika od 2006. do 2015. godine

Godina	<i>M. canis</i>		<i>M. gypseum</i>		<i>T. mentagrophytes</i> var. <i>granulosa</i>		<i>T. violaceum</i>		<i>T. tonsurans</i> var. <i>sulfurea</i>		<i>T. mentagrophytes</i> var. <i>persicolor</i>		<i>T. rubrum</i>		Podzbroj		UKUPNO
	M	Ž	M	Ž	M	Ž	M	Ž	M	Ž	M	Ž	M	Ž	M	Ž	
2006	71	40	–	–	3	4	–	–	3	–	–	–	1	–	78	44	122
2007	70	56	1	1	4	4	–	–	1	1	–	2	–	–	76	64	140
2008	64	39	2	–	9	4	2	–	2	–	–	–	–	–	79	43	122
2009	48	44	–	1	5	3	–	–	3	1	–	–	–	–	56	49	105
2010	47	29	3	–	2	2	–	–	–	–	1	1	–	–	53	32	85
2011	39	24	1	–	3	2	–	–	4	–	–	1	–	1	47	28	75
2012	39	24	–	–	2	6	–	–	1	–	1	–	–	–	43	30	73
2013	32	29	2	–	3	–	–	–	2	–	–	–	–	1	39	30	69
2014	52	30	–	–	2	2	2	–	3	–	–	–	–	–	59	32	91
2015	41	30	2	–	–	1	–	–	9	–	1	–	–	–	53	31	84
Podzbroj	503	345	11	2	33	28	4	0	28	2	3	4	1	2	583	383	/
UKUPNO	848		13		61		4		30		7		3		966		

M – muški, Ž – ženski.

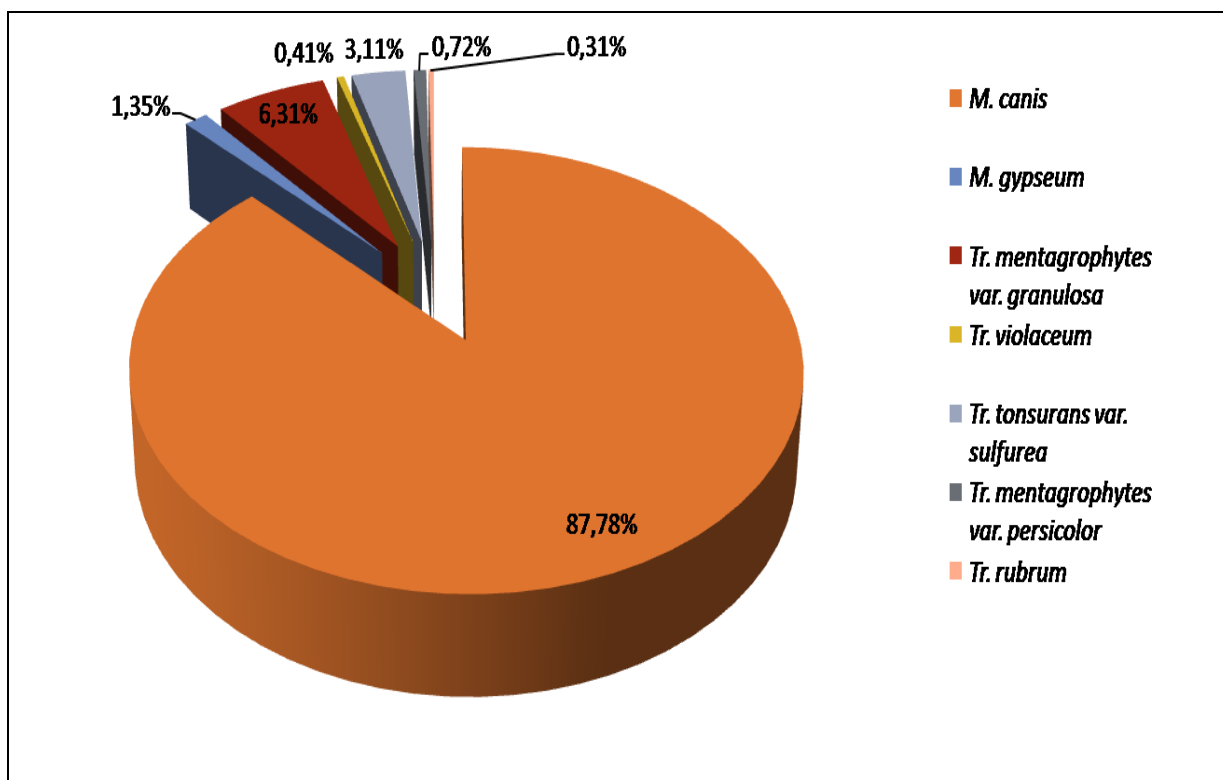


Slika 20. Prikaz broja obrađenih bolesnika, kulturom potvrđenih dermatofita i kulturom potvrđene mikoze vlasišta od 2006. do 2015. godine



Slika 21. Prikaz broja kulturom potvrđenih dermatofita i kulturom potvrđene mikoze vlasišta od 2006. do 2015. godine

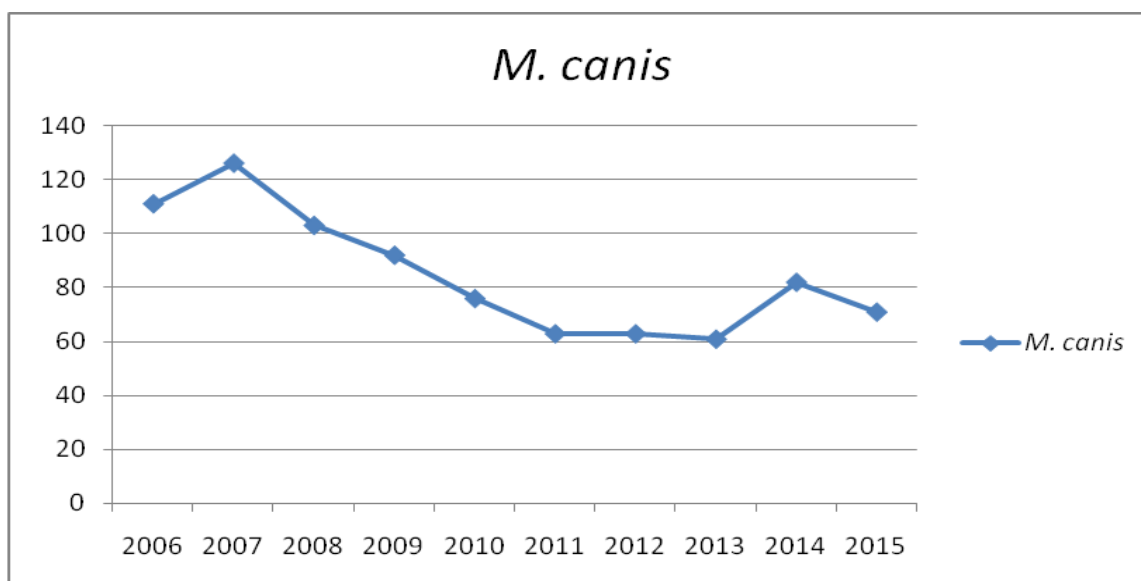
Na Slici 22. prikazan je udio mikoza vlasišta uzrokovanih gljivama roda *Trichophyton* i *Microsporum*, iz kojeg je vidljivo da je gotovo 90% pozitivnih izolata gljive vrste *M. canis* (87,78%). Prikaz broja pozitivnih izolata *M. canis* prema godinama izolacije prikazan je u Tablici 5. te na Slici 23. iz koje je vidljiv ranije opisani trend opadanja broja pozitivnih, kulturom potvrđenih dermatofita.



Slika 22. Prikaz raspodjele (udio) mikoza vlasišta uzrokovanih gljivama roda *Trichophyton* i *Microsporum*

Tablica 5. Prikaz broja pozitivnih kultura *M. canis* od 2006. do 2015. godine

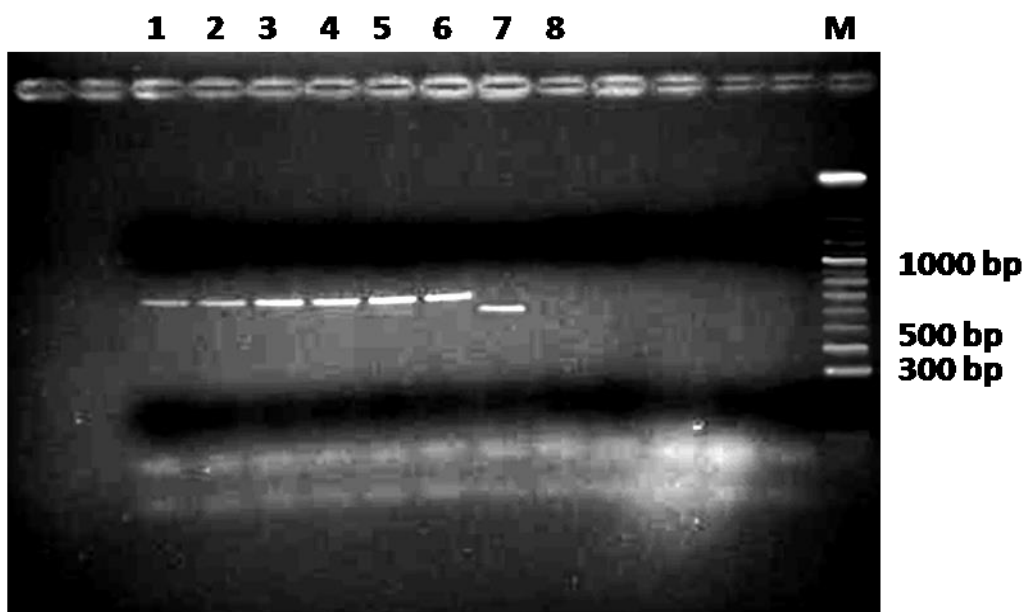
Godina	Broj pozitivnih kultura <i>M. canis</i> u muških ispitanika	Broj pozitivnih kultura <i>M. canis</i> u ženskih ispitanika	Ukupni broj pozitivnih kultura <i>M. canis</i>
2006	71	40	111
2007	70	56	126
2008	64	39	103
2009	48	44	92
2010	47	29	76
2011	39	24	63
2012	39	24	63
2013	32	29	61
2014	52	30	82
2015	41	30	71
Ukupno	503	345	848



Slika 23. Prikaz broja pozitivnih kultura *M. canis* od 2006. do 2015. godine

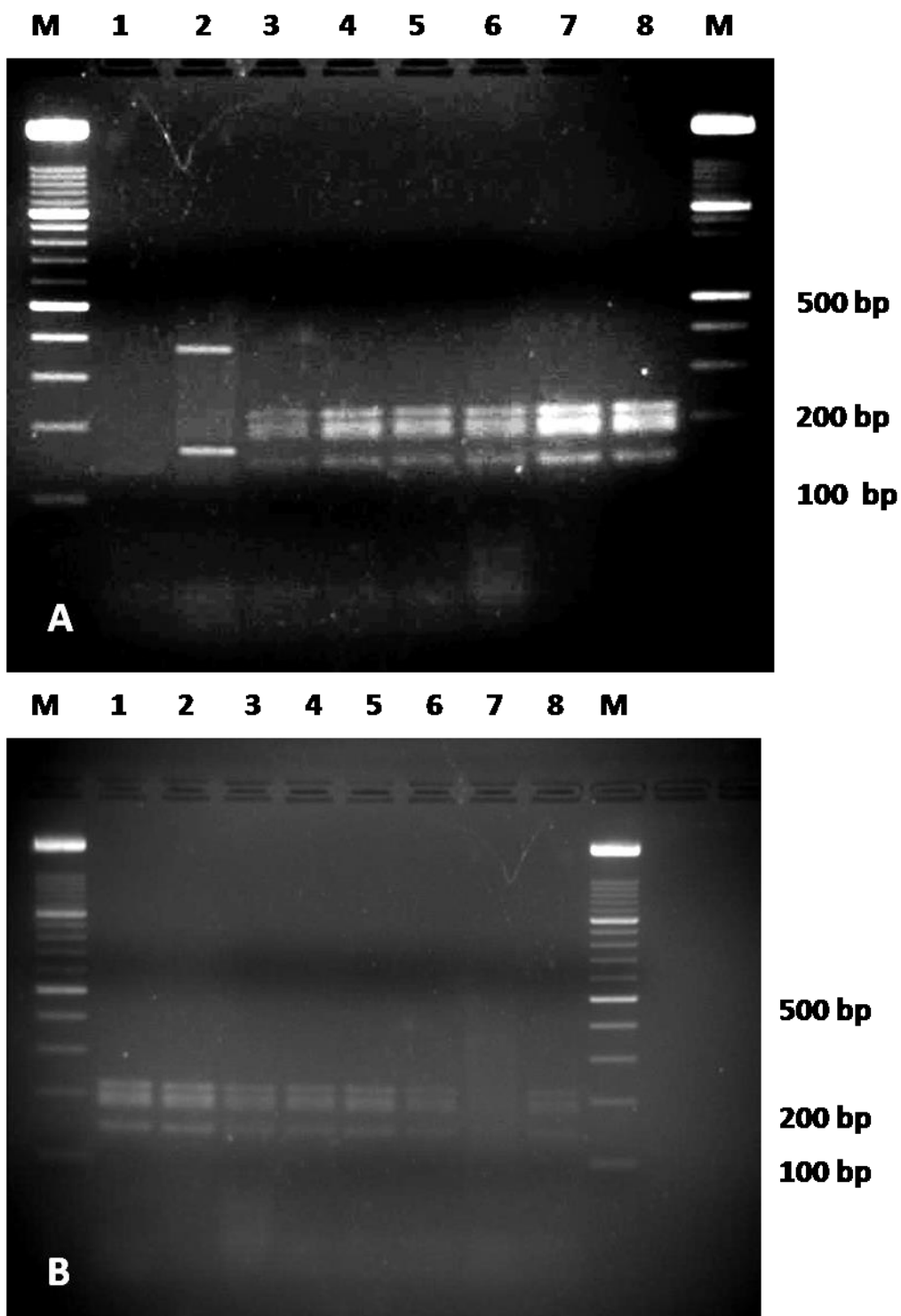
5.2. Genotipska varijabilnost izolata gljive vrste *M. canis*

U svih 60 ispitanika (30 ispitanika s kliničkom slikom površinske i 30 ispitanika s kliničkom slikom duboke mikoze vlasišta) mikološkom kulturom je verificiran *Microsporum canis*. U 54 izolata DNK je uspješno izolirana. Morfološka identifikacija vrste *M. canis* primjenom PCR-RFLP metode je molekularno potvrđena u svih izolata (N=54). Nakon umnožavanja DNK korištenjem ITS1 i ITS4 početnica (Slika 24), cijepanjem s *Hinfl*, dobiven je jedinstveni RFLP profil (213, 194, 142 bp) u svih 54 izolata i kontrolnog soja *M. canis* ATCC 36299 (Slika 25).



Slika 24. Elektroforeza na agaroznom gelu PCR produkata umnožene DNK korištenjem ITS1-ITS4 početnica.

1-5: *M. canis* klinički izolati; 6: *M. canis* ATCC 39299; 7: *T. rubrum* ATCC 28188;
8: negativna kontrola; M: molekularni marker



Slika 25. Elektroforeza na agaroznom gelu PCR produkata DNK korištenjem *HinfI* restrikcijskog enzima. **A.** M: molekularni marker; 1: negativna kontrola; 2: *T. rubrum* ATCC 28188; 3: *M. canis* ATCC 36299; 4-8: klinički izolati *M. canis*. **B.** M: molekularni marker; 1-6: *M. canis* klinički izolati; 7: negativna kontrola; 8: *M. canis* ATCC 36299

M. canis je molekularno potvrđen u svim izolatima sekvenciranjem ITS1-5.8S-ITS2 regije ribosomske DNK. Sekvenciranje molekule DNK Sangerovom dideoksi metodom obavljeno je u servisu MACROGEN, Amsterdam, Nizozemska. „Sravnjenja“ dobivenih sekvenci za pojedine regije, kao i višestruka „sravnjenja“ sekvenci različitih uzoraka provedena su pomoću programa Lasergene (DNASTAR). „Sravnjene“ su sekvence zatim ručno analizirane kako bi se otklonile moguće pogreške u sekvenciranju (Slika 26). Homologija sekvenci utvrđena je pomoću BLAST pretrage u sklopu NCBI mrežnog servisa (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

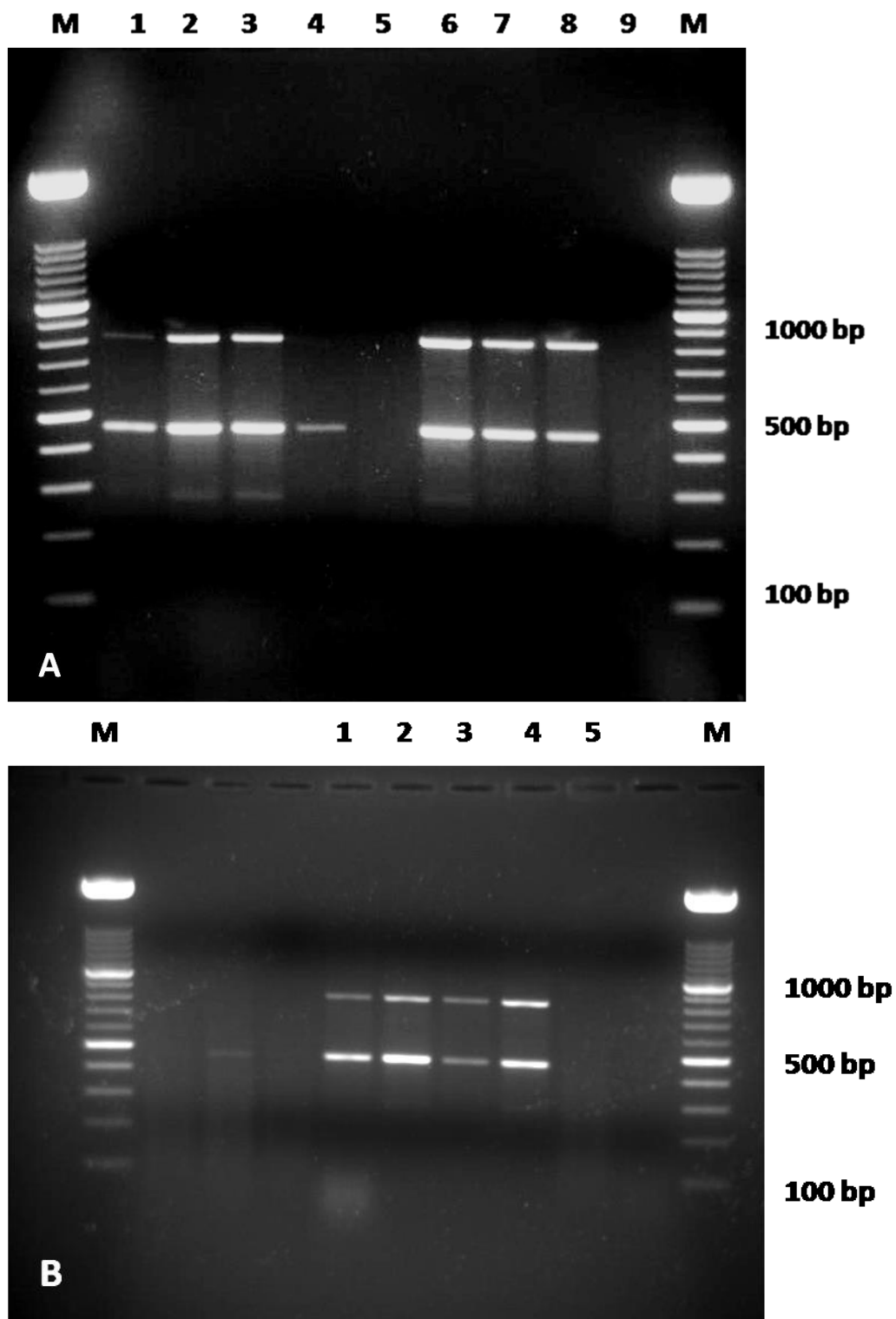
KT192465	CCCCCTCCCCAGTAACCAACCCACCGCTTAGGGGGGTGGGAGGGAGGGGGACGCGCCCGAAAAGCAGTGTGTCAGGCCGCGATTCCGGCTCTGGGCGAATGGGACATACCAACCGCTCCAGGACCGGCCGGCAGGCTGGCCT
3M	CCCCCTCCCCAGTAACCAACCCACCGCTTAGGGGGGTGGGAGGGAGGGGGACGCGCCCGAAAAGCAGTGTGTCAGGCCGCGATTCCGGCTCTGGGCGAATGGGACATACCAACCGCTCCAGGACCGGCCGGCAGGCTGGCCT
4M	CCCCCTCCCCAGTAACCAACCCACCGCTTAGGGGGGTGGGAGGGAGGGGGACGCGCCCGAAAAGCAGTGTGTCAGGCCGCGATTCCGGCTCTGGGCGAATGGGACATACCAACCGCTCCAGGACCGGCCGGCAGGCTGGCCT
5M	CCCCCTCCCCAGTAACCAACCCACCGCTTAGGGGGGTGGGAGGGAGGGGGACGCGCCCGAAAAGCAGTGTGTCAGGCCGCGATTCCGGCTCTGGGCGAATGGGACATACCAACCGCTCCAGGACCGGCCGGCAGGCTGGCCT
6M	CCCCCTCCCCAGTAACCAACCCACCGCTTAGGGGGGTGGGAGGGAGGGGGACGCGCCCGAAAAGCAGTGTGTCAGGCCGCGATTCCGGCTCTGGGCGAATGGGACATACCAACCGCTCCAGGACCGGCCGGCAGGCTGGCCT
7M	CCCCCTCCCCAGTAACCAACCCACCGCTTAGGGGGGTGGGAGGGAGGGGGACGCGCCCGAAAAGCAGTGTGTCAGGCCGCGATTCCGGCTCTGGGCGAATGGGACATACCAACCGCTCCAGGACCGGCCGGCAGGCTGGCCT
8M	CCCCCTCCCCAGTAACCAACCCACCGCTTAGGGGGGTGGGAGGGAGGGGGACGCGCCCGAAAAGCAGTGTGTCAGGCCGCGATTCCGGCTCTGGGCGAATGGGACATACCAACCGCTCCAGGACCGGCCGGCAGGCTGGCCT
10M	CCCCCTCCCCAGTAACCAACCCACCGCTTAGGGGGGTGGGAGGGAGGGGGACGCGCCCGAAAAGCAGTGTGTCAGGCCGCGATTCCGGCTCTGGGCGAATGGGACATACCAACCGCTCCAGGACCGGCCGGCAGGCTGGCCT
11M	CCCCCTCCCCAGTAACCAACCCACCGCTTAGGGGGGTGGGAGGGAGGGGGACGCGCCCGAAAAGCAGTGTGTCAGGCCGCGATTCCGGCTCTGGGCGAATGGGACATACCAACCGCTCCAGGACCGGCCGGCAGGCTGGCCT
12M	CCCCCTCCCCAGTAACCAACCCACCGCTTAGGGGGGTGGGAGGGAGGGGGACGCGCCCGAAAAGCAGTGTGTCAGGCCGCGATTCCGGCTCTGGGCGAATGGGACATACCAACCGCTCCAGGACCGGCCGGCAGGCTGGCCT
13M	CCCCCTCCCCAGTAACCAACCCACCGCTTAGGGGGGTGGGAGGGAGGGGGACGCGCCCGAAAAGCAGTGTGTCAGGCCGCGATTCCGGCTCTGGGCGAATGGGACATACCAACCGCTCCAGGACCGGCCGGCAGGCTGGCCT
14M	CCCCCTCCCCAGTAACCAACCCACCGCTTAGGGGGGTGGGAGGGAGGGGGACGCGCCCGAAAAGCAGTGTGTCAGGCCGCGATTCCGGCTCTGGGCGAATGGGACATACCAACCGCTCCAGGACCGGCCGGCAGGCTGGCCT
15M	CCCCCTCCCCAGTAACCAACCCACCGCTTAGGGGGGTGGGAGGGAGGGGGACGCGCCCGAAAAGCAGTGTGTCAGGCCGCGATTCCGGCTCTGGGCGAATGGGACATACCAACCGCTCCAGGACCGGCCGGCAGGCTGGCCT
16M	CCCCCTCCCCAGTAACCAACCCACCGCTTAGGGGGGTGGGAGGGAGGGGGACGCGCCCGAAAAGCAGTGTGTCAGGCCGCGATTCCGGCTCTGGGCGAATGGGACATACCAACCGCTCCAGGACCGGCCGGCAGGCTGGCCT
18M	CCCCCTCCCCAGTAACCAACCCACCGCTTAGGGGGGTGGGAGGGAGGGGGACGCGCCCGAAAAGCAGTGTGTCAGGCCGCGATTCCGGCTCTGGGCGAATGGGACATACCAACCGCTCCAGGACCGGCCGGCAGGCTGGCCT
19M	CCCCCTCCCCAGTAACCAACCCACCGCTTAGGGGGGTGGGAGGGAGGGGGACGCGCCCGAAAAGCAGTGTGTCAGGCCGCGATTCCGGCTCTGGGCGAATGGGACATACCAACCGCTCCAGGACCGGCCGGCAGGCTGGCCT
20M	CCCCCTCCCCAGTAACCAACCCACCGCTTAGGGGGGTGGGAGGGAGGGGGACGCGCCCGAAAAGCAGTGTGTCAGGCCGCGATTCCGGCTCTGGGCGAATGGGACATACCAACCGCTCCAGGACCGGCCGGCAGGCTGGCCT

Slika 26. Dio sekvence kliničkih izolata *M. canis*.

Tamnije označene regije na slici se ne razlikuju. Razlikovale bi se ukoliko se radi o srodnim vrstama roda *Microsporium* (*M. ferrugineum*, *M. audouinii*). Prema: Li HC i sur. (29)

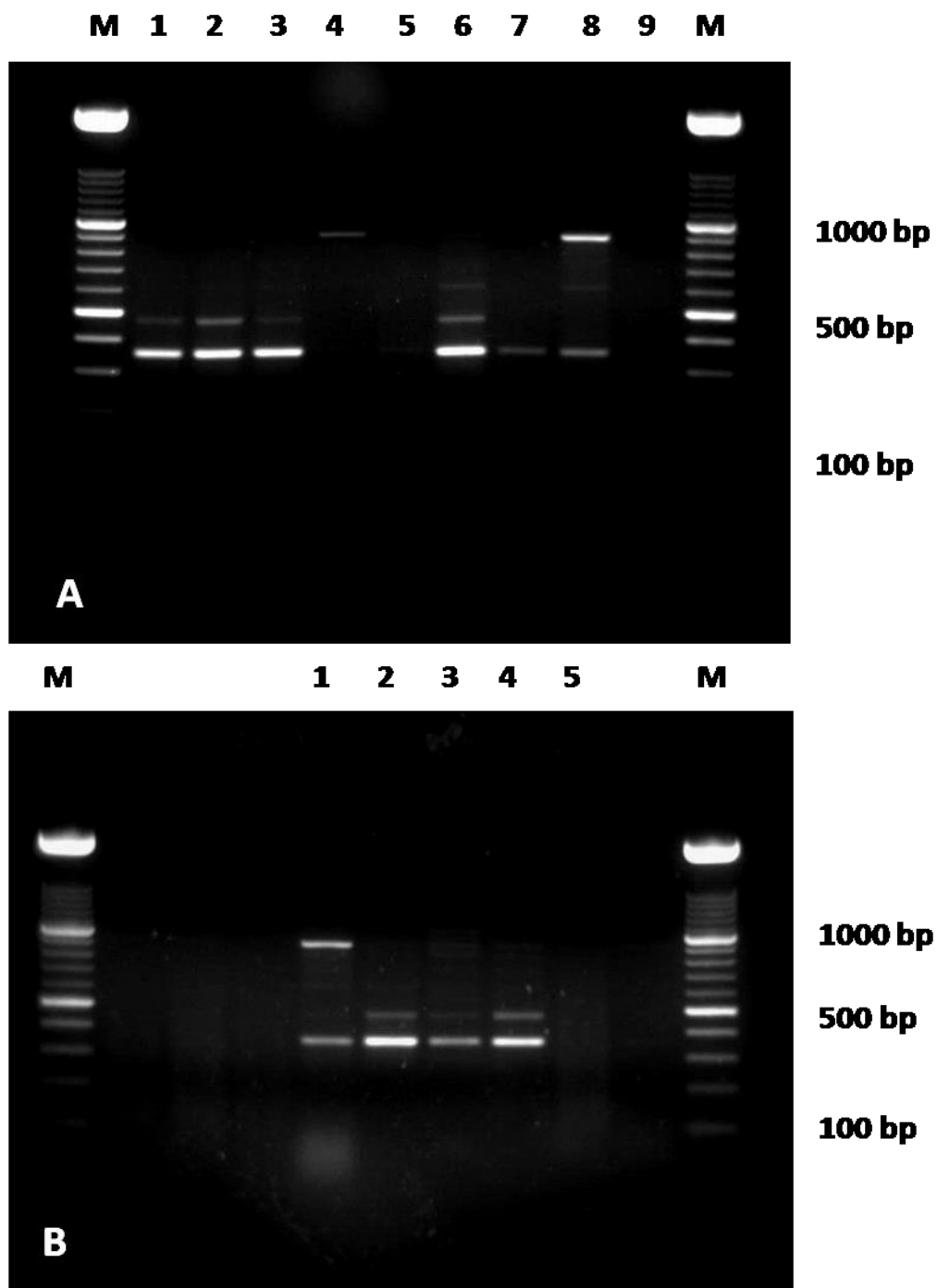
Nakon RAPD amplifikacije korištenjem (ACA)₅ početnice, elektroforezom na gelu dobiven je jedinstven profil u svih 54 izolata. Veličina dobivenih fragmenata je približno 450 bp i 820 bp.

Primjenom (GACA)₄ početnice, dobivena su 2 profila, koja smo označili kao profil A i profil B, a variraju u broju i veličini dobivenih fragmenata (vrpce). Profil A - široke vrpce veličine približno 350 bp i 480 bp. Profil B - široke vrpce približno veličine 350 bp i 950 bp. Profil A je identificiran u 37 izolata (68,5%), a profil B u 17 izolata (31,5%).



Slika 27. RAPD amplifikacija korištenjem $(ACA)_5$ početnice. **A.** M: molekularni marker; 1-7: klinički izolati *M. canis*; 8: *M. canis* ATCC 36299; 9: negativna kontrola.

B. M: molekularni marker; 1-4: klinički izolati *M. canis*; 5: negativna kontrola



Slika 28. RAPD amplifikacija korištenjem $(GACA)_4$ početnice.

A. M: molekularni marker; 1: *M. canis* ATCC 39299; 2-8: klinički izolati *M. canis*;

9: negativna kontrola. **B.** 1-4: klinički izolati *M. canis*; 5: negativna kontrola

U Tablici 6. prikazani su pojedinačni rezultati PCR profila genotipiziranih izolata gljive vrste *M. canis* korištenjem (GACA)₄ početnice uz podatke o dobi, spolu, mjestu stanovanja ispitanika, te kliničkoj slici mikoze vlasišta (P - površinska mikoza vlasišta, K - kerion, duboka mikoza vlasišta).

Tablica 6. Rezultati PCR profila genotipiziranih izolata korištenjem (GACA)₄ početnice uz podatke o dobi, spolu, mjestu stanovanja te kliničkoj slici mikoze vlasišta

RB	Dob (god)	Spol	Mjesto	KS	PCR profil	RB	Dob (god)	Spol	Mjesto	KS	PCR profil
1	6	M	Zagreb	P	A	28	5	Ž	Zadar	P	A
2	2	M	M. Bistrica	P	B	29	5	Ž	V. Gorica	K	A
3	6	Ž	Gračac	P	A	30	6	M	Dugo Selo	K	A
4	8	Ž	Požega	P	A	31	4,5	Ž	Zagreb	K	B
5	5	Ž	Vinkovci	K	A	32	4,5	Ž	Jakšinec	P	A
6	5	M	Vinkovci	K	B	33	4	Ž	Karlovac	P	A
7	5	M	Petrinje	P	A	34	2	Ž	Sisak	P	A
8	4	M	Karlovac	P	B	35	4	M	Zagreb	P	A
9	3	M	Zagreb	P	A	36	10	Ž	Zagreb	K	B
10	8	Ž	Zagreb	P	A	37	3	Ž	M. Bistrica	P	A
11	7	M	Bedekovčina	K	A	38	7	Ž	Bedekovčina	P	A
12	7	M	Zagreb	K	A	39	3,5	M	Kumrovec	P	A
13	6	M	Sisak	P	B	40	3	M	Zagreb	P	A
14	11	Ž	Rab	K	A	41	2,5	M	Zagreb	P	A
15	9	M	Zabok	K	A	42	3	Ž	Čakovec	P	A
16	8	M	Sisak	K	A	43	5	Ž	Zagreb	P	B
17	12	M	Karlovac	K	B	44	9	M	Koprivnica	K	A
18	11	M	Zadar	P	B	45	7	M	Virovitica	K	A
19	3	Ž	Zagreb	K	A	46	6	Ž	Bjelovar	K	B
20	5	M	Osijek	P	A	47	9	Ž	G. Stubica	K	B
21	3,5	M	Radoboj	P	A	48	7	Ž	Varaždin	K	B
22	7	Ž	Novska	P	A	49	6	M	Dugo Selo	K	A
23	9	Ž	Vrbovsko	K	A	50	9	Ž	Brinje	K	A
24	8	M	Zagreb	K	A	51	12	M	S. Kraljevec	K	B
25	6	M	Osijek	P	B	52	6	Ž	Ogulin	K	B
26	4	M	Karlovac	P	B	53	3	M	Zadar	K	A
27	8	M	Zagreb	P	A	54	5	Ž	G. Stubica	K	B

RB – redni broj, M – muški, Ž – ženski, KS – klinička slika, P – površinska mikoza, K – kerion, duboka mikoza vlasišta, A – genotipska varijacija A, B – genotipska varijacija B.

Analizom podataka iz Tablice 6. nije utvrđena razlika za dob prema spolu (M, $6,1 \pm 2,8$ god., Ž, $6,1 \pm 2,4$ god., $t=0,040$, $p=0,968$), niti prema PCR profilu (A, $5,8 \pm 2,3$ god., B, $6,7 \pm 3,0$ god., $t=1,312$, $p=0,195$). Nije utvrđena statistički značajna razlika raspodjele prema spolu za tip kliničke slike (površinska prema duboka mikoza, $p=0,785$, Tablica 7), niti raspodjele prema PCR profilu ($p=0,382$, Tablica 8).

Tablica 7. Klinička slika mikoze vlasišta i spol ispitanika

Spol	Klinička slika		
	Površinska mikoza	Kerion duboka mikoza	
Muški	16 (57,1%)	13 (50%)	29 (53,7%)
Ženski	12 (42,9%)	13 (50%)	25 (46,3%)
	28 (51,9%)	26 (48,1%)	54

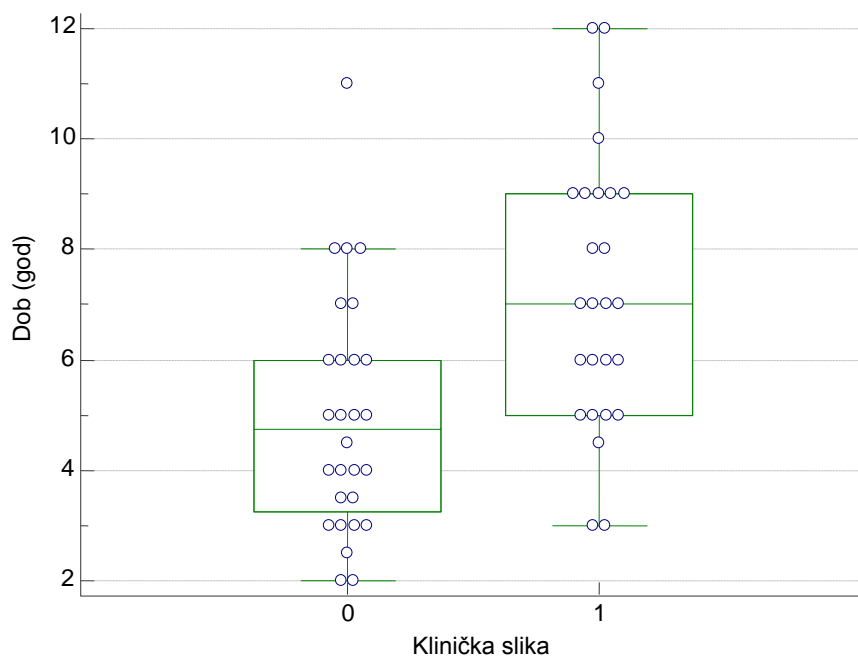
Fisher egzaktni test, $p=0,785$

Tablica 8. Usporedba kliničke slike mikoze vlasišta i PCR profila izolata *M. canis*

PCR profil	Klinička slika		
	Površinska mikoza	Kerion duboka mikoza	
A	21 (75%)	16 (61,5%)	37 (68,5%)
B	7 (25%)	10 (38,5%)	17 (31,5%)
	28 (51,9%)	26 (48,1%)	54

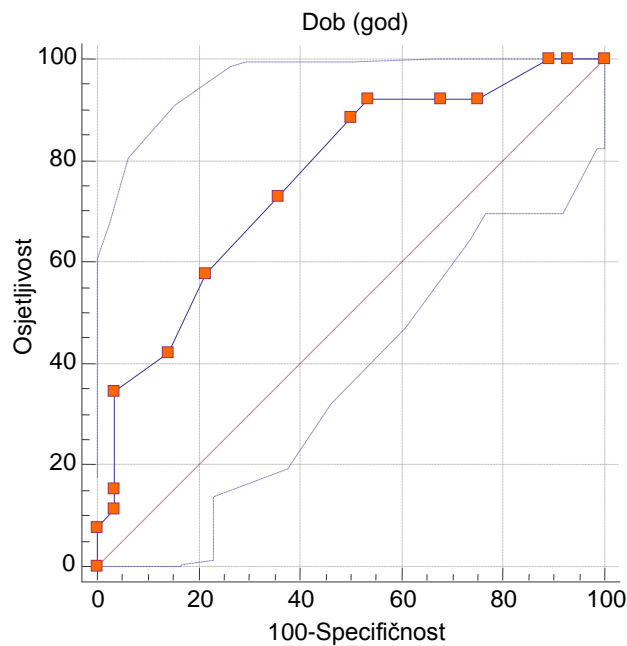
Fisher egzaktni test, $p=0,382$

Utvrđeno je da su ispitanici s dubokom mikoza vlasišta bili statistički značajno stariji od djece s površinskom mikoza (aritmetička sredina \pm SD, 7,3 \pm 2,5 god. prema 5,0 \pm 2,1 god., $t=3,632$, $p=0,001$, Slika 29).



Slika 29. Usporedba raspodjele dobi prema kliničkoj slici mikoze vlasišta (0 – površinska, 1 – kerion, duboka mikoza); $t=3,632$, $p=0,001$

Logističkom regresijskom analizom uz kliničku sliku kao zavisnu varijablu te spol, dob, PCR profil te mjesto stanovanja, utvrđena je dob kao jedina statistički značajna prediktivna varijabla duboke mikoze vlasišta uz OR (omjer šansi) za godinu starosti od 1,54 (95% CI, 1,16-2,04, $p < 0,001$) te AUC=0,764 (95% CI, 0,629-0,869, $z=4,072$, $p < 0,0001$, Slika 30.), graničnu vrijednost >4 godine (95% CI $>3,5$ do $>4,5$) uz osjetljivost od 92,31% (95% CI, 74,9-99,1%) te specifičnost od 46,43% (95% CI, 27,5-66,1%).



Slika 30. Prikaz ROC krivulje za predikciju duboke mikoze vlasišta prema dobi; AUC=0,764 (95% CI, 0,629-0,869), $z=4,072$, $p < 0,0001$

6. RASPRAVA

6.1. Učestalost i etiološki aspekti dermatomikoza vlasišta

Unatoč primjeni antimikotika novije generacije, dermatomikoze vlasišta i dalje predstavljaju veliki javnozdravstveni problem. Epidemiologija dermatomikoza vlasišta je vrlo dinamična, mijenja se tijekom vremena u ovisnosti o geografskom području, životnim navikama bolesnika, uvjetima života, učestalim migracijama, kao i o nekim faktorima koji se još uvijek ne mogu u potpunosti objasniti.

U epidemiološkom dijelu istraživanja ispitali smo etiologiju i dinamiku pojave dermatomikoza vlasišta. Tijekom desetogodišnjeg razdoblja (2006.-2015.) obrađeno je 55976 bolesnika. U 8112 bolesnika (14,49%) kulturom su verificirane dermatofitoze uzrokovane gljivama roda *Trichophyton*, *Microsporum* ili *Epidermophyton*.

U ispitivanom razdoblju vidljiv je trend opadanja broja bolesnika, uz stabilizaciju broja pozitivnih kultura u zadnje 3 godine. *Tinea capitis* (TC) je potvrđena u 966 bolesnika (11,91%), što je manje u odnosu na prethodno istraživanje na istom području u razdoblju 1999.-2008. (108). Broj pozitivnih TC kultura je stabilan u razdoblju od 2010. do 2015. godine uz statistički značajno veći udio TC unutar svih kliničkih manifestacija dermatofitoza, u zadnje 3 godine (2013.-2015.).

Povećani udio TC u zadnje 3 godine može biti posljedica smanjenog broja bolesnika upućenih na mikološku obradu. Mikološka obrada i verifikacija uzročnika kod dermatomikoza vlasišta je obvezatna i zaista se provodi, dok kod dijela pacijenata s dermatomikozom na drugim lokalizacijama, to nije uvijek slučaj.

Najčešće izolirani uzročnik TC je *M. canis*, u 88% slučajeva (N=848). Također je vidljiv prethodno opisani trend opadanja broja kultura *M. canis* (2006.-2010.), uz stabilizaciju broja u razdoblju 2011.-2015. godine. Slična je situacija i u susjednim zemljama kao npr. Bosna i Hercegovina, Austrija, Slovenija, Mađarska, gdje je *M. canis* također vodeći uzročnik TC (51, 98, 99, 100).

Naše istraživanje je pokazalo da se antropofilni uzročnici u Republici Hrvatskoj javljaju sporadično. Tijekom našeg istraživanja, *T. tonsurans* je izoliran u 30 bolesnika (3,1%). Unatoč povećanom broju kultura *T. tonsurans* u usporedbi s ranijim

istraživanjem (1999.-2008.) (108), *T. tonsurans* se i dalje pojavljuje uglavnom u sportskim kolektivima, najčešće među članovima hrvatskih klubova, te iznimno i u članovima njihovih obitelji.

Uvođenjem grizeofulvina u terapiju gljivičnih bolesti 1958. godine, opaža se gotovo potpuna eradikacija antropofilnih uzročnika kao što su *M. audouinii* i *T. schoenleinii* u zemljama Srednje Europe (77). U našem istraživanju tijekom desetogodišnjeg razdoblja nije bio zabilježen niti jedan slučaj *T. schoenleinii* i *M. audouinii*. U razdoblju od 1999. do 2008. godine zabilježen je samo jedan slučaj favusa uzrokovan vrstom *T. schoenleinii* kod djevojke koja je sa Kosova imigrirala u Hrvatsku pri čemu je klinička slika bila jedva zamjetna i nije pokazivala karakteristična skutula („*forme fruste*“) (108). *T. violaceum* je verificiran u svega 4 bolesnika, dok *T. rubrum* je uzrokovao TC u samo 3 bolesnika starije životne dobi.

Epidemiološka slika u susjednoj Italiji zadnjih nekoliko godina je znatno promijenjena, što je, najvjerojatnije povezano s povećanim useljavanjem imigranata iz Afrike i Srednjeg istoka. Nakon dominacije zoofilnog uzročnika *M. canis* (95-97), u Italiji se bilježi porast slučajeva *T. violaceum*, većinom u djece koja su imigrirala u Italiju iz afričkih zemalja, gdje se *T. violaceum* nalazi endemski (101).

Slično je stanje i u Švedskoj, te u Švicarskoj, gdje je vodeći uzročnik dermatomikoza vlasišta također *T. violaceum* (102, 103). U Belgiji je istraživanje provedeno u razdoblju 2001.-2002. također pokazalo dominaciju antropofilnih uzročnika (89%). Najčešće su bili izolirani *M. audouinii* (39%), *T. soudanense* (29%), *T. violaceum* (18%), te *T. tonsurans* (3%) (111). U Francuskoj, istraživanja koja su provedena u Parizu, pokazuju da dominiraju antropofilni uzročnici *T. soudanense* i *M. audouinii*, dok je u nekim regijama Francuske *M. canis* ostao vodećim uzročnikom TC, što se izravno objašnjava većim priljevom migranata u veće gradove (112).

Na temelju svega navedenog može se i Hrvatskoj pretpostaviti mogućnost sve učestalije pojave antropofilnih uzročnika dermatomikoze vlasišta u usporedbi sa sadašnjom situacijom.

Što se tiče zoofilnih uzročnika, nakon *M. canis*, najviše je zastupljen *T. mentagrophytes var. granulosa*, verificiran u 61 ispitanika (6%), najčešće u ruralnim sredinama, u osoba u kontaktu s krupnim domaćim životinjama (govedo i svinja). Zanimljiva je i pojava nekoliko sporadičnih slučajeva *T. mentagrophytes var.*

persicolor s obzirom da pojava navedenog uzročnika nije bila evidentirana u prethodnom istraživanom razdoblju (108).

M. gypseum je jedini geofilni uzročnik, koji se i dalje pojavljuje sporadično, te je i kod *M. gypseum* zabilježena promjena kliničkog obrasca dermatomikoza vlasišta u smislu pojave inflamatornih dermatomikoza (kerion Celsi) (109).

Dermatomikoze vlasišta su bolesti tipične za djecu predškolske i školske dobi, dok odrasli obolijevaju vrlo rijetko (113, 114). Naše istraživanje je pokazalo da se TC najčešće pojavljuje u dobi od 4 do 8 godina (medijan dobi kulturom potvrđenih TC je 6 godina), dok prema podacima iz literature u Europi i u SAD, TC se najčešće pojavljuje u dobi od 3 do 7 godina (44, 45).

Podaci iz literature pokazuju da se TC pojavljuje iznimno rijetko u odraslih osoba (48, 49, 115), iako neki autori upozoravaju na povećani broj slučajeva TC kod adolescenata i kod starijih osoba (44, 45).

Relativno rijetka pojava TC u odraslih povezuje se sa zaštitnom, fungistatskom funkcijom slobodnih masnih kiselina, koje se pojačano izlučuju nakon puberteta, te kolonizacijom vlasišta s *Pityrosporum orbiculare* i njegovom kompetitivnom ulogom (116, 117). U našem istraživanju TC je zabilježena u 44 bolesnika (5%) u dobi od 18 do 88 godina života, što je nešto više u usporedbi sa studijom provedenoj u Torinu u razdoblju 1997.-2012. gdje je udio TC kod adolescenata bio 2,6% (48).

M. canis je bio verificiran u više od polovice (52%) bolesnika, i to pretežno žena, što je povezano s kontaktom s kućnim ljubimcima i to najčešće s mačkama. Prema nekim autorima žene u postmenopauzalnom razdoblju su sklonije pojavi dermatomikoza vlasišta zbog ubrzane involucije sebacealnih žlijezda kao posljedica smanjene razine estrogena u krvi (57, 118).

U našem istraživanju prevalencija dermatomikoza vlasišta prema spolu je u korist muških ispitanika. TC je dijagnosticirana u 583 (60,4%) muških te u 383 (39,6%) ženskih ispitanika. Podaci iz literature su kontroverzni. Prema nekim autorima TC je također bila učestalija u muških ispitanika (50, 51), ali postoje i autori koji su našli da su dermatomikoze vlasišta bile češće u djevojčica (53). Ginter-Henselmayer i sur. nisu našli razliku među spolovima (44). Razlike među spolovima nije bilo i u istraživanju za razdoblje od 12 godina, gdje su bila obuhvaćena djeca sa dermatomikozom vlasišta u prve dvije godine života (54).

6.2. Genotipska varijabilnost izolata gljive vrste *M. canis*

Zadnjih dvadesetak godina opažaju se znatne promjene i u obrascu kliničke slike gljivičnih bolesti vlasišta uzrokovanih gljivama roda *Microsporum* (52). Dermatomiikoze vlasišta uzrokovane gljivom *M. canis* su najčešće površinske. Međutim, zadnjih dvadesetak godina primjećuje se slika duboke mikoze vlasišta (kerion Celsi) uzrokovane vrstom *M. canis* i *M. gypseum*, umjesto „očekivanog“ uzročnika - gljiva roda *Trichophyton* (109).

Razlog toj pojavi nije još razjašnjen. Nameće se pitanje da li su svi sojevi *M. canis* podjednako virulentni ili su možda genotipske razlike unutar pojedinog soja odgovorne za pojavu različite virulentnosti, te pojavu bitno različitih kliničkih manifestacija mikrosporoze vlasišta (119).

Stoga smo ovu pojavu htjeli preciznije ispitati na uzorku od 60 ispitanika, u djece u dobi od 2 do 12 godina. Analizirali smo dvije skupine ispitanika, i to 30 ispitanika s kliničkom slikom površinske i 30 ispitanika s kliničkom slikom duboke mikoze vlasišta (kerion Celsi). Kod svih ispitanika je kulturom verificiran uzročnik *M. canis*, što je bio i osnovni uvjet za uključivanje ispitanika u istraživanje.

U našem smo istraživanju primijenili PCR-RFLP metodu korištenjem *HinfI* restrikcijskog enzima u svrhu molekularne potvrde gljive vrste *M. canis* (120). Većina autora smatra da su ITS regije pogodne i da su čak i „zlatni standard“ za identifikaciju dermatofita do razine vrste (12, 121, 122, 123).

Jackson i sur. smatraju da su ITS regije pogodne za identifikaciju dermatofita, osim kod roda *Trichophyton* kad su u pitanju vrlo srodne vrste kao što su *T. rubrum* i *T. soudanense*. Njihovo istraživanje je pokazalo da je NTS (od engl. *Nontranscribed spacer*) regija pogodnija za tipizaciju vrste *T. rubrum* s obzirom da su primjenom NTS kao ciljne regije, RFLP metodom diferencirali i podvrste unutar vrste *T. rubrum* (28).

Rezaei-Matehkolaei i sur. upućuju na to da osim ITS regija kao ciljne regije posebice kod gljiva pripadnici roda *Microsporum* (*M. canis*, *M. ferrugineum* i *M. audouinii*) mogu se koristiti *BT2* (od engl. *β-tubulin*) i *TEF1* (od engl. *translation-elongation factor 1-α*) geni (124).

M. canis je dodatno identificiran u svim izolatima i sekvenciranjem ITS1-5.8S-ITS2 regije rDNK. Li i sur. su pokazali da se sekvenciranjem ITS2 regije mogu diferencirati vrste *M. audouinii*, *M. canis* i *M. ferrugineum* zbog polimorfizma u slijedu pojedinih nukleotida. Tako je kod *M. ferrugineum* na poziciji 52, baza C (citozin), a kod *M. canis* i *M. audouinii* baza je T (timin). Na poziciji 170 kod *M. audouinii* baza je T, dok kod *M. canis* i *M. ferrugineum*, baza je C (29).

	40		50		60																	
<i>M. audouinii</i> ATCC 10008 (DQ860773)	C	C	C	C	C	-	-	-	C	C	A	A	T	A	A	C	C	A	C	C	C	C
<i>M. audouinii</i> ATCC 10216 (DQ860774)	C	C	C	C	C	-	-	-	C	C	A	A	T	A	A	C	C	A	C	C	C	C
<i>M. canis</i> ATCC 10214 (DQ860776)	C	C	C	C	C	T	C	C	C	C	A	G	T	A	A	C	C	A	C	C	C	C
<i>M. canis</i> CBS 643.74 (DQ860778)	C	C	C	C	C	T	C	C	C	C	A	A	T	A	A	C	C	A	C	C	C	C
<i>M. ferrugineum</i> ATCC 11992 (DQ860784)	C	C	C	C	C	T	C	C	C	C	A	A	C	A	A	C	C	A	C	C	C	C
<i>M. ferrugineum</i> ATCC 42560 (DQ880785)	C	C	C	C	C	T	C	C	C	C	A	A	C	A	A	C	C	A	C	C	C	C
	160		170		180																	
<i>M. audouinii</i> ATCC 10008 (DQ860773)	G	A	C	C	G	G	C	C	G	G	T	A	G	G	C	T	G	G	C	C	T	
<i>M. audouinii</i> ATCC 10216 (DQ860774)	G	A	C	C	G	G	C	C	G	G	T	A	G	G	C	T	G	G	C	C	T	
<i>M. canis</i> ATCC 10214 (DQ860776)	G	A	C	C	G	G	C	C	G	G	C	A	G	G	C	T	G	G	C	C	T	
<i>M. canis</i> CBS 643.74 (DQ860778)	G	A	C	C	G	G	C	C	G	G	C	A	G	G	C	T	G	G	C	C	T	
<i>M. ferrugineum</i> ATCC 11992 (DQ860784)	G	A	C	C	G	G	C	C	G	G	C	A	G	G	C	T	G	G	C	C	T	
<i>M. ferrugineum</i> ATCC 42560 (DQ880785)	G	A	C	C	G	G	C	C	G	G	C	A	G	G	C	T	G	G	C	C	T	

Slika 31. Dio sekvence ITS2 regije, vrste *M. audouinii*, *M. canis* i *M. ferrugineum*. Prema Li i sur. (29)

Molekularne metode za dijagnozu dermatofita omogućavaju identifikaciju vrste, a u nekim slučajevima i podvrste gljiva (123, 125). Za razliku od gljiva roda *Trichophyton* gdje je zabilježen genetički polimorfizam, *M. canis* je prema rezultatima dosadašnjih istraživanja bio genotipski jednoobrazan (126-129).

Primjenom PCR-RAPD metode i korištenjem (GACA)₄ početnice Faggy i sur. nisu našli genetički polimorfizam na uzorku od 49 sojeva *M. canis* izoliranih od bolesnika i životinja (psi i mačke) (126). Slične rezultate je dobio i Shehata sa suradnicima. Primjenom (GACA)₄ početnice, dobili su jedinstveni profil za 4 analizirana izolata (130).

Dobrowolska i sur. tipizirali su izolate *M. canis* PCR-RAPD metodom, primjenom (ACA)₅ i (GACA)₄ početnica. Analizom 45 izolata *M. canis* od bolesnika i životinja u središnjoj Poljskoj, dobili su samo jedan genotip. U radu nema kliničkih podataka o tipu mikrosporoze, te da li su uopće uključeni bolesnici s dermatomikozom vlasišta (110).

Cano i sur. su, međutim, našli veliku varijabilnost među izolatima *M. canis*. Primjenom ISSR-PCR (od engl. *Inter single sequence repeat*) i korištenjem (ACA)₅ i (CCA)₅ početnica, analizirali su 24 izolata među kojima su identificirali 21 genotip, čak su izolirali i različite genotipove na istom bolesniku (131). Diskutabilno u tom istraživanju je to što Cano i sur. prethodno nisu molekularno potvrdili vrstu *M. canis*, niti su koristili referentne sojeve, a prema nekim autorima upitna je i reproducibilnost ISSR-PCR metode (119).

U našem istraživanju RAPD metodom i korištenjem (ACA)₅ i (GACA)₄ početnica, tipizirali smo 54 izolata *M. canis*. Primjenom (ACA)₅ početnice kod svih smo izolata dobili jedinstveni RAPD profil. To je u skladu s istraživanjem koje su proveli Dobrowolska i sur. koji su primjenom (ACA)₅ početnice dobili isto tako samo jedan profil u 45 izolata *M. canis*. Dobiveni fragmenti u našem istraživanju su približno veličine 450 bp i 820 bp, dok su Dobrowolska i sur. dobili također 2 fragmenta približno veličine 500 bp i 850 bp (110).

Naši rezultati nisu u skladu s nalazima koje je dobio Cano sa sur. Navedeni autori su korištenjem (ACA)₅ početnice, no primjenom ISSR-PCR metode, identificirali čak 21 genotip od 24 izolata *M. canis* (131).

Primjenom (GACA)₄ početnice i analizom dobivenih fragmenata na agaroznom gelu identificirali smo 2 profila, koje smo označili kao profil A i profil B. Profil A je bio zastupljen u 68% (N=37) izolata, a profil B u 32% (N=17) izolata. Naši rezultati nisu u tom smislu u potpunosti u skladu s prethodnim rezultatima iz literature, pri čemu je primjenom RAPD metode i (GACA)₄ početnice bio identificiran samo jedan genotip *M. canis* (110, 126, 130).

Shehata i sur. dobili su profil od 11 fragmenata u rasponu 600-2500 bp, dok su Dobrowolska i sur. također dobili profil od 11 fragmenata, no u rasponu 300-2000 bp.

Prema nekim autorima, kod RAPD metode ponekad može biti upitna reproducibilnost. Razlike u dobivenim fragmentima mogu nastati zbog diskretnih

razlika u koncentraciji početnica ili reagensija, te zbog uvjeta u laboratoriju (132). Također nije isključeno da određene varijacije u RAPD profilu mogu biti i zbog geografskog područja u kojem su uzorci prikupljeni. Shehata i sur. su prikupili uzorke od egipatskih bolesnika sa dermatomikozom kože (130), a Dobrowolska i sur. su prikupili uzorke od bolesnika i životinja iz Poljske (110).

U našem istraživanju, nije utvrđena statistički značajna razlika raspodjele prema spolu za tip kliničke slike (površinska prema duboka mikoza).

Osnovni cilj našeg istraživanja bio je istražiti genotipsku varijabilnost izolata gljive vrste *M. canis* u ispitanika s površinskom i dubokom mikozom vlasišta. Primjenom RAPD metode i korištenjem (GACA)₄ početnice dobili smo 2 PCR profila. No, u našem istraživanju nije utvrđena statistički značajna razlika raspodjele prema PCR profilu s obzirom na tip kliničke slike (površinska *versus* duboka dermatomikoza vlasišta). Sharma i sur. su u svom istraživanju identificirali 3 različita genotipa vrste *M. canis*, no genotipovi također nisu bili povezani s tipom kliničke slike. Dakle, TC je sukladno njihovim nalazima bila uzrokovana trima različitim genotipovima *M. canis* (119).

U našem je istraživanju utvrđeno da su ispitanici s dubokom mikozom vlasišta bili statistički značajno stariji (prosječno 7,3 godina) od ispitanika s površinskom mikozom vlasišta (prosječno 5 godina). Naši rezultati su u skladu s rezultatima istraživanja koje su proveli Zaraa i sur. u Tunisu u razdoblju 1999.- 2010. godine pri čemu se inflamatorna (duboka) TC najčešće pojavljivala u dobi od 5 do 10 godina (54).

U literaturi je opisano tek nekoliko slučajeva kerion Celsi u prve dvije godine života. Relativno mali broj slučajeva kerion Celsi u tom razdoblju neki autori objašnjavaju relativno nezrelim imunim sustavom djece te dobi (47, 133).

Neki autori, opet, povezuju pojavu kerion Celsi s ruralnim sredinama i niskim higijensko-socijalnim standardom (134). U našem istraživanju, kerion Celsi se ne može povezati isključivo s ruralnom sredinom s obzirom da većina ispitanika s tom dijagnozom dolazi iz većih gradova. Također u susjednoj Sloveniji, Dolenc-Voljč upozorava da je porast slučajeva TC zabilježen upravo u urbanim sredinama da nije nužno povezan isključivo s ruralnom sredinom i lošom higijenom (100).

6.3. Značenje dobivenih rezultata

U našem istraživanju ispitali smo genotipsku varijabilnost izolata gljive vrste *M. canis* u ispitanika s površinskom i dubokom mikoza vlasišta. Rezultati našeg istraživanja nisu potvrdili pretpostavku da su različiti genotipovi vrste *M. canis* odgovorni za pojavu različite kliničke manifestacije dermatomikoza vlasišta (u smislu pojave klinički bitno različite površinske ili duboke mikoze vlasišta).

No, naše istraživanje je pokazalo da *M. canis* nije genotipski jednoobrazan. Primjenom RAPD metode i korištenjem (GACA)₄ početnice identificirali smo 2 profila među ispitanim sojevima *M. canis*, što pokazuje da *M. canis* ipak nije „genotipski stabilan“ kako su pokazivale dosadašnje studije, te time otvara konkretna i precizna pitanja za daljnja istraživanja.

6.4. Nedostatak istraživanja

Nedostatak istraživanja jest relativno mali uzorak. Veličina uzorka je povezana s relativno malom učestalošću dubokih mikoza vlasišta uzrokovanih vrstom *M. canis* uopće, te s trendom opadanja broja slučajeva dermatomikoza vlasišta.

Imajući u vidu da se veliki dio pacijenata sa suspektnom mikoza vlasišta obrađuje u Laboratoriju za dermatološku mikologiju i parazitologiju u Klinici za dermatovenerologiju Kliničkog bolničkog centra Zagreb, uzorak najvjerojatnije dobro reprezentira populaciju s dubokom mikoza vlasišta u Republici Hrvatskoj. Veći uzorak bi podrazumijevao multicentričnu, no i dugogodišnju studiju, uzimajući u obzir da se dermatomikoze vlasišta uzrokovane vrstom *M. canis* pojavljuju najčešće u središnjoj i jugoistočnoj Europi i da se bilježi trend opadanja broja verificiranih kultura *M. canis*.

7. ZAKLJUČCI

- *M. canis* je vodeći uzročnik dermatomikoza vlasišta u Republici Hrvatskoj.
- Učestalost zoofilne mikrosporoze vlasišta je još uvijek visoka, no, tijekom desetogodišnjeg razdoblja (2006.-2015.) vidljiv je trend opadanja broja kulturom potvrđenih dermatomikoza vlasišta u prvih pet godina istraživanja, uz stabilizaciju broja pozitivnih kultura zadnjih 5 godina.
- Vidljiv je statistički značajno veći udio dermatomikoze vlasišta unutar svih kliničkih manifestacija dermatofitoza u zadnje 3 godine istraživanja (2013.-2015.).
- Antropofilni uzročnici se pojavljuju sporadično u Republici Hrvatskoj.
- Dermatomikoza vlasišta se najčešće pojavljuje u djece od 4 do 8 godina života, učestalije kod muških nego kod ženskih ispitanika.
- Utvrđeno je da su ispitanici s dubokom mikoza vlasišta bili statistički značajno stariji (prosječno 7,3 godina) od ispitanika s površinskom mikoza vlasišta (prosječno 5 godina).
- Nije utvrđena statistički značajna razlika raspodjele prema spolu s obzirom na tip kliničke slike (površinska *versus* duboka mikoza vlasišta).
- Primjenom suvremenih molekularno-medicinskih dijagnostičkih metoda identificirana su 2 PCR profila unutar vrste *M. canis*.
- Tip kliničke slike mikrosporoze vlasišta (površinska *versus* duboka mikoza vlasišta) nije rezultat infekcije točno određenim genotipom gljive vrste *M. canis*. Oba tipa kliničke slike mikrosporoze vlasišta mogu biti uzrokovana istim genotipom *M. canis*.

8. SAŽETAK

Varijacije u kliničkoj slici i epidemiologiji dubokih dermatomikoza vlasišta

Standardni obrazac kliničke slike dermatomikoze vlasišta uzrokovane gljivom vrste *Microsporum canis* jest površinska dermatomikoza karakterizirana cirkumskriptnim eritemom, adherentnom deskvamacijom i poremećajem integriteta vlasi. Zadnjih dvadesetak godina primjećuje se, međutim, da ista vrsta gljive može biti i uzročnikom vrlo impresivne kliničke slike duboke mikoze vlasišta (kerion Celsi) karakterizirane granulomatoznom upalom, tumoroznom masom i obilnom pustuloznom sekrecijom, što, uzevši u obzir tipičnu pojavnost u dječjoj dobi, može ozbiljno uticati na kvalitetu zdravlja djeteta i opravdanu zabrinutost roditelja. Razlog pojavi da ista vrsta gljive može uzrokovati dva klinički vrlo različita obrasca kliničke slike mikoze vlasišta nije još objašnjen.

Osnovna pretpostavka ovog istraživanja bila je da različiti genotipovi gljive vrste *M. canis* uzrokuju površinsku odnosno duboku mikozu vlasišta kao dva zasebna klinička entiteta i da genotipske razlike unutar gljive vrste *M. canis* su odgovorne za pojavu različite virulentnosti gljive, te time i za pojavu različitih kliničkih manifestacija mikrosporoze vlasišta. Primarni cilj istraživanja bio je ispitati genotipsku varijabilnost izolata gljive vrste *M. canis* u ispitanika s površinskom i dubokom mikozom vlasišta.

U ispitivanje je bilo uključeno 60 ispitanika - djeca u dobi od 2 do 12 godina (30 ispitanika s površinskom i 30 ispitanika s dubokom mikozom vlasišta). Primjenom metodologije mikološke obrade u svih ispitanika je identificirana vrsta *M. canis*. Morfološka identifikacija je potvrđena molekularnom metodom PCR-RFLP (*Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism*), amplifikacijom ITS1-5.8S-ITS2 regije i primjenom *Hinfl* restrikcijskog enzima. Za subtipizaciju *M. canis* korištena je RAPD (*Random Amplified Polimorphic DNA*) metoda, primjenom (ACA)₅ i (GACA)₄ početnica. Korištenjem (ACA)₅ početnice dobiven je jedinstveni RAPD profil. Primjenom (GACA)₄ početnice identificirana su dva RAPD profila.

U epidemiološkom dijelu našeg istraživanja zaključili smo da je (i dalje) *M. canis* vodeći uzročnik dermatomikoza vlasišta u Republici Hrvatskoj. Učestalost zoofilne mikrosporoze vlasišta još je uvijek visoka, no, tijekom desetogodišnjeg razdoblja (2006.-2015.) vidljiv je trend opadanja broja kulturom potvrđenih dermatomikoza vlasišta u prvih pet godina istraživanja, uz stabilizaciju broja pozitivnih kultura zadnjih 5 godina. Vidljiv je i statistički značajno veći udio dermatomikoze vlasišta unutar svih kliničkih manifestacija dermatofitoza u zadnje 3 godine istraživanja (2013.-2015.).

Na temelju rezultata molekularno-medicinskog dijela istraživanja nije utvrđena statistički značajna razlika raspodjele prema PCR profilu za tip kliničke slike (površinska *versus* duboka dermatomikoza vlasišta). No, istraživanje je pokazalo da *M. canis* nije genotipski jednoobrazan. Primjenom RAPD metode i korištenjem (GACA)₄ početnice identificirali smo dva profila među ispitanim sojevima *M. canis*, što pokazuje da *M. canis* ipak nije „genotipski stabilan“ kako pokazuju dosadašnje studije.

Na temelju rezultata našeg istraživanja može se, između ostalog zaključiti da tip kliničke slike mikrosporoze vlasišta (površinska *versus* duboka mikoza vlasišta) nije rezultat infekcije točno određenim genotipom gljive vrste *M. canis*. Oba tipa kliničke slike mikrosporoze vlasišta mogu biti uzrokovana istim genotipom *M. canis*.

9. SUMMARY

The clinical pattern variations and epidemiology of deep seated tinea capitis

Biljana Gorgievska-Sukarovska, 2017

Tinea capitis caused by *Microsporum canis* is usually noninflammatory. However, progressive number of severe kerion like tinea capitis (TC) due to *M. canis* has been recently registered. Providing that the same fungal species might evoke different clinical patterns, interspecies polymorphism within *M. canis* isolates might have been responsible for this phenomenon.

The aim of this study was to examine genotypic variability among isolates of *M. canis* from patients with superficial and deep seated tinea capitis.

Sixty strains of *M. canis* from patients with both superficial and deep seated tinea capitis have been isolated and identified to the species level using standard and advanced mycological procedure techniques. Morphological identification was confirmed by molecular methods PCR-RFLP (*Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism*). After amplification of ITS1-5.8S-ITS2 region, the PCR product was exposed to restriction enzyme *Hinfl*. All strains of *M. canis* had identical pattern on gel electrophoresis. For sub typing of *M. canis* isolates the RAPD (*Random Amplified Polimorphic DNA*) has been performed using (ACA)₅ and (GACA)₄ primers. After RAPD amplification with (ACA)₄ primer, among all *M. canis* isolates only one RAPD profile was determined, whereas using (GACA)₄ primer two different band patterns were confirmed.

According to the results of the epidemiological part of our study *M. canis* remained the main causative agent of TC in Croatia. The incidence of TC remained high during the ten-years period (2006-2015), but decrease in the incidence of TC was observed in the first 5 years, with stable incidence of TC during the last 5 years of the study period. A statistically significant increase of TC among all fungal skin infections during the last 3 years was observed.

The association between RAPD profiles and certain clinical type of tinea capitis was not determined by the use of GACA₄ primer . Results of most molecular studies show that there is no clonal differentiation within *M. canis*. Moreover, using the same (GACA)₄ primer *M. canis* was found not to be genotypically unique. However, further investigations on larger group of patients might be required in order to elucidate this problem more precisely.

10. POPIS LITERATURE

1. Havlickova B, Czaika VA, Friedrich M. Epidemiological trends in skin mycoses worldwide. *Mycoses* 2008;51:2-15.
2. Hibbett DS, Binder M, Bischoff JF, Blackwell M, Cannon PF, Eriksson OE et al. A higher-level phylogenetic classification of the fungi. *Mycol Res* 2007;111:509-47.
3. Crous PW, Giraldo A, Hawksworth DL, Robert V, Kirk PM, Guarro J et al. The genera of fungi: fixing the application of type species of generic names. *IMA Fungus* 2014;5:141-61.
4. Wagner DK, Sohnle PG. Cutaneous defenses against dermatophytes and yeasts. *Clin Microbiol Rev* 1995;8:317-35.
5. Weitzman I, Summerbel RS. The dermatophytes. *Clin Microbiol Rev* 1995;8:240-59.
6. Mohrenschlager M, Seidl HP, Ring J, Abeck D. Pediatric tinea capitis: recognition and menagement. *Am J Clin Dermatol* 2005;6:203-13.
7. Hayette MP, Sacheli R. Dermatophytosis, trends in epidemiology and diagnostic approach. *Curr Fungal Infect Rep* 2015;9:164-79.
8. Marchisio VF, Gallo MG, Tullio V, Nepote S, Piscozzi A, Cassineli C. Dermatophytes from cases of skin disease in cats and dogs in Turin, Italy. *Mycoses* 1995;38:239-44.
9. Castanon-Olivares LR, Manzano-Gayosso P, Lopez-Martinez R, De la Rosa-Valazquez IA, Soto-Rayes-Solis E. Effectiveness of terbinafine in the eradication of *Microsporium canis* from laboratory cats. *Mycoses* 2001;44:95-7.

10. Emmons CW. Dermatophytes; natural groupings based on the form of the spores and accessory organs. *Arch Dermatol Syphilol* 1934;30:337-62.
11. Sobera JO, Elewski BE. Fungal diseases. In: Bologna JL, Jorizzo JL, Rapini RP, editors. *Dermatology-second edition*. Elsevier;2008. p.1135-63.
12. Graser Y, Scott J, Summerbel R. The new species concept in dermatophytes-a polyphasic approach. *Mycopathologia* 2008;166:239-56.
13. Sharma A, Chandra S, Sharma M. Difference in keratinase activity of dermatophytes at different environmental conditions is an attribute of adaptation to parasitism. *Mycoses* 2012;55:410-5.
14. Dahl MV. Suppression of immunity and inflammation by products produced by dermatophytes. *J Am Acad Dermatol* 1993;28:19-23.
15. Blake JS, Cabrera RM, Dahl MV, Ilerron MJ, Nelson RD. Comparison of the immunoinhibitory properties of cell wall mannan glycoproteins from *Trichophyton rubrum* and *Microsporum canis*. *J Invest Dermatol* 1991;96:601-8.
16. Kasperova A, Kunert J, Raska M. The possible role of dermatophyte cystein dioxygenase in keratin degradation. *Med Mycol* 2013;51:449-54.
17. Mond M. Secreted proteases from dermatophytes. *Mycopathologia* 2008;166:285-94.
18. Mignon B, Swinnen M, Bouchara P, Hofinger M, Nikkels A, Pierard G et al. Purification and characterization of a 315 kDa keratinolytic subtilisin-like serine protease from *Microsporum canis* and evidence of its secretion in naturally infected cats. *Med Mycol* 1998;36:395-404.

19. Descamps F, Brouta F, Mond M, Zaugg C, Baar D, Losson B et al. Isolation of a *Microsporium canis* gene family encoding three subtilisin-like proteases expressed *in vivo*. *J Invest Dermatol* 2002;119:830-5.
20. Vermout S, Tabrat J, Baldo A, Mathy A, Losson B, Mignon B. Pathogenesis of dermatophytosis. *Mycopathologia* 2008;166:267-75.
21. Shiraki Y, Ishibashi Y, Hiruma M, Nishikawa A, Ikeda S. Cytokine secretion profiles of human keratinocytes during *Trichophyton tonsurans* and *Arthroderma benhamiae* infections. *J Med Microbiol* 2006;55:1175-85.
22. Panasiti V, Borroni RG, Devirgiliis V, Rossi M, Fabbrizio L, Masciangelo R et al. Comparison of diagnostic methods in the diagnosis of dermatomycoses and onychomycoses. *Mycoses* 2006;49:26-9.
23. Robert R, Pihet M. Conventional methods for the diagnosis of dermatophytes. *Mycopathologia* 2008;166:295-306.
24. Weinberg JM, Koestenblatt EK, Tutrone WD, Tishler HR, Najarian L. Comparison of diagnostic methods in the evaluation of onychomycosis. *J Am Acad Dermatol* 2003;49:193-7.
25. Tenover FC, Arbeit R, Archer G, Biddle J, Byrne S, Goering R et al. Comparison of traditional and molecular methods of typing isolates of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 1994;32:407-15.
26. Abder-Rahman SM. Strain differentiation of dermatophytes. *Mycopathologia* 2008;166:319-33.
27. Atkins SD, Clark IM. Fungal molecular diagnostics: a mini review. *J Appl Genet* 2004;45:3-15.

28. Jackson CJ, Barton RC, Evans EG. Species identification and strain differentiation of dermatophyte fungi by analysis of ribosomal-DNA intergenic spacer regions. *J Clin Microbiol* 1999;37:931-6.
29. Li HC, Bouchara JP, Hsu MML, Barton R, Su S, Chang TC. Identification of dermatophytes by sequence analysis of the rRNA gene internal transcribed spacer regions. *J Med Microbiol* 2008;57:592-600.
30. Op De Beeck M, Lievens B, Busschaert P, Declerck S, Vangronsveld J, Colpaert JV. Comparison and validation of some ITS primer pairs useful for fungal metabarcoding studies. *PLoS One* 2014;9:e97629.
31. Graser Y, Kuijpers AFA, Presber W, de Hoog GS. Molecular taxonomy of the *Trichophyton rubrum* complex. *J Clin Microbiol* 2000;33:29-36.
32. Graser Y, El Fari M, Vilgalys R, Kuijpers AFA, de Hoog GS, Presber W et al. Phylogeny and taxonomy of the family *Arthodermataceae* (dermatophytes) using sequence analysis of the ribosomal ITS region. *Medical Mycology* 1999;37:105-14.
33. Roque HD, Vieira R, Rato S, Luz-Martins M. Specific primers for rapid detection of *Microsporum audouinii* by PCR in clinical samples. *J Clin Microbiol* 2006;44:4336-41.
34. Brillowska-Dobrowska A, Saunte DM, Arendrup MC. Five-hour diagnosis of dermatophyte nail infections with specific detection of *Trichophyton rubrum*. *J Clin Microbiol* 2007;45:1200-4.
35. Garg J, Tilak R, Singh S, Gulati AK, Garg A, Prakash P et al. Evaluation of pan-dermatophyte nested PCR in diagnosis of onychomycosis. *J Clin Microbiol* 2007;45:3443-5.
36. Kardjeva V, Summerbell R, Kantardjiev T, Devlitotou-Panagiotidou D, Sotiriou E, Graser Y. Forty-eight-hour diagnosis of onychomycosis with

- subtyping of *Trichophyton rubrum* strains. J Clin Microbiol 2006;44:1419-27.
37. Kamiya A, Kikuchi A, Tomita Y, Kanabe T. PCR and PCR-RFLP techniques targeting the DNA topoisomerase II gene for rapid clinical diagnosis of the etiologic agent of dermatophytosis. J Dermatol Sci 2004;34:35-48.
 38. Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acid Res 1990;18:6531-5.
 39. Sanger F, Coulson AR, Barrell BG, Smith AJH, Roe BA. Cloning in single-stranded bacteriophage as an aid to rapid DNA sequencing. J Mol Biol 1980;143:161-78.
 40. Maxam AM, Gilbert W. A new method for sequencing DNA proceedings of the National Academy of Sciences. 1977;74:560-4.
 41. Metzker ML. Sequencing technologies-the next generation. Genetics 2009;11:31-46.
 42. Nelson MM, Martin A, Heffernan M. Superficial fungal infections: dermatophytosis, onychomycosis, tinea nigra, piedra. In: Freedberg IM, Eisen AZ, Wolff K, Austen KF, Goldsmith LA, Katz S, editors. Fitzpatrick's Dermatology in general medicine. McGraw-Hill; 2003.p.1989-2005.
 43. Korting HC. Fungal infections. In Burgdorf WHC, Plewig G, Wolff HH, Landthaler M, editors. Braun-Falco's Dermatology. Springer; 2009.p.205-39.
 44. Ginter-Hanselmayer G, Weger W, Ilkit M, Smolle J. Epidemiology of tinea capitis in Europe: current state and changing patterns. Mycoses 2007;50:6-13.

45. Smith ML. Tinea capitis. *Pediatr Ann* 1996;25:101-5.
46. Michaels BD, Del Rosso JQ. Tinea capitis in infants: recognition, evaluation and management suggestions. *J Clin Aesthet Dermatol* 2012;21:49-59.
47. Romano C, Gianni C, Papini M. Tinea capitis in infants less than 1 year of age. *Pediatr Dermatol* 2001;18:465-8.
48. Carvetti O, Albini P, Arese V, Ibba F, Novarino M, Panzone M. Tinea capitis in adults. *Adv Microbiol* 2014;4:12-14.
49. Morell L, Fuente MJ, Boada A, Carrascosa LM, Ferrandiz C. Tinea capitis in elderly women: a report of 4 cases. *Actas Dermosifiliogr* 2012;103:144-8.
50. Chen W, Mempel M, Traidl-Hofmann C, Al Khusaei S, Ring J. Gender aspects in skin diseases. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2010;24:1378-85.
51. Prohić A. An epidemiological survey of tinea capitis in Sarajevo, Bosnia and Herzegovina over a 10-year period. *Mycoses* 2008;51:161-4.
52. Skerlev M, Miklić P. The changing face of *Microsporum* spp infections. *Clin Dermatol* 2010; 28:146-50.
53. Aly R. Ecology, epidemiology and diagnosis of tinea capitis. *Pediatr Infect Dis J* 1999;18:180-5.
54. Zaraa I, Hawilo A, Trojjet S, El Euch D, Mokni M, Ben OA. Tinea capitis in infants in their first 2 years of life: a 12-year study and review of the literature. *Dermatol online J* 2012;18:16.

55. Ajello L, Georg LK. In vitro hair cultures for differentiating between atypical isolates of *Trichophyton mentagrophytes* and *Trichophyton rubrum*. *Mycopathol Mycol Appl* 1957;8:3-17.
56. Salkin IF, Hillick GE, Hurd NJ, Kemna ME. Evaluation of human hair sources for the in vitro hair perforation test. *J Clin Microbiol* 1985;22:1048-9.
57. Elewski BE. Tinea capitis: a current perspective. *J Am Acad Dermatol* 2000;42:1-20.
58. Ates A, Oscan K, Ilkit M. Diagnostic value of morphological, physiological and biochemical tests in distinguishing *Trichophyton rubrum* from *Trichophyton mentagrophytes* complex. *Med Mycol* 2008;46:811-22.
59. Fuller LC, Barton RC, Mohd Mustapa MF, Proudfoot LE, Punjabi SP, Higgins EM. British Association of Dermatologists guidelines for the management of tinea capitis 2014. *Br J Dermatol* 2014;171:454-63.
60. Greer DL. Successful treatment of tinea capitis with 2% ketoconazole shampoo. *Int J Dermatol* 2000;39:302-4.
61. Allen HB, Honing PJ, Leyden JJ, McGinley KJ. Selenium sulfide: adjunctive therapy for tinea capitis. *Pediatrics* 1982;69:81-3.
62. Lorch Dauk KC, Comrov E, Blumer JL, O'Riordan MA, Furman LM. Tinea capitis: predictive value of symptoms and time to cure with griseofulvin treatment. *Clin Pediatr (Phila)* 2010;49:280-6.
63. Hubbard TW. The predictive value of symptoms in diagnosing childhood tinea capitis. *Arch Pediatr Adolesc Med* 1999;153:1150-3.
64. Bennassar A, Grimalt R. Management of tinea capitis in childhood. *Clin Cosmet Investig Dermatol* 2010;3:89-98.

65. Bennet ML, Fleischer AB, Loveless JW, Feldman SR. Oral griseofulvin remains the treatment of choice for tinea capitis in children. *Pediatr Dermatol* 2000;17:304-9.
66. Roberts BJ, Friedlander SF. Tinea capitis: a treatment update. *Pediatric Ann* 2005;34:191-200.
67. Gupta AK, Drummon-Main C. Meta-analysis of randomised, controlled trials comparing particular doses of griseofulvin and terbinafine for the treatment of tinea capitis. *Pediatr Dermatol* 2013;30:1-6.
68. Birnbaum JE. Pharmacology of the allylamines. *J Am Acad Dermatol* 1990;23:782-5.
69. Newland JG, Abdel-Rahman SM. Update on terbinafine with a focus on dermatophytoses. *Clin Cosmet Investig Dermatol* 2009;2:49-63.
70. Fuller LC, Smith CH, Cerio R, Marsden RA, Midgley G, Beard AL et al. A randomised comparison of 4 weeks of terbinafine vs. 8 weeks of griseofulvin for the treatment of tinea capitis. *Br J Dermatol* 2001;144:321-7.
71. Shah VP, Epstein WL, Riegelman S. Role of sweat in accumulation of orally administered griseofulvin in skin. *J Clin Invest* 1974;1673-8.
72. Lipozenčić J, Skerlev M, Orofino-Costa R, Zaitz VC, Horvath A, Chouela E et al. A randomized, double-blind, parallel-group, duration-finding study of oral terbinafine and open-label, high-dose griseofulvin in children with tinea capitis due to *Microsporum* species. *Br J Dermatol* 2002;146:816-23.
73. Koumantaki E, Kakourou T, Rallis E, Riga P, Georgala S. Double dose of terbinafine is required for *Microsporum canis* tinea capitis. *Pediatr Dermatol* 2001;18:339-42.

74. Gupta AK, Hofstader SLR, Summerbell RC, Solomon R, Adam P, Alexis M et al. Treatment of tinea capitis with itraconazole capsule pulse therapy. *J Am Acad Dermatol* 1988;39:216-9.
75. Gupta AK, Solomon RS, Adam P. Itraconazole oral solution for the treatment of tinea capitis. *Br J Dermatol* 1998;139:104-6.
76. Binder B, Richtig E, Weger W, Ginter-Hanselmayer G. Tinea capitis in early infancy treated with itraconazole: a pilot study. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2009;23:1161-3.
77. Ginter-Hanselmayer G, Seebacher C. Treatment of tinea capitis-a critical appraisal. *J Dtsch Dermatol Ges* 2011;9:109-14.
78. Valari M, Iordanidou A, Raftopoulou A, Pangalis A. Fluconazole in the treatment of pediatric tinea capitis caused by *Microsporum canis*. *Drugs Exp Clin Res* 2002;28:161-4.
79. Foster KW, Friedlander SF, Panzer H, Ghannoum MA, Elewski BE. A randomized controlled trial assessing the efficacy of fluconazole in the treatment of pediatric tinea capitis. *J Am Acad Dermatol* 2005;53:798-809.
80. Gupta AK, Diova N, Morar N, Toborda V, Lynde CW, Konnikov N et al. Once weekly fluconazole is effective in children in the treatment of tinea capitis: a prospective, multicentre study. *Br J Dermatol* 2000;142:965-8.
81. Seebacher C, Abeck D, Brasch J, Cornely O, Daeschlein G, Effendy I et al. Tinea capitis: ringworm of the scalp. *Mycoses* 2007;50:218-26.
82. Wrong NM, Rosset M, Hudson AL, Rogers S. Griseofulvin in the treatment of superficial fungous infections. *Canad M A J* 1959;81:167-73.

83. Elewski BE, Caceres HW, De Leon L, El Shimy S, Hunter JA, Korotkiy N et al. Terbinafine hydrochloride oral granules versus oral griseofulvin suspension in children with tinea capitis: results of two randomized, investigator-blinded, multicenter, international, controlled trials. *J Am Acad Dermatol* 2008;59:41-54.
84. Alvarez MS, Silverberg NB. Tinea capitis. *Cutis* 2006;78:189-96.
85. Sinski JT, Flouras K. A survey of dermatophytes isolated from human patients in the United States from 1979 to 1981 with chronological listings of worldwide incidence of five dermatophytes often isolated in the United States. *Mycopathologia* 1984;85:97-120.
86. Sinski JT, Kelley LM. A survey of dermatophytes isolated from human patients in the United States from 1982 to 1984. *Mycopathologia* 1987;98:35-40.
87. Sinski JT, Kelley LM. A survey of dermatophytes from human patients in the United States from 1985 to 1987. *Mycopathologia* 1991;114:117-26.
88. Bronson DM, Desai DR, Barsky S, Foley SM. An epidemic of infection with *Trichophyton tonsurans* revealed in a 20-year survey of fungal infections in Chicago. *J Am Acad Dermatol* 1983;8:322-30.
89. Rippon JW. Forty four years of dermatophytes in a Chicago clinic (1944-1988). *Mycopathologia* 1992;119:25-8.
90. Naseri A, Fata A, Najafzadeh MJ, Shokri H. Surveillance of dermatophytosis in northeast of Iran (Mashhad) and review of published studies. *Mycopathologia* 2013;176:247-53.
91. Sadeghi G, Abouei M, Alirezaee M, Tolouei R, Shams-Ghahfarokhi M, Mostafavi E et al. A 4-year survey of dermatomycoses in Teheran from 2006 to 2009. *Med Mycol* 2011;21:260-5.

92. Coulibaly O, Thera MA, Pirroux R, Doumbo OK, Ranque S. High dermatophyte contamination levels in hairdressing salons of a West African suburban community. *Mycoses* 2015;58:65-8.
93. Woldeamanuel Y, Mengistu Y, Chryssanthou E, Petrini B. Dermatophytosis in Tulugudu Island, Ethiopia. *Med Mycol* 2005;43:79-82.
94. Blaschke-Hellmessen R, Haufe U, Seebacher C. Statistischer Bericht über die Dermatophytenflora bei Dermatomykosen in der DDR von 1967 bis 1971. *Dermatol Monschr* 1975;161:433-49.
95. Sberna F, Farrela V, Geti V, Taviti F, Agostini G, Vannini P et al. Epidemiology of dermatophytoses in the Florence area of Italy: 1985-1990. *Trichophyton mentagrophytes*, *Epidermophyton floccosum* and *Microsporum gypseum* infections. *Mycopathologia* 1993;122:153-62.
96. Vena GA, Chieco P, Posa F, Garofalo A, Bosco A, Cassano N. Epidemiology of dermatophytoses: retrospective analyses from 2005 to 2010 and comparison with previous data from 1975. *New Microbiol* 2012;35:207-13.
97. Mercantini R, Moretto D, Palamara G, Mercantini P, Marsella R. Epidemiology of dermatophytoses observed in Rome, Italy, between 1985 and 1993. *Mycoses* 1995;38:415-9.
98. Binder B, Lackner HK, Poessl BD, Propst E, Weger W, Smolle J et al. Prevalence of tinea capitis in Southeastern Austria between 1985 and 2008: up-to-date picture of the current situation. *Mycoses* 2011;54:243-7.
99. Lunder M. *Microsporum canis* infection in Slovenia (Yugoslavia) 1952-1983. *Mycosen* 1984;27:514-8.
100. Dolenc Voljč M. Dermatophyte infections in the Ljubljana region, Slovenia, 1995-2002. *Mycoses* 2005;48:181-6.

101. Mapelli ET, Cerri A, Bombonato C, Menni S. Tinea capitis in the paediatric population in Milan, Italy: the emergence of *T. violaceum*. *Mycopathologia* 2013;176:243-6.
102. Drakenzjo IT, Chryssanthou E. Epidemiology of dermatophyte infections in Stockholm, Sweden: a retrospective study from 2005-2009. *Med Mycol* 2011;49:484-8.
103. Kieliger S, Glatz M, Cozzio A, Bosshard PP. Tinea capitis and tinea faciei in the Zurich area- an 8-year survey of trends in the epidemiology and treatment pattern. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2015;29:1524-9.
104. Skerlev M, Cerjak N, Murat-Sušić S, Lipozenčić J, Basta-Juzbašić A. An intriguing and unusual clinical manifestation of *Microsporum canis* infection. *Acta Dermatovenerol Croat* 1996;4:117-20.
105. Lipozenčić J, Skerlev M, Pašić A. Overview: changing face of cutaneous infections. *Clin Dermatol* 2002;20:104-8.
106. Babić-Erceg A, Barišić Z, Erceg M, Babić A, Borzić E, Zoranić V et al. Dermatophytoses in Split and Dalmatia, Croatia, 1996-2002. *Mycoses* 2004;47:297-9.
107. Kaštelan M, Utješinović-Gudelj V, Prpić-Massari L, Brajac I. Dermatophyte Infections in Primorsko-Goranska Country, Croatia: a 21-year survey. *Acta Dermatovenerol Croat* 2014;22:175-9.
108. Miklić P, Skerlev M, Budimčić D, Lipozenčić J. The frequency of superficial mycoses according to agents isolated during a ten-year period (1999-2008) in Zagreb area, Croatia. *Acta Dermatovenerol Croat* 2010;18:92-8.

109. Skerlev M. Kerion celsi: the changing face of *Microsporum* species infection. 2nd. Trends in medical mycology, Oct 23-26, 2005, Berlin. Germany. (Abstract) *Mycoses* 2005;48:69.
110. Dobrowolska A, Debska J, Kozłowska M, Staczek P. Strain differentiation of *Microsporum canis* by RAPD analysis using (GACA)₄ and (ACA)₅ primers. *Pol J Microbiol* 2011;60:145-8.
111. Koliivras A, Lateur N, De Maubeuge J, Scheers C, Wiame L, Song M. Tinea capitis in Brussels: epidemiology and new management strategy. *Dermatology* 2003;206:384-7.
112. Reichert-Penetrat S, Contet-Audonneau N, Barbaud A, Schurra JP, Fortier B, Schmutz JL. Epidemiology of dermatophytoses in children living in northeast France: a 5-year study. *Pediatr Dermatol* 2002;19:103-5.
113. Jankowska-Konsur A, Dylag M, Hryniewicz-Gwozdz A, Plomer-Niezgoda E, Czepietowski C. A 5-year of dermatomycoses in southwest Poland, years 2003-2007. *Mycoses* 2009;54:162-7.
114. Seebacher C, Bouchara JP, Mignon B. Updates on the epidemiology of dermatophyte infections. *Mycopathologia* 2008;166:335-52.
115. Gianni C, Betti R, Perotta E, Crosi C. Tinea capitis in adults. *Mycoses* 1995;38:329-31.
116. Gupta AK, Summerbel RC. Increased incidence of *Trichophyton tonsurans*, Tinea capitis in Ontario, between 1985 and 1996. *Med Mycol* 1998;36:55-60.
117. Martin ES, Elewski BE. Tinea capitis in adult women masquerading as bacterial pyoderma. *J Am Acad Dermatol* 2003;49:77-9.

118. Mebazaa A, Oumari KE, Ghariani N, Mili AF, Belajouza C, Nouria R et al. Tinea capitis in adults in Tunisia. *I J Dermatol*. 2010;59:513-6.
119. Sharma R, de Hoog S, Presber W, Graser Y. A virulent genotype of *Microsporum canis* is responsible for the majority of human infections. *J Med Microbiol* 2007;56:1377-85.
120. Dobrowolska A, Staczek P, Kozłowska M. PCR-RLFP analysis of the dermatophytes isolated from patients in Central Poland. *J Dermatol Sci* 2006;42:71-4.
121. Graser Y, El Fari M, Presber W, Sterry W, Tietz HJ. Identification of common dermatophytes (*Trichophyton*, *Microsporum*, *Epidermophyton*) using polymerase chain reactions. *Br J Dermatol* 1998;138:576-82.
122. Makimura K, Tamura Y, Mochizuki T, Hasegawa A, Tajiri Y, Hanasawa R et al. Phylogenetic classification and species identification of dermatophyte strains based on sequences of nuclear ribosomal internal transcribed spacer 1 regions. *J Clin Microbiol* 1999;37:920-4.
123. Kanabe T. Molecular approaches in the diagnosis of dermatophytosis. *Mycopathologia* 2008;166:307-17.
124. Rezaei-Matehkolaei A, Makimura K, de Hoog GS, Shidfar AR, Satoh K, Najafzadeh MJ et al. Multilocus differentiation of the related dermatophytes *Microsporum canis*, *Microsporum ferrugineum* and *Microsporum audouinii*. *J Med Micol* 2012;61:57-63.
125. White TC, Oliver BG, Graser Y, Henn MR. Generating and testing molecular hypotheses in the dermatophytes. *Eucaryot Cell* 2008;7:1238-45.

126. Faggy E, Pini G, Campisi E, Bertellini C, Difonso E, Mancianti F. Application of PCR to distinguish common species of dermatophytes. *J Clin Microbiol* 2001;39:3382-5.
127. Baeza LC, Matsumoto MT, Almeida AMF, Mendes-Giannini MJS. Strain differentiation of *Trichophyton rubrum* by randomly amplified polymorphic DNA and analysis of rDNA nontranscribed spacer. *J Med Microbiol* 2006;55:429-36.
128. Ciszak-Leibner J, Dobrowolska A, Krawczyk A, Staczek P. Evaluation of PCR melting profile method for intraspecies differentiation of *Trichophyton rubrum* and *Trichophyton interdigitale*. *J Med Microbiol* 2010;59:185-92.
129. Hryniewicz-Gwozdz A, Jagielski T, Dobrowolska A, Szepitowski JC, Baran E. Identification and differentiation of *Trichophyton rubrum* isolates using PCR-RFLP and RAPD methods. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2011;30:727-31.
130. Shehata AS, Mukherjee PK, Aboulatta HN, Akhras AIE, Abbadi SH, Ghannoum MA. Single-step PCR using (GACA)₄ primer: utility for rapid identification of dermatophyte species and strains. *J Clin Microbiol* 2008;40:2641-5.
131. Cano J, Rezusta A, Sole M, Gil J, Rubio MC, Revillo MJ, Guarro J. Inter-single-sequence-repeat-PCR typing as a new tool for identification of *Microsporum canis* strains. *J Dermatol Sci* 2005;39:17-21.
132. Ellsworth DI, Rittenhouse KD, Honeycutt RI. Artifactual variation in randomly amplified polymorphic DNA banding patterns. *Biotechniques* 1993;14:214-7.
133. Larralde M, Gomar B, Boggio P, Abad ME, Pagotto B. Neonatal kerion Celsi: report of three cases. *Pediatr Dermatol* 2010;27:361-3.

134. del Boz J, Crespo V, Rivaz-Ruiz F, de Troya M. A 30-year survey of paediatric tinea capitis in southern Spain. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2011;25:170-4.

10. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 10. prosinca 1969. godine u Velesu, R. Makedonija, gdje sam završila osnovnu školu i Gimnaziju. Na Medicinskom fakultetu Sveučilišta „Kiril i Metodij“ u Skopju, diplomirala sam 1994. godine. Pripravnički staž obavila sam u Kliničkom bolničkom centru u Skopju. Godine 1995. položila sam stručni ispit i nakon toga radila sam kao liječnik opće prakse u Velesu.

Specijalizaciju iz dermatovenerologije započela sam 2006. godine u Klinici za kožne i spolne bolesti KBC Zagreb. Tijekom specijalizacije završila sam poslijediplomski studij iz dermatovenerologije. Specijalistički ispit položila sam 2010. godine. Od tada radim kao specijalist dermatovenerologije u Općoj bolnici Zabok.

Autor sam više znanstvenih radova objavljenih u indeksiranim časopisima.

Član sam Hrvatskog liječničkog zbora i Hrvatskog dermatovenerološkog društva.