

Magdalena Skóra¹, Jacek Bielecki², Małgorzata Bulanda³,
Anna Barbara Macura¹, Tomasz Jagielski^{2*}

¹Zakład Mykologii, Katedra Mikrobiologii, Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum

²Zakład Mikrobiologii Stosowanej, Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski

³Zakład Epidemiologii Zakażeń, Katedra Mikrobiologii, Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum

Wpłynęło we wrześniu 2014 r.

1. Wprowadzenie. 2. Pozycja taksonomiczna. 3. Morfologia. 4. Występowanie. 5. Znaczenie w medycynie człowieka. 5.1. Grzybnice skóry i paznokci. 5.2. Inne postacie zakażeń. 6. Diagnostyka zakażeń. 7. Wrażliwość na leki przeciugrzybicze. 8. Leczenie. 9. Podsumowanie. 10. Piśmiennictwo

Fungi of the genus *Scopulariopsis* – ill-defined human pathogens

Abstract: The genus *Scopulariopsis* accommodates more than 30 species of mitosporic moulds. Their natural habitat is the soil, where they live as saprophytes and are involved in the decomposition of organic matter. However, some members of the *Scopulariopsis* genus may cause opportunistic infections in humans. Superficial skin lesions and onychomycosis in particular are the most predominant clinical manifestations. Much rarer are subcutaneous, deep tissue and disseminated infections, most of which occur in immunocompromised individuals and are associated with high mortality. Treatment of *Scopulariopsis* infections is difficult and usually empirically-based, one reason for this being resistance of *Scopulariopsis* spp. to a broad spectrum of antifungal agents. Identification of pathogenic *Scopulariopsis* spp. still largely relies on the phenotype-based methods, employing both morphological and biochemical criteria. These methods require highly qualified personnel and are usually considered as slow and laborious, often leading to misidentification. Therefore, molecular diagnostic methods are preferred, since they provide rapid, high-throughout, unambiguous and highly specific identification of fungal pathogens. Earlier attempts to develop assays for detecting *Scopulariopsis* spp. resulted in limited success. These assays, almost exclusively based on the hypervariable regions of the large subunit (LSU) rRNA, often produce inconclusive results and, more importantly, lack specificity, being unable to discriminate between different *Scopulariopsis* spp. Hence, currently available molecular methods do not allow inter- and intra-species differentiation of *Scopulariopsis* fungi.

1. Introduction. 2. Taxonomic position. 3. Morphology. 4. Distribution. 5. Significance in human medicine. 5.1. Skin and nail mycoses. 5.2. Other forms of infections. 6. Diagnosis of infections. 7. Antifungal susceptibility. 8. Treatment. 9. Summary. 10. References

Słowa kluczowe: chorobotwórczość, identyfikacja, *Scopulariopsis*, *Scopulariopsis brevicaulis*, wrażliwość na leki

Key words: identification, pathogenicity, sensitivity to drugs, *Scopulariopsis*, *Scopulariopsis brevicaulis*

1. Wprowadzenie

W ostatnich latach obserwuje się wyraźny wzrost częstości zakażeń grzybami w populacji ludzkiej. Dotyczy to przede wszystkim grzybic oportunistycznych, tzn. wywoływanych przez grzyby, które współtworzą fizjologiczną mikrobiotę człowieka lub bytują w środowisku naturalnym jako saprotrofy, a które w pewnych warunkach (gł. depresji układu immunologicznego) nabierają cech patogennych i wywołują objawowe zakażenia. Przyczyn rosnącej liczby grzybic oportunistycznych należy szukać m.in. w powiększającej się grupie chorych z upośledzoną, w różnym stopniu, odpornością komórkową lub humoralną. To z kolei ma związek z coraz częściej notowanymi chorobami nowotworowymi, zakażeniami bakteryjnymi i wirusowymi, ale także coraz częstszym wykonywaniem inwazyjnych zabiegów medycznych, czy stosowaniem agresywnych metod terapii.

Patogeny oportunistyczne z rodzajów *Candida*, *Cryptococcus* i *Aspergillus* są najczęstszymi czynnikami etiologicznymi zakażeń grzybiczych u ludzi. Coraz częściej opisuje się jednak przypadki grzybic wywołane przez grzyby uważane jeszcze do niedawna za niepatogenne. Mikroorganizmy te określane są obecnie angielskim terminem „emerging pathogens”. Do grupy tej należą grzyby z rodzaju *Scopulariopsis*, którego charakterystyka jest tematem niniejszego artykułu.

2. Pozycja taksonomiczna

Grzyby z rodzaju *Scopulariopsis* należą do grzybów strzępkowych, wytwarzających strzępki przezjryste (hyaline moulds) lub ciemnopigmentowe (dematiaceous moulds). Tradycyjna systematyka zalicza rodzaj *Scopulariopsis* do rodziny *Microascaceae*, rzędu *Microascales*, podklasy *Hypocreomycetidae*, klasy *Sordario-*

* Autor korespondencyjny: Zakład Mikrobiologii Stosowanej, Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski; ul. I. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa; tel. 22 55 41 312; fax: 22 55 41 402; e-mail: t.jagielski@biol.uw.edu.pl

mycetes, podtypu *Pezizomycotina*, typu *Ascomycota* w królestwie *Fungi* [58].

Rodzaj *Scopulariopsis* liczy kilkadziesiąt gatunków¹. Jednym z pierwszych wykrytych gatunków był *Scopulariopsis brevicaulis* (Sacc.) Bainier (gatunek typowy dla rodzaju), opisany przez Saccardo w 1882 roku jako *Penicillium brevicaulis*. Nazwa *P. brevicaulis* Sacc. (1882), a także nazwy *Monilia penicillioides* Delacr. (1897), *P. brevicaulis* var. *hominis* Brumpt & Langeron (1910), *Acaulium insectivorum* Sopp (1912) są synonimami nazwy *S. brevicaulis* [58].

Nazwa rodzajowa *Scopulariopsis* określa postać grzyba rozmnażającą się bezpłciowo (postać anamorficzna) za pomocą jednokomórkowych zarodników (amerokonidia) wytwarzanych przez wyspecjalizowane komórki zwane annelidami. Dla niektórych gatunków, tj. *S. brevicaulis*, *S. candida*, *S. cinerea*, *S. paisii*², *S. soppii*, *S. trigonospora* opisano formy rozmnażające się płciowo (formy teleomorficzne), wytwarzające zarodniki workowe (askospory). Postacie te zaklasyfikowano do rodzaju *Microascus*, tj. kolejno: *Microascus brevicaulis*, *M. manginii*, *M. cinereus*, *M. cirrosus*, *M. soppii*, *M. trigonosporus* var. *trigonosporus* [58].

W dostępnej literaturze niewiele jest informacji dotyczących filogenetyki i ewolucji tych grzybów. Badaniem filogenetycznym grzybów z rodzaju *Scopulariopsis* poświęcono jak dotąd tylko jedno wnikliwe opracowanie. Issaka i n e n i w s p. [37] podjęli próbę ustalenia pokrewieństw genetycznych w obrębie rodzaju *Scopulariopsis* (9 gatunków *Scopulariopsis* i 14 gatunków *Microascus*), w oparciu o analizę sekwencji (350 pz) w obrębie dużej podjednostki rDNA. Wykazano wówczas, że większość patogennych gatunków (m.in. *S. asperula*, *S. flava*, *S. fusca*, *S. koningii*, *S. brevicaulis*) tworzy wspólną grupę (klad), arbitralnie nazwaną MmC (*Microascus manginii* Clade).

3. Morfologia

Kolonie *Scopulariopsis* w zależności od gatunku mogą mieć barwę białą, płową, brązową lub czarną. Są puszyste, aksamitne, nieco sznurowate. Nie wytwarzają synnemata. Konidiofory (struktury zarodnikotwórcze) są proste, krótkie, często rozgałęzione, jasne. Komórki zarodnikotwórcze (annelidy) mają kształt ampułkowaty

do cylindrycznego i wydłużają się z pierścieniowatymi strefami, na których wytwarzane są zarodniki. Mogą występować pojedynczo lub w skupiskach, na szczycie konidioforu, a także na niewyspecjalizowanych strzępkach. Zarodniki są kuliste, jajowate, maczugowate, w kształcie pocisku, ścięte u podstawy, gładkościenne, kropkowane lub brodawkowate, przezroczyste lub jasnobrażowe. Układają się w suche, bazypetalne łańcuchy [3, 21, 47].

Gatunek typowy – *S. brevicaulis*, będący równocześnie najczęstszą przyczyną zakażeń u ludzi, tworzy początkowo kolonie białawe, które szybko przybierają barwę orzechową, różowobrązową lub żółtawobrązową. W środku kolonii może powstawać kępka białych strzępek. Są puszyste lub filcowate (rys. 1A). Spód kolonii może być płowy, kremowy lub brązowawy (rys. 1B). Annelidy występują na szczycie odgałęzień konidioforu lub na niewyspecjalizowanych strzępkach, pojedynczo lub w skupiskach przypominających szczotkę. Są cylindryczne, z lekko nadętą podstawą. Zarodniki są półprzezroczyste, kuliste, owalne lub w kształcie pocisku. Mają ściętą podstawę i zwykle są szorstkościenne. Tworzą łańcuchy (rys. 2). U teleomorfy (*M. brevicaulis*) można zaobserwować owocniki workowe o typie perytecjum, które są kuliste, z krótką szyją, porowate, czarne. Wewnątrz owocników znajdują się okrągławe worki zawierające po 8 askospor. Zarodniki workowe są szerokie, nerkowate, gładkościenne, w skupiskach pomarańczowe [3, 21, 47]³.

4. Występowanie

Grzyby należące do rodzaju *Scopulariopsis* izolowano m.in. z gleby [64, 83], powietrza (zarówno wewnątrz budynków jak i na zewnątrz) [1, 53], wody [4], a także z różnych produktów spożywczych, jak ziarno [68] czy orzechy [25]. Grzyby *Scopulariopsis* kolonizują również zwierzęta i ludzi, zwłaszcza tkanki zawierające keratynę – pióra, rogi, kopyta, skórę, paznokcie, włosy [7, 45, 52].

Gatunki *Scopulariopsis* występują kosmopolitycznie. Izolowano je m. in. w różnych krajach europejskich, w Afryce, Azji, Ameryce Południowej [7, 25, 60, 65].

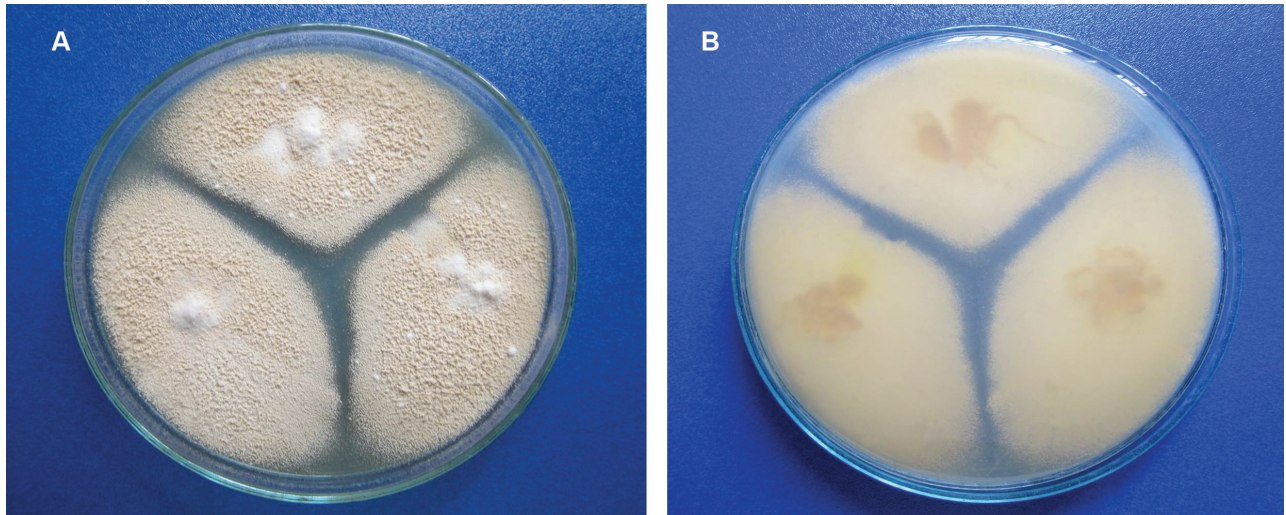
5. Znaczenie w medycynie człowieka

Do niedawna grzyby z rodzaju *Scopulariopsis* traktowano jedynie jako potencjalny czynnik etiologiczny dermato- i onychomykoz. Obecnie grzyb ten zaliczany

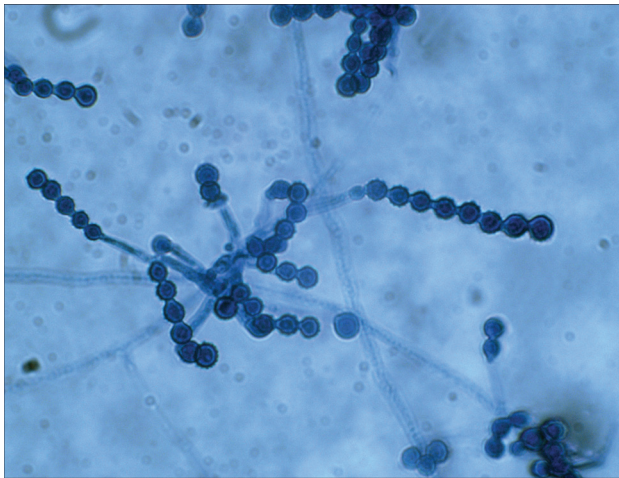
¹ Różne źródła podają różną liczbę gatunków opisanych w rodzaju *Scopulariopsis*. W bazie Mycobank [58] nazwie *Scopulariopsis* przypisano 93 powiązane rekordy, którym odpowiadają 93 różne nazwy gatunkowe, z czego część oznaczonych jest jako nieważna. S a n d o v a l - D e n i s i w s p. [70] przywołują natomiast liczbę około 40 zatwierdzonych gatunków.

² Według bazy Mycobank [58] obecna nazwa to *Torula paisii* (teleomorfa: *Microascus cirrosus*), ale nazwa *S. paisii* jest dla niej synonimem.

³ Morfologia poszczególnych gatunków *Scopulariopsis*, zwłaszcza wygląd makroskopowy kolonii, zależy w dużej mierze od zastosowanego podłoża hodowlanego.



Rys. 1. Kolonie *Scopulariopsis brevicaulis* na podłożu CYA (Czapek Yeast Agar) widziane od góry (A) i spodu (B).
Fot. Magdalena Skóra



Rys. 2. Konidiofory *Scopulariopsis brevicaulis* z szorstkościenneymi, ściętymi u podstawy zarodnikami. Fot. Magdalena Skóra

jest do tzw. „*emerging pathogens*” – nowo wyłaniających się patogenów, zdolnych do wywołania także poważnych zakażeń podskórnych i głębokich.

Grzyby *Scopulariopsis* są organizmami oportunistycznymi, powodującymi zakażenia przede wszystkim u osób, u których wystąpi czynnik sprzyjający określonej postaci grzybicy. Większość gatunków *Scopulariopsis* zaliczana jest do I. klasy bezpieczeństwa pracy z mikroorganizmami (BSL-1), niektóre natomiast, w tym *S. brevicaulis*, do klasy II. (BSL-2) [21].

Opisano przypadki zakażeń wywołane przez *S. acremonium*, *S. americana*, *S. brevicaulis*, *S. brumptii*, *S. candida*, *S. flava*, *S. fusca*, *S. hominis*, a także przez teleomorfy gatunków *S. cinerea*, *S. paisii* i *S. trigonospora* czyli *M. cinereus*, *M. cirrosus* i *M. trigonosporus* [36, 59, 70]. Gatunkiem *Scopulariopsis* najczęściej identyfikowanym jako przyczyna zakażeń u ludzi jest *S. brevicaulis*. Grzybice wywołane przez inne gatunki *Scopulariopsis*

są opisywane są kazuistycznie. W jednej z nielicznych prac dotyczących epidemiologii zakażeń *Scopulariopsis*, autorstwa Issaka i in. [36], poświęconej występowaniu *Scopulariopsis* i *Scedosporium* w próbkach paznokci i skóry, autorzy na podstawie danych uzyskanych z dwóch wiodących fińskich laboratoriów wykazali, że za 80% przypadków zakażeń *Scopulariopsis* odpowiedzialny był gatunek *S. brevicaulis*, za 10% *S. candida*, a za 5% *S. fusca*. Pozostałe 5% przypadków zakażeń spowodowane było m. in. przez *S. acremonium*, *S. brumptii* i teleomorfy z rodzaju *Microascus*.

5.1. Grzybice skóry i paznokci

Zakażenia wywołane przez przedstawicieli *Scopulariopsis* zazwyczaj dotyczą tkanek bogatych w kreatynę. Grzybice skórne mają różną lokalizację (m.in. kończyny górne i dolne, tułów [36]), ale występują sporadycznie, natomiast onychomykozy o etiologii *Scopulariopsis* są jednymi z najczęstszych postaci pleśni paznokci [8, 10, 27, 56, 57]. Grzyby *Scopulariopsis* odpowiadają za około 1–5% wszystkich grzybic paznokci [36] i około 1–10% onychomykoz wywołanych przez grzyby pleśniowe [48]. Opisuje się zarówno dalszą i boczną onychomykozę podpaznokciową (DLSO – distal and lateral subungual onychomycosis), jak i bliższą onychomykozę podpaznokciową (PSO – proximal subungual onychomycosis) [36, 48, 82]. Zmiany chorobowe zwykle dotyczą paznokci stóp i najczęściej ograniczone są jedynie do paznokcia palucha. Zakażenia paznokci rąk opisywane są bardzo rzadko [36, 57].

Zakażenia skóry i paznokci grzybami z rodzaju *Scopulariopsis* mogą dotyczyć zarówno osób w immunosupresji, jak i immunokompetentnych. Immunosupresja jest wymieniana jako czynnik predysponujący do grzybicy paznokci spowodowanej przez *Scopulariopsis* [36,

56], ale brak badań które wskazywałyby, że zakażenia te rzeczywiście częściej występują u osób z upośledzoną odpornością niż u pacjentów ze sprawnym systemem immunologicznym. Czynniki sprzyjającymi zakażeniom powierzchniowym *Scopulariopsis* są także: uszkodzenie płytki paznokciowej i skóry, inne schorzenia dermatologiczne (np. łuszczyca), a także choroby ogólnoustrojowe jak cukrzyca [36, 56]. Ponadto grzybice paznokci o etiologii *Scopulariopsis* występują częściej u osób w wieku średnim i podeszłym, a także u osób z zaburzeniami krążenia, zwłaszcza w kończynach dolnych [80].

5.2. Inne postacie zakażeń

Grzyby z rodzaju *Scopulariopsis*, kiedyś uważane jedynie za nieszkodliwe saprotrofy lub czynniki etiologiczne wyłącznie grzybic paznokci, dzisiaj mogą stanowić realne zagrożenie dla zdrowia i życia człowieka. W literaturze medycznej można znaleźć opisy przypadków zakażeń *Scopulariopsis* dotyczące m.in. następujących lokalizacji: rogówki [51], wnętrza gałki ocznej [5], siatkówki i naczyńki [79], ucha [9], zatok [28], jamy szczękowej [67], przegrody nosowej [39], mózgu [33], płuc [72], oskrzeli [89], wsierdza [42], a także grzybic rozsianych [85].

Grzybice tkanek nieskeratynizowanych spowodowane przez *Scopulariopsis* spp. występują zazwyczaj u osób z istotnym czynnikiem predysponującym do tego typu zakażeń, czyli głównie z zaburzeniami immunologicznymi lub po inwazyjnych zabiegach leczniczych. Odnotowywano je m.in. u pacjentów z białaczkami [89], chłoniakami [46], chorych na AIDS [73], po transplantacjach [87], chemioterapii [28], wszczepieniu sztucznych zastawek serca [42], a także u osób z cukrzycą [38].

6. Diagnostyka zakażeń

W klasycznej diagnostyce mykologicznej, opartej na analizie cech fenotypowych, identyfikacja grzybów *Scopulariopsis* opiera się przede wszystkim na ocenie wyglądu kolonii wyrosłych na określonych podłożach hodowlanych oraz szczegółów morfologicznych konidioforów, komórek zarodnikotwórczych i zarodników, obserwowanych w obrazie mikroskopowym. Klucze do oznaczania ważniejszych gatunków *Scopulariopsis* na podstawie ich morfologii dostępne są w atlasach grzybów o znaczeniu klinicznym [3, 21, 47]. Należy mieć jednak na uwadze, że metody te, z powodu podobieństwa morfologii różnych grzybów, mogą dawać niejednoznaczne wyniki. Co więcej, wymagają pozyskania kultury drobnoustroju i przez to są wydłużone o czas trwania hodowli (od kilku dni do nawet kilku tygo-

dni). Dlatego coraz częściej zwraca się ku metodom molekularnym, które pozwalają na znaczne skrócenie procedury diagnostycznej i umożliwiają wiarygodną identyfikację czynnika zakaźnego już na wczesnym etapie choroby.

Metody molekularne stosowane w diagnostyce i epidemiologii zakażeń grzybiczych oparte są, w ogromnej większości, na analizie polimorfizmu wybranych markerów genetycznych, tj. unikalnych sekwencji DNA, specyficznych dla rodziny, rodzaju, gatunku, a nawet szczepu. Regionami skupiającymi najczęściej sekwencji wykorzystywanych w funkcji markerów genetycznych w diagnostyce i taksonomii grzybów, w tym także grzybów pleśniowych, są operony rDNA. Zlokalizowane są tu geny kodujące elementy strukturalne (rRNA) małej (SSU – small subunit) i dużej (LSU – large subunit) podjednostki rybosomu oraz rozdzielające je tzw. wewnętrzne sekwencje niekodujące (ITS – internal transcribed spacer) (rys. 3). Największe znaczenie dla diagnostyki molekularnej grzybic mają regiony ITS, gdyż charakteryzują się dużą zmiennością międzygatunkową. W identyfikacji gatunkowej oceniana jest też nierzadko wariantywność regionu bliższego końcowi 5' genu kodującego rRNA (28S) dużej podjednostki, w którym zawierają się trzy zmienne domeny (D1, D2, D3).



Rys. 3. Schemat organizacji operonu rDNA

Większość metod molekularnych stosowanych w diagnostyce grzybów chorobotwórczych, opartych o analizę operonu rDNA, łączy użycie łańcuchowej reakcji polimeryzacji (PCR). Technika PCR umożliwia, przy odpowiednio zaprojektowanych starterach, amplifikację dowolnych sekwencji DNA, specyficznych dla określonych taksonów grzybów. Poszczególne metody diagnostyki molekularnej różnią się przede wszystkim sposobem analizy otrzymanego produktu PCR. Polega ona zwykle na ustaleniu jego wzorów restrykcyjnych (technika PCR-RFLP – restriction fragment length polymorphism), hybrydyzacji ze specyficznymi sondami i ostatnio, coraz częściej, oznaczeniu jego sekwencji nukleotydowej (PCR-sequencing). Metody te, w różny sposób modyfikowane, są z powodzeniem stosowane, nierzadko w formie komercyjnych zestawów diagnostycznych, do wykrywania i identyfikacji drożdży i grzybów drożdżopodobnych [50, 66, 71, 23], grzybów dimorficznych [49], dermatofitów [40, 88] oraz niektórych grzybów pleśniowych, głównie z rodzajów *Aspergillus* i *Penicillium* [14, 22, 32, 35]. Co więcej, znane są metody pozwalające na równoległą detekcję grzybów reprezentujących niekiedy bardzo odległe grupy taksonomiczne. Przy tym oznaczenie do gatunku możliwe

jest dzięki analizie sekwencyjnej lub zastosowaniu technologii mikromacierzy DNA [6, 76, 86]. Ogromną zaletą wielu spośród przywołanych wyżej metod jest możliwość ich stosowania bezpośrednio w materiale klinicznym, co w istotny sposób skraca czas trwania postępowania diagnostycznego [6, 23, 76, 86, 88].

W literaturze przedmiotu, dane dotyczące diagnostyki molekularnej grzybów z rodzaju *Scopulariopsis* są niezwykle skąpe. Jednocześnie brak jakichkolwiek informacji na temat technik genetycznych umożliwiających różnicowanie poszczególnych gatunków w obrębie rodzaju, a tym bardziej różnicowanie wewnątrzgatunkowe (na poziomie szczepów). Wśród nielicznych prac z zakresu molekularnej diagnostyki różnicowej zakażeń grzybiczych, w których wymieniane są grzyby z rodzaju *Scopulariopsis*, jedną z najwcześniejszych jest opracowanie S a n d h u i wsp. [69], gdzie przy użyciu uniwersalnych starterów wykrywano zmienny region genu 28S rDNA w genomie różnych gatunków grzybów chorobotwórczych. Analiza sekwencyjna amplifikowanego regionu była podstawą różnicowania gatunkowego. W ten sposób oznaczono pojedyncze szczepy reprezentujące dwa gatunki *Scopulariopsis*, tj. *S. brevicaulis* i *S. brumptii*. Nie udało się natomiast zaprojektować sond DNA specyficznych dla obu gatunków. Konstrukcję sondy specyficznej dla *S. brevicaulis* podali H s i a o i wsp. [35], choć jej użyteczność oceniano w oparciu jedynie o 4 szczepy referencyjne *S. brevicaulis*. W innej pracy, H a l l i wsp. [32] weryfikowali oznaczenie metodą konwencjonalną wybranych grzybów chorobotwórczych, reprezentujących różne rodzaje, przy pomocy komercyjnego zestawu MicroSeq D2 LSU rDNA (Applied Biosystems), którego zasada opiera się na analizie sekwencyjnej domeny D2 w obrębie genu 28S rDNA, a następnie porównaniu wyników z bazą danych zdeponowanych w bibliotece MicroSeq D2. Dla 4 spośród 5 badanych szczepów *Scopulariopsis* sp., wynik identyfikacji obu metodami był zbieżny (*S. koningii*). Jeden szczep wcześniej oznaczony jako *S. brumptii* został metodą genetyczną sklasyfikowany jako *Penicillium rubrum* [32]. W 2006 roku K a r d j e v a i wsp. [44] przy użyciu odpowiednio zaprojektowanych starterów, zaproponowali protokół PCR wykrywający fragment (336 pz) genu kodującego 28S rRNA, specyficzny dla rodzaju *Scopulariopsis*. W istocie, specyficzność PCR była szersza, obejmując większość grzybów sytuujących się w klasie *Sordariomycetes*. Wszystkie (13) badane szczepy *Scopulariopsis* sp. dały pozytywny wynik PCR. Ponadto, reakcja była dodatnia dla 6 próbek klinicznych (dla 4 z nich hodowla na obecność *Scopulariopsis* sp. była ujemna). Jednak użyta metoda nie pozwalała na różnicowanie gatunkowe. Identyczną sekwencję amplifikowanego fragmentu, jak tę otrzymaną we wszystkich 19 reakcjach, wykrywa się w 3 różnych gatunkach *Scopulario-*

opsis: *S. brevicaulis*, *S. koningii* i *M. manginii* (anamorfa: *S. candida*). Ponownie fragmentu genu kodującego LSU rRNA jako markera molekularnego w PCR dla wykrywania grzybów powiązanych etiologicznie z grzybicami paznokci (i to bezpośrednio w materiale klinicznym) użyli M o n o d i wsp. [55], a następnie B o n t e m s i wsp. [11]. Zaproponowany algorytm identyfikacji zakładał amplifikację fragmentu genu 28S rDNA przy pomocy 3 par starterów, specyficznych dla grzybów z rodzajów *Candida* (I), *Fusarium* (II), a także dermatofitów i grzybów strzępkowych nie należących do dermatofitów, włączając grzyby z rodzajów *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Acremonium*, *Mucor* oraz *Scopulariopsis* (III), a następnie analizę restrykcyjną otrzymanego amplikonu przy użyciu 2 enzymów restrykcyjnych, tj. *RsaI* i *Hinfl*. Jednak wyniki uzyskane tą metodą (PCR-RFLP) nie zawsze pokrywały się z wynikami identyfikacji metodą konwencjonalną (hodowla). Czyli na przykład, spośród 17 szczepów oznaczonych jako *Scopulariopsis* sp. w hodowli, 12 (71%) zostało podobnie oznaczonych metodą PCR-RFLP [24]. W takich rozbieżnych przypadkach, rozstrzygające były wyniki analizy sekwencyjnej. Nowy protokół PCR (tzw. nested PCR) pozwalający wykrywać w materiale pobranym od pacjentów sekwencję (168 pz) specyficzną dla *S. brevicaulis* opisali E b i h a r a i wsp. [24]. Jednak stosując tę metodę zidentyfikowano tylko jeden szczep *S. brevicaulis*, co oznacza, że dla oceny jej skuteczności potrzeba znacznie większej liczby próbek klinicznych, względnie kultur tego grzyba z próbek klinicznych [24]. Technike „nested PCR”, której molekularnym celem były regiony ITS, wykorzystano do identyfikacji grzybów, w tym szczepów *S. brevicaulis*, w próbkach pochodzących z naturalnych cieków wodnych [63].

Stosunkowo niedawno opisano nową technikę umożliwiającą różnicowanie najważniejszych grzybów odpowiedzialnych za zakażenia paznokci, włączając grzyby z rodzaju *Scopulariopsis*. Technika ta, zwana analizą polimorfizmu długości terminalnych fragmentów restrykcyjnych (T-RFLP) polega na amplifikacji LSU rDNA przez PCR, restrykcji otrzymanych amplikonów przy pomocy odpowiednio dobranych enzymów restrykcyjnych, a następnie detekcji wyznakowanych (dzięki wyznakowaniu jednego ze starterów barwnikiem fluorescencyjnym) terminalnych fragmentów restrykcyjnych. Charakterystyczny wzór prążków (fingerprint) oraz intensywność ich świecenia pozwala zdefiniować czynnik etiologiczny. Metoda ta ma szczególne znaczenie w identyfikacji zakażeń heterogennych (mieszanych) [84].

Jak widać z powyższego przeglądu, tylko analiza sekwencyjna regionów z operonu rDNA, umożliwiała, choć w ograniczonym stopniu, identyfikację grzybów *Scopulariopsis*. Technika „PCR sequencing” uważana jest za najbardziej wiarygodną metodę diagnostyczną.

Niemniej posiada swoje ograniczenia; wynik identyfikacji zależy tutaj od obranego markera genetycznego (stopnia jego polimorfizmu, stabilności genetycznej) oraz dostępności i zasobności baz danych, w których zdeponowane sekwencje służą jako materiał porównawczy dla sekwencji ustalanych w badaniu własnym. W przypadku *Scopulariopsis* spp., analizy sekwencyjne koncentrowały się niemal wyłącznie na różnych regionach operonu rDNA. Jednak jak wskazują wyniki przytoczonych prac, analiza sekwencji rDNA nie pozwala na różnicowanie międzygatunkowe. Potwierdzają to badania przeprowadzone przez Jagielskiego i wsp. [41, dane niepublikowane], oparte o analizę sekwencyjną regionów ITS (1 i 2) dla 78 szczepów reprezentujących 30 różnych gatunków *Scopulariopsis* i *Microascus*. Pewne rozwiązanie może stanowić połączona analiza sekwencyjna dla dwóch lub więcej genetycznych loci. Rozważane są tu przede wszystkim tzw. geny metabolizmu podstawowego (house-keeping genes), które, z różnym powodzeniem, stosowane były jako markery genetyczne w identyfikacji grzybów, w ich różnych rangach taksonomicznych; są to geny *EF1 α* , *TUB*, *CHS-1*, *RPB1* i *RPB2*, kodujące, odpowiednio, czynnik elongacji translacji 1 α , β -tubulinę, syntazę chitynową 1, oraz podjednostki (1 i 2) polimerazy RNA II [54]. Badania nad zastosowaniem kombinowanej analizy sekwencyjnej genów metabolizmu podstawowego dla opracowania nowego algorytmu identyfikacji gatunkowej grzybów *Scopulariopsis* prowadzi zespół dr. T. Jagielskiego z Uniwersytetu Warszawskiego.

W ostatnim czasie coraz większą popularność w diagnostyce mikrobiologicznej, w tym także mykologicznej, zyskują techniki oparte na spektrometrii mas. Podstawową zasadą jest tutaj wytworzenie, rozdział i detekcja zjonizowanych składników chemicznych komórki (biomolekuł, gł. białek), w funkcji stosunku ich masy do ładunku. Taką nową techniką analityczną wykorzystującą spektrometrię mas jest technika MALDI-TOF MS (matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry) umożliwiająca szybką i precyzyjną analizę profilów białkowych różnych drobnoustrojów. Identyfikacja metodą MALDI-TOF polega na porównaniu widma masowego białek szczepu badanego z widmami wzorcowymi drobnoustrojów, zdeponowanymi w bazie danych. Optymalizację parametrów techniki MALDI-TOF dla celów rutynowej identyfikacji grzybów podjęli Normand i wsp. [61]. W opracowanych przez nich bibliotekach widm białkowych szczepów referencyjnych znalazły się także widma 3 szczepów *S. brevicaulis*. Obecnie, badania nad ustaleniem profilów białkowych, metodą MALDI-TOF MS, dla różnych gatunków *Scopulariopsis* prowadzi, we współpracy z Wolnym Uniwersytem Berlina, zespół dr. T. Jagielskiego.

Rozpoznawanie powierzchniowych zakażeń wywołanych przez grzyby należące do rodzaju *Scopulariopsis*

dokonywane jest na podstawie wstępnego rozpoznania klinicznego grzybicy, potwierdzonego następnie w badaniu mikrobiologicznym, obejmującym tradycyjne metody mikroskopowe i hodowlane, a także techniki molekularne. Należy pamiętać, że jednokrotne stwierdzenie *Scopulariopsis* spp. w próbkach pobranych ze zmienionej chorobowo skóry lub paznokci nie jest równoznaczne z zakażeniem, ponieważ grzyb ten może kolonizować skórę i paznokcie nie wywołując zmian chorobowych lub może być zanieczyszczeniem materiału klinicznego lub hodowli. W przypadku stwierdzenia w materiałach klinicznych obok *Scopulariopsis* innych grzybów, uchodzących za niekwestionowane czynniki etiologiczne grzybic powierzchniowych, tj. dermatofitów i grzybów z rodzaju *Candida*, pleśń ta traktowana jest zazwyczaj jako wtórny saprotrof [36].

Inwazyjne zakażenia wywołane przez grzyby *Scopulariopsis*, podobnie jak inne inwazyjne grzybice, nie dają charakterystycznych objawów klinicznych, w związku z czym do potwierdzenia zakażenia niezbędne jest wykonanie badań laboratoryjnych. W badaniach wykorzystuje się zarówno metody mikroskopowe i hodowlane, metody immunologiczne (w celu wykluczenia zakażenia przez inny niż *Scopulariopsis* patogen, dla którego dostępny jest test komercyjny, np. *Candida*, *Aspergillus*), badania histopatologiczne, a także metody biologii molekularnej.

6. Wrażliwość na leki przeciwgrzybicze

Dotychczas niewiele uwagi poświęcono wrażliwości grzybów *Scopulariopsis* na antymykozytyki. Zdecydowana większość dostępnych w literaturze medycznej informacji dotyczy gatunku *S. brevicaulis*, który, jak wskazują przeprowadzone badania, jest odporny *in vitro* na amfoterycynę B, 5-fluorocytozynę, flukonazol, itrakonazol, ketokonazol, worykonazol, gdyż większość szczepów wykazuje wysokie wartości MIC (minimal inhibitory concentration) dla tych leków [2, 13, 16–19, 78]. Najlepsze działanie przeciwgrzybicze w stosunku do *S. brevicaulis* wykazują amorolfina, cyklopiroks i terbinafina; wartości MIC dla tych leków wynosiły odpowiednio 0,01–0,5 mg/L [15, 43, 77], 0,125–10 mg/L [29, 43, 62, 77] i 0,01–> 16 mg/L [12, 16, 17, 26]. Informacje te potwierdzają badania przeprowadzone przez Skórę i Macurę [75] oraz Skórę i wsp. [74].

7. Leczenie

W terapii grzybic paznokci najczęściej stosuje się ogólnie terbinafinę i itrakonazol [20, 30, 31, 34, 81], a także miejscowo natamycynę [81]. Przypadki zakażeń inwazyjnych najczęściej leczone są amfoterycyną B,

a także kaspofunginą, itraconazolem i worykonazolem, w połączeniu z chirurgicznym oczyszczeniem zmienionej chorobowo tkanki.

Leczenie zakażeń spowodowanych przez grzyby *Scopulariopsis* może być mało skuteczne z powodu niskiej wrażliwości *in vitro* tych grzybów na większość dostępnych antymykotyków. Grzybice inwazyjne, pomimo wdrażania niejednokrotnie różnych opcji terapeutycznych często kończą się zgonem.

Dotychczas nie opracowano optymalnych algorytmów leczenia zakażeń wywołanych przez grzyby należące do rodzaju *Scopulariopsis*. Europejskie Towarzystwo Mikrobiologii Klinicznej i Chorób Zakaźnych (European Society for Clinical Microbiology and Infectious Diseases, ESCMID) i Europejska Konfederacja Mykologii Medycznej (European Confederation of Medical Mycology, ECMMM) w wytycznych dotyczących leczenia hialohyfonykoz [81], w przypadku zakażeń wywołanych przez *Scopulariopsis* spp. wymieniają jedynie terapię itraconazolem (siła zalecenia C – w niewielkim stopniu), terapię liposomalną postacią amfoterycyny B (siła zalecenia C – w niewielkim stopniu), a także zastosowanie każdego leku przeciwgrzybiczego w połączeniu z opracowaniem chirurgicznym (siła zalecenia A – zdecydowanie).

8. Podsumowanie

Grzyby z rodzaju *Scopulariopsis* są mało poznаныmi mikroorganizmami. Najwięcej uwagi poświęca się im w odniesieniu do grzybic paznokci. Zagadnienia dotyczące determinantów patogenności tych grzybów, mechanizmów lekooporności, czy w końcu diagnostyki zakażeń, w tym różnicowania między- i wewnątrzgatunkowego, poruszane są sporadycznie. Należy jednak pamiętać, że postęp nauk medycznych, który przyniósł nowe możliwości leczenia różnych chorób, przyczynił się także do wzrostu zapadalności na grzybice. Ponadto zmienił spektrum gatunków odpowiedzialnych za te zakażenia. Obecnie, obok wiodących patogenów grzybiczych z rodzajów *Candida*, *Cryptococcus* i *Aspergillus*, przyczyną zakażeń mogą być grzyby o potencjalnie niskiej patogenności, uchodzące powszechnie za saprotrofy. Grzyby z rodzaju *Scopulariopsis* idealnie wpisują się w ten obraz. Wzrastająca liczba odnotowywanych przypadków inwazyjnych zakażeń wywołanych przez *Scopulariopsis* spp. i związane z nimi trudności terapeutyczne pokazują, że grzybów tych nie wolno lekceważyć. Przeciwnie, należy je lepiej poznać, aby skuteczniej diagnozować, leczyć i zapobiegać wywoływanych przez nie zakażeniom.

Artykuł powstał w ramach projektu badawczego «Juventus Plus» realizowanego ze środków przyznanych przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego (Nr: IP12013 023672).

Piśmiennictwo

1. Abdel Hameed A.A., Yasser I.H., Khoder I. M.: Indoor air quality during renovation actions: a case study. *J. Environ. Monit.* **6**, 740–744 (2004)
2. Aguilar C., Pujol I., Guarro J.: In vitro antifungal susceptibilities of *Scopulariopsis* isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**, 1520–1522 (1999)
3. Andreoni S., Farina C., Lombardi G.: Medical mycology atlas. Systems, Paderno Dugnano, 2004
4. Asan A., Kirgiz T., Sen B., Camur-Elipek B., Guner U., Guher H.: Isolation, identification and seasonal distribution of airborne and waterborne fungi in Terkos Lake (Istanbul-Turkey). *J. Basic Microbiol.* **43**, 83–95 (2003)
5. Aydin S., Ertugrul B., Gultekin B., Uyar G., Kir E.: Treatment of two postoperative endophthalmitis cases due to *Aspergillus flavus* and *Scopulariopsis* spp. with local and systemic antifungal therapy. *BMC Infect. Dis.* **7**, 87 (2007)
6. Babady N.E., Miranda E., Gilhuley K.A.: Evaluation of LumineX xTAG fungal analyte-specific reagents for rapid identification of clinically relevant fungi. *J. Clin. Microbiol.* **49**, 3777–3782 (2011)
7. Bagy M.M., Abdel-Mallek A.Y.: Saprophytic and keratinolytic fungi associated with animals hair from Riyadh, Saudi Arabia. *Zentralbl. Mikrobiol.* **146**, 305–310 (1991)
8. Bassiri-Jahromi S., Khaksar A. A.: Nondermatophytic moulds as a causative agent of onychomycosis in Tehran. *Indian J. Dermatol.* **55**, 140–143 (2010)
9. Besbes M., Makni F., Cheikh-Rouhou F., Sellami H., Kharrat K., Ayadi A.: Ootomycosis due to *Scopulariopsis brevicaulis*. *Rev. Laryngol. Otol. Rhinol. (Bord.)* **123**, 77–78 (2002)
10. Bonifaz A., Cruz-Aguilar P., Ponce R.M.: Onychomycosis by molds. Report of 78 cases. *Eur. J. Dermatol.* **17**, 70–72 (2007)
11. Bontems O., Hauser P. M., Monod M.: Evaluation of a polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism assay for dermatophyte and nondermatophyte identification in onychomycosis. *Br. J. Dermatol.* **161**, 791–796 (2009)
12. Carrillo-Muñoz A. J., Giusiano G., Cárdenes D., Hernández-Molina J.M., Eraso E., Quindós G., Guardia C., del Valle O., Tur-Tur C., Guarro J.: Terbinafine susceptibility patterns for onychomycosis-causative dermatophytes and *Scopulariopsis brevicaulis*. *Int. J. Antimicrob. Agents* **31**, 540–543 (2008)
13. Carrillo-Muñoz A. J., Giusiano G., Guarro J., Quindós G., Guardia C., del Valle O., Rodríguez V., Estivil D., Cárdenes C.D.: In vitro activity of voriconazole against dermatophytes, *Scopulariopsis brevicaulis* and other opportunistic fungi as agents of onychomycosis. *Int. J. Antimicrob. Agents*, **30**, 157–161 (2007)
14. Chen Y., Prior B.A., Shi G., Wang Z.: A rapid PCR-based approach for molecular identification of filamentous fungi. *J. Microbiol.* **49**, 675–679 (2011)
15. Clayton Y.M.: Relevance of broad-spectrum and fungicidal activity of antifungals in the treatment of dermatomycoses. *Br. J. Dermatol.* **130**, 7–8 (1994)
16. Cuenca-Estrella M., Gomez-Lopez A., Buitrago M.J., Mellado E., Garcia-Effron G., Rodriguez-Tudela J.L.: In vitro activities of 10 combinations of antifungal agents against the multiresistant pathogen *Scopulariopsis brevicaulis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**, 2248–2250 (2006)
17. Cuenca-Estrella M., Gomez-Lopez A., Mellado E., Buitrago M.J., Monzón A., Rodriguez-Tudela J.L.: *Scopulariopsis brevicaulis*, a fungal pathogen resistant to broad-spectrum antifungal agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**, 2339–2341 (2003)
18. Cuenca-Estrella M., Gomez-Lopez A., Mellado E., Buitrago M.J., Monzón A., Rodriguez-Tudela J. L.: Head-to-head comparison of the activities of currently available antifungal agents against

- 3,378 Spanish clinical isolates of yeasts and filamentous fungi. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**, 917–921 (2006)
19. Cuenca-Estrella M., Gomez-Lopez A., Mellado E., Garcia-Effron G., Monzon A., Rodriguez-Tudela J.L.: *In vitro* activity of ravuconazole against 923 clinical isolates of nondermatophyte filamentous fungi. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**, 5136–5138 (2005)
 20. de Doncker P.R., Scher R.K., Baran R.L., Decroix J., Degreef H.J., Roseeuw D.I., Havu V., Rosen T., Gupta A.K., Piérard G.E.: Itraconazole therapy is effective for pedal onychomycosis caused by some nondermatophyte molds and in mixed infection with dermatophytes and molds: a multicenter study with 36 patients. *J. Am. Acad. Dermatol.* **36**, 173–177 (1997)
 21. de Hoog G.S., Guarro J., Gené J., Figueras M.J.: Atlas of clinical fungi. Centralbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands, 2000
 22. Dean T.R., Kohan M., Betancourt D., Menetrez M.Y.: A simple polymerase chain reaction/restriction fragment length polymorphism assay capable of identifying medically relevant filamentous fungi. *Mol. Biotechnol.* **31**, 21–28 (2005)
 23. Dunyach C., Bertout S., Phelipeau C., Drakulovski P., Reynes J., Mallié M.: Detection and identification of *Candida* spp. in human serum by LightCycler real-time polymerase chain reaction. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **60**, 263–271 (2008)
 24. Ebihara M., Makimura K., Sato K., Abe S., Tsuboi R.: Molecular detection of dermatophytes and nondermatophytes in onychomycosis by nested polymerase chain reaction based on 28S ribosomal RNA gene sequences. *Br. J. Dermatol.* **161**, 1038–1044 (2009)
 25. Freire F.C., Kozakiewicz Z., Paterson R.R.: Mycoflora and mycotoxins in Brazilian black pepper, white pepper and Brazil nuts. *Mycopathologia*, **149**, 13–19 (2000)
 26. Garcia-Effron G., Gomez-Lopez A., Mellado E., Monzon A., Rodriguez-Tudela J.L., Cuenca-Estrella M.: *In vitro* activity of terbinafine against medically important nondermatophyte species of filamentous fungi. *J. Antimicrob. Chemother.* **53**, 1086–1089 (2004)
 27. García-Martos P., Domínguez I., Marín P., Linares M., Mira J., Calap J.: Onychomycoses caused by non-dermatophytic filamentous fungi in Cádiz. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* **18**, 319–324 (2000)
 28. Gluck O., Segal N., Yariv F., Polacheck I., Puterman M., Greenberg D., Daniel B.: Pediatric invasive sinonasal *Scopulariopsis brevicaulis* – a case report and literature review. *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.* **75**, 891–893 (2011)
 29. Gupta A.K., Kohli Y.: *In vitro* susceptibility testing of ciclopirox, terbinafine, ketoconazole and itraconazole against dermatophytes and nondermatophytes, and *in vitro* evaluation of combination antifungal activity. *Br. J. Dermatol.* **149**, 296–305 (2003)
 30. Gupta A.K., Gregurek-Novak T., Konnikov N., Lynde C.W., Hofstader S., Summerbell R.C.: Itraconazole and terbinafine treatment of some nondermatophyte molds causing onychomycosis of the toes and a review of the literature. *J. Cutan. Med. Surg.* **5**, 206–210 (2001)
 31. Gupta A.K., Gregurek-Novak T.: Efficacy of itraconazole, terbinafine, fluconazole, griseofulvin and ketoconazole in the treatment of *Scopulariopsis brevicaulis* causing onychomycosis of the toes. *Dermatology*, **202**, 235–238 (2001)
 32. Hall L., Wohlfiel S., Roberts G.D.: Experience with the MicroSeq D2 large-subunit ribosomal DNA sequencing kit for identification of filamentous fungi encountered in the clinical laboratory. *J. Clin. Microbiol.* **42**, 622–626 (2004)
 33. Hart A.P., Sutton D.A., McFeeley P.J., Kornfeld M.: Cerebral phaeohyphomycosis caused by a dematiaceous scopulariopsis species. *Clin. Neuropathol.* **20**, 224–228 (2001)
 34. Hasse-Cieślińska M.: Diagnostyka i leczenie powierzchownych zakażeń grzybiczych. *Przew. Lek.* **7**, 109–120 (2006)
 35. Hsiao C.R., Huang L., Bouchara J.P., Barton R., Li H.C., Chang T.C.: Identification of medically important molds by an oligonucleotide array. *J. Clin. Microbiol.* **43**, 3760–3768 (2005)
 36. Issakainen J., Heikkilä H., Vainio E., Koukila-Kähkölä P., Castren M., Liimatainen O., Ojanen T., Koskela M., Meurman O.: Occurrence of *Scopulariopsis* and *Scedosporium* in nails and keratinous skin. A 5-year retrospective multi-center study. *Med. Mycol.* **45**, 201–209 (2007)
 37. Issakainen J., Jalava J., Hyvönen J., Sahlberg N., Pirnes T., Campbell C. K.: Relationships of *Scopulariopsis* based on LSU rDNA sequences. *Med. Mycol.* **41**, 31–42 (2003)
 38. Issakainen J., Meurman O. i wsp.: Deep, respiratory tract and ear infections caused by *Pseudallescheria (Scedosporium)* and *Microascus (Scopulariopsis)* in Finland. A 10-year retrospective multi-center study. *Med. Mycol.* **48**, 458–465 (2010)
 39. Jabor M.A., Greer D.L., Amedee R.G.: *Scopulariopsis*: an invasive nasal infection. *Am. J. Rhinol.* **12**, 367–371 (1998)
 40. Jackson C.J., Barton R.C., Evans E.G.: Species identification and strain differentiation of dermatophyte fungi by analysis of ribosomal-DNA intergenic spacer regions. *J. Clin. Microbiol.* **37**, 931–936 (1999)
 41. Jagielski T., Kosim K., Skóra M., Macura A.B., Bielecki J.: Identification of *Scopulariopsis* species by partial 28S rRNA gene sequence analysis. *Pol. J. Microbiol.* **62**, 303–306 (2013)
 42. Jain D., Oberoi J.K., Shahi S.K., Shivnani G., Wattal C.: *Scopulariopsis brevicaulis* infection of prosthetic valve resembling aspergilloma on histopathology. *Cardiovasc. Pathol.* **20**, 381–383 (2011)
 43. Jo Siu W. J., Tatsumi Y., Senda H., Pillai R., Nakamura T., Sone D., Fothergill A.: Comparison of *in vitro* antifungal activities of efinaconazole and currently available antifungal agents against a variety of pathogenic fungi associated with onychomycosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **57**, 1610–1616 (2013)
 44. Kardjeva V., Summerbell R., Kantardjiev T., Devliotou-Panagiotidou D., Sotiriou E., Gräser Y.: Forty-eight-hour diagnosis of onychomycosis with subtyping of *Trichophyton rubrum* strains. *J. Clin. Microbiol.* **44**, 1419–1427 (2006)
 45. Keller M., Krehon S., Stanek C., Rosengarten R.: Keratinopathogenic mould fungi and dermatophytes in healthy and diseased hooves of horses. *Vet. Rec.* **147**, 619–622 (2000)
 46. Kriesel J.D., Adderson E.E., Gooch W.M. 3rd, Pavia A.T.: Invasive sinonasal disease due to *Scopulariopsis candida*: case report and review of scopulariopsis. *Clin. Infect. Dis.* **19**, 317–319 (1994)
 47. Krzyściak P., Skóra M., Macura A.B.: Atlas grzybów chorobotwórczych człowieka. MedPharm Polska, Wrocław, 2011.
 48. Lee M.H., Hwang S.M., Suh M.K., Ha G.Y., Kim H., Park J.Y.: Onychomycosis caused by *Scopulariopsis brevicaulis*: report of two cases. *Ann. Dermatol.* **24**, 209–213 (2012)
 49. Lindsley M.D., Hurst S.F., Iqbal N.J., Morrison C.J.: Rapid identification of dimorphic and yeast-like fungal pathogens using specific DNA probes. *J. Clin. Microbiol.* **39**, 3505–3511 (2001)
 50. Linton C.J., Borman A.M., Cheung G., Holmes A.D., Szekely A., Palmer M.D., Bridge P.D., Campbell C.K., Johnson E.M.: Molecular identification of unusual pathogenic yeast isolates by large ribosomal subunit gene sequencing: 2 years of experience at the United Kingdom mycology reference laboratory. *J. Clin. Microbiol.* **45**, 1152–1158 (2007)
 51. Malecha M.A.: Fungal keratitis caused by *Scopulariopsis brevicaulis* treated successfully with natamycin. *Cornea*, **23**, 201–203 (2004)
 52. Mandeel Q., Nardoni S., Mancianti F.: Keratinophilic fungi on feathers of common clinically healthy birds in Bahrain. *Mycoses* **54**, 71–77 (2011)

53. Matković K., Vucemilo M., Vinković B.: Airborne fungi in dwellings for dairy cows and laying hens. *Arh. Hig. Rada. Toksikol.* **60**, 395–399 (2009)
54. Meyer W., Serena C., Firacative C., Kröger B., Arabatzis M., Robert V., de Hoog S., Balajee A., Velegriaki A.: An update on DNA barcoding of human pathogenic fungi. Fourth International Barcode of Life Conference, Adelaide, Australia, 2011
55. Monod M., Bontems O., Zaugg C., Léchenne B., Fratti M., Panizzon R.: Fast and reliable PCR/sequencing/RFLP assay for identification of fungi in onychomycoses. *J. Med. Microbiol.* **55**, 1211–1216 (2006)
56. Moreno G., Arenas R.: Other fungi causing onychomycosis. *Clin. Dermatol.* **28**: 160–163 (2010)
57. Mügge C., Hausteil U.F., Nenoff P.: Causative agents of onychomycosis – a retrospective study. *J. Dtsch. Dermatol. Ges.* **4**, 218–228 (2006)
58. MycoBank Website, Database Copyright © 2014 MycoBank in English, <http://www.mycobank.org/> (25 września 2014 roku, data ostatniego sprawdzenia adresu)
59. Naidu J., Singh S. M., Pouranik M.: Onychomycosis caused by *Scopulariopsis brumptii*. A case report and sensitivity studies. *Mycopathologia* **113**, 159–164 (1991)
60. Nieguitsila A., Arné P., Durand B., Deville M., Benoît-Valiergue H., Chermette R., Cottenot-Latouche S., Guillot J.: Relative efficiencies of two air sampling methods and three culture conditions for the assessment of airborne culturable fungi in a poultry farmhouse in France. *Environ. Res.* **111**, 248–253 (2011)
61. Normand A.C., Cassagne C., Ranque S., L'Ollivier C., Fourquet P., Roeseems S., Hendrickx M., Piarroux R.: Assessment of various parameters to improve MALDI-TOF MS reference spectra libraries constructed for the routine identification of filamentous fungi. *BMC Microbiol.* **13**, 76 (2013)
62. Pawlik B., Macura A.B.: Fungal susceptibility to cyclopirox. *Mikol. Lek.* **6**, 240–242 (1999)
63. Pereira V.J., Fernandes D., Carvalho G., Benoliel M.J., San Romão M.V., Barreto Crespo M.T.: Assessment of the presence and dynamics of fungi in drinking water sources using cultural and molecular methods. *Water Res.* **44**, 4850–4859 (2010)
64. Piecková E., Jesenská Z.: Occurrence of itraconazole-tolerant micromycetes in the soil and food products. *Folia Microbiol. (Praha)* **44**, 677–682 (1999)
65. Plewa K., Lone E.: Seasonal biodiversity of pathogenic fungi in farming air area. Case study. *Wiad. Parazytol.* **57**, 118–122 (2011)
66. Putignani L., Paglia M.G., Bordi E., Nebuloso E., Pucillo L.P., Visca P.: Identification of clinically relevant yeast species by DNA sequence analysis of the D2 variable region of the 25–28S rRNA gene. *Mycoses*, **51**, 209–227 (2008)
67. Rai S., Tiwari R., Sandhu S.V., Rajkumar Y.: Hyalohyphomycosis of maxillary antrum. *J. Oral Maxillofac. Pathol.* **16**, 149–152 (2012)
68. Roigé M.B., Aranguren S.M., Riccio M.B., Pereyra S., Soraci A.L., Tapia M.O.: Mycobiota and mycotoxins in fermented feed, wheat grains and corn grains in Southeastern Buenos Aires Province, Argentina. *Rev. Iberoam. Micol.* **26**, 233–237 (2009)
69. Sandhu G.S., Kline B., Stockman L., Roberts G.: Molecular probes for diagnosis of fungal infections. *J. Clin. Microbiol.* **33**, 2913–2919 (1995)
70. Sandoval-Denis M., Sutton D.A., Fothergill A.W., Cano-Lira J., Gené J., Decock C.A., de Hoog G.S., Guarro J.: *Scopulariopsis*, a poorly known opportunistic fungus: spectrum of species in clinical samples and *in vitro* responses to antifungal drugs. *J. Clin. Microbiol.* **51**, 3937–3943 (2013)
71. Sanguinetti M., Porta R., Sali M., La Sorda M., Pecorini G., Fadda G., Posteraro B.: Evaluation of VITEK 2 and RapID yeast plus systems for yeast species identification: experience at a large clinical microbiology laboratory. *J. Clin. Microbiol.* **45**, 1343–1346 (2007)
72. Satyavani M., Viswanathan R., Harun N.S., Mathew L.: Pulmonary *Scopulariopsis* in a chronic tobacco smoker. *Singapore Med. J.* **51**, 137–139 (2010)
73. Shankar E.M., Kumarasamy N. i wsp.: Hydrothorax in association with *Scopulariopsis brumptii* in an AIDS patient in Chennai, India. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **101**, 1270–1272 (2007)
74. Skóra M., Macura A.B., Bulanda M.: *In vitro* antifungal susceptibility of *Scopulariopsis brevicaulis* isolates. *Med. Mycol.* **52**, 723–727 (2014)
75. Skóra M., Macura A.B.: *In vitro* antifungal susceptibility testing of *Scopulariopsis brevicaulis* strains using agar diffusion method. *Wiad. Parazytol.* **57**, 111–116 (2011)
76. Soeta N., Terashima M., Gotoh M., Mori S., Nishiyama K., Ishioka K., Kaneko H., Suzutani T.: An improved rapid quantitative detection and identification method for a wide range of fungi. *J. Med. Microbiol.* **58**, 1037–1044 (2009)
77. Strassmann K.: Kinetik der minimalen Hemmkonzentration verschiedener Antimykotika gegenüber den klinisch isolierten Erregern der Onychomykosen während einer Beobachtungszeit von 20 Wochen. Philipps-Universität, 2003.
78. Szekely A., Johnson E. M., Warnock D. W.: Comparison of E-test and broth microdilution methods for antifungal drug susceptibility testing of molds. *J. Clin. Microbiol.* **37**, 1480–1483 (1999)
79. Szentl J.A., Kam J.K., Yohendran J., Morrissey O., Hall A.J.: Presumed *Scopulariopsis brevicaulis* chorioretinitis in a stem cell transplant recipient. *Clin. Experiment. Ophthalmol.* **38**, 314–315 (2010)
80. Szepietowski J., Reich A., Garłowska E., Kulig M., Baran E.: Czynniki predysponujące do rozwoju grzybicy paznokci stóp w populacji polskiej. *Mikol. Lek.* **12**, 231–234 (2005)
81. Tortorano A.M., Lass-Flörl C. i wsp.: ESCMID and ECMM joint guidelines on diagnosis and management of hyalohyphomycosis: *Fusarium* spp., *Scedosporium* spp. and others. *Clin. Microbiol. Infect.* **20** Sup. 3, 27–46 (2014)
82. Tosti A., Piraccini B. M., Lorenzi S.: Onychomycosis caused by nondermatophytic molds: clinical features and response to treatment of 59 cases. *J. Am. Acad. Dermatol.* **42**, 217–224 (2000)
83. Ulfing K., Płaza G., Sztylek A., Bronder J., Terakowski M., Guarro J.: General assessment of the influence of a municipal landfill site and environmental factors on the occurrence of keratinolytic fungi in soil. *Rocz. Panstw. Zakł. Hig.* **51**, 167–181 (2000)
84. Verrier J., Monod M. i wsp.: Identification of infectious agents in onychomycoses by PCR-terminal restriction fragment length polymorphism. *J. Clin. Microbiol.* **50**, 553–561 (2012)
85. Vignon M., Michonneau D., Baixench M.T., Al-Nawakil C., Bouscary D., Buzyn A., Salmon D., Paugam A.: Disseminated *Scopulariopsis brevicaulis* infection in an allogeneic stem cell recipient. *Bone Marrow Transplant.* **46**, 1276–1277 (2011)
86. Vollmer T., Störmer M., Kleesiek K., Dreier J.: Evaluation of novel broad-range real-time PCR assay for rapid detection of human pathogenic fungi in various clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.* **46**, 1919–1926 (2008)
87. Wuyts W.A., Molzahn H., Maertens J., Verbeken E.K., Lagrou K., Dupont L.J., Verleden G.M.: Fatal *Scopulariopsis* infection in a lung transplant recipient: a case report. *J. Heart Lung Transplant.* **24**, 2301–2304 (2005)
88. Yang G., Zhang M., Li W., An L.: Direct species identification of common pathogenic dermatophyte fungi in clinical specimens by semi-nested PCR and restriction fragment length polymorphism. *Mycopathologia*, **166**, 203–208 (2008)
89. Yang Q., Wei J., Chen Z.: Fatal bronchial invasion of *Scopulariopsis brevicaulis* in an acute monocytic leukemia patient. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **73**, 369–371 (2012)