

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Adéla Čmoková

Molekulární metody v epidemiologii a taxonomii dermatofyt

Molecular methods in taxonomy and epidemiology of dermatophytes

Bakalářská práce

Vedoucí závěrečné práce: Mgr. Vít Hubka

Praha 2013

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu

V Praze, dne 26. 4. 2013

.....
Adéla Čmoková

Poděkování

Chtěla bych poděkovat všem, kteří mi při psaní této práce pomáhali, hlavně mé rodině, která mě během studia podporovala. Jmenovitě mým rodičům, díky nimž jsem se nemusela během studia starat o finanční stránku života a mým prarodičům, kteří mě zásobovali naučnými materiály. Dále svému školiteli Vítu Hubkovi za výběr zajímavého tématu a za pomoc při jeho zpracování. Velké díky patří také Petrovi Mikulovi za obrovskou trpělivost, neustálou podporu během studia a zpracování práce a za hodnotné připomínky.

Abstrakt

V bakalářské práci jsem se zabývala úlohou a aplikací molekulárních metod v taxonomii a epidemiologii dermatofyt a otázkou jejich druhového konceptu. V první části jsem se věnovala zhodnocení výhod a nevýhod současných druhových konceptů a jejich problematickou aplikací u skupiny dermatofyt. V druhé části jsem se zaměřila na molekulární metody používající genetické markery ke studiu fylogenetických vztahů a diskriminaci dermatofyt, např. metodu PCR-RFLP, PCR-fingerprintové metody a sekvenaci, kde jsem se věnovala především cílovým genům a jejich rozlišovací schopnosti. V poslední části práce jsem zmapovala molekulární metody užívané k typizaci izolátů na nižší než druhové úrovni, mezi které patří např. analýza mikrosatelitů, PCR-fingerprintové metody, multilokusová sekvenční typizace a jejich konkrétní případy využití v epidemiologii.

Klíčová slova: dermatofytické houby, *Trichophyton*, *Microsporum*, druhový koncept, polyfázická taxonomie, molekulární typizace, fylogenetická analýza, analýza mikrosatelitů, sekvenování, PCR-fingerprinting, multilokusová sekvenční typizace

Abstract

In my bachelor thesis I have dealt with the role and application of the molecular methods in the taxonomy and epidemiology of the dermatophytes and the question of the species concepts in dermatophytes. In the first part, I focused on the evaluation of the advantages and disadvantages of the recent species concepts and their problematic application in dermatophytes. The second part is focused on the molecular methods that used genetic markers for phylogenetic analysis and species delineation within dermatophytes, e.g. the PCR-RFLP method, PCR-fingerprinting and DNA sequencing. I have evaluated the discrimination power of the particular DNA sequence loci to distinguish closely related species. In the last part, I have summarized the molecular methods that have been used in the typization at the intraspecific level, e.g. microsatellite analysis, PCR-fingerprinting, multilocus sequence typing.

Key words: dermatophytes, *Trichophyton*, *Microsporum*, species concept, polyphasic taxonomy, molecular typing, phylogenetic analysis, microsatellite analysis, molecular sequencing, PCR-fingerprinting, multilocus sequence typing

Obsah

1. Úvod.....	1
2. Obecná charakteristika skupiny dermatofyt.....	1
3. Druhov \acute{a} klasifikace dermatofyt.....	3
3.1.1. Morfologicko-fyziologick \acute{y} druhov \acute{y} koncept.....	3
3.1.2. Ekologick \acute{y} koncept druhu.....	4
3.1.3. Biologick \acute{y} koncept druhu.....	5
3.1.4. Fylogenetick \acute{y} koncept.....	7
3.1.5. Polyf \acute{a} zick \acute{y} druhov \acute{y} koncept.....	8
3.2. Zm \acute{e} ny druhov \acute{e} taxonomie dermatofyt.....	9
4. Molekul \acute{a} rn \acute{i} metody.....	12
4.1. Molekul \acute{a} rn \acute{i} metody na mezidruhov \acute{e} \acute{u} rovni.....	13
4.1.1. Polymer \acute{a} zov \acute{a} \acute{r} et \acute{e} zov \acute{a} reakce (PCR).....	13
4.1.2. DNA-DNA hybridizace.....	14
4.1.3. Metody zalo \acute{z} en \acute{e} na restik \acute{c} n \acute{i} ch endonukle \acute{a} z \acute{a} ch (RFLP, PCR-RFLP).....	14
4.1.3.1. Restrik \acute{c} n \acute{i} \acute{s} t \acute{e} pen \acute{i} mtDNA.....	14
4.1.3.3. PCR-RFLP.....	15
4.1.4. Sekvenov \acute{a} n \acute{i}	16
4.1.4.1. Sekvenace ribozom \acute{a} ln \acute{i} DNA.....	17
4.1.4.2. Sekvenace gen \acute{u} k \acute{o} duj \acute{i} c \acute{i} ch proteiny.....	18
4.1.4.3. Multigenov \acute{y} p \acute{r} istup.....	19
4.1.5. Metody PCR fingerprintingu (krom \acute{e} PCR-RFLP).....	20
4.2. Molekul \acute{a} rn \acute{i} metody na vnitrodruhov \acute{e} \acute{u} rovni.....	22
4.2.1. Sekvenov \acute{a} n \acute{i}	22
4.2.1.1. MLST.....	22
4.2.2. Metody zalo \acute{z} en \acute{e} na restik \acute{c} n \acute{i} ch endonukle \acute{a} z \acute{a} ch (RFLP a PCR-RFLP).....	23
4.2.3. Metody PCR fingerprintingu (krom \acute{e} PCR-RFLP).....	24
4.3.4. Anal \acute{y} za mini a mikrosatelit \acute{u}	25
5. Z \acute{a} v \acute{e} r:.....	27
6. Zdroje.....	28

1. Úvod

Dermatofytózy patří k nejběžnějším onemocněním člověka, jejichž prevalence se pohybuje v desítkách procent i ve vyspělých zemích. Většina těchto infekcí je v našich podmínkách způsobena antropofilním druhem *Trichophyton rubrum*, který ještě v první polovině 20. století byl druhem velmi vzácně izolovaným. Obdobně se dají pozorovat posuny i ve druhovém složení dermatofyt zoofilních. Jak naznačily molekulární analýzy, klasická taxonomie dermatofyt založená z velké části na morfologických znacích pravděpodobně značně nadhodnotila počet druhů dermatofyt. Koncept řady druhů se s nástupem molekulárních metod značně změnil a některé druhy, podpořené znaky molekulárními, nenachází podporu v morfologických znacích. Další otázky do diskuze o druhovém konceptu dermatofyt přinesly experimenty indukující teleomorf křížením opačně laděných izolátů. Z výsledků těchto pokusů není zcela jasné, zda je u dermatofyt biologický koncept druhu zcela aplikovatelný a do jaké míry jsou získaní kříženci skutečně jedinci jednoho druhu a do jaké míry se může jednat o mezidruhové hybridy. Taxonomie dermatofyt prochází významnými změnami a současně je předními výzkumnými skupinami raženo několik velmi rozdílných konceptů.

Typizaci kmenů na nižší než druhové úrovni je nezastupitelná pro epidemiologické šetření zjišťující zdroje nákazy přenesené z prostředí, ze zvířat, či z mezilidského kontaktu. Zvláštní význam pro medicínu a pracovní lékařství má pak zjišťování původu profesionálních nákaz u pracujících se zvířaty. Na rozdíl od *T. rubrum* a *Microsporum canis* nejsou informace o struktuře populace většinou dostupné pro další druhy. Pro některé významné druhy je ale znám kompletní genom, který by usnadnil případné hledání lokusů vhodných pro typizaci.

2. Obecná charakteristika skupiny dermatofyt

Dermatofyta jsou skupina ekologicky, morfologicky a fylogeneticky příbuzných mikroskopických hub zahrnující původce infekcí kůže a kožních adnex (vlasy, nehty, chlupy, peří, plazi šupiny) lidí a zvířat. Taxonomicky patří dermatofyta mezi askomycety, do řádu Onygenales, čeledi Artrodermataceae a jsou klasifikována do tří anamorfních rodů *Epidermofyton*, *Trichophyton*, *Microsporum* a s nimi spojeného teleomorfního rodu *Arthroderma* (Weitzman a Summerbell 1995). Klasifikace těchto tří anamorfních rodů je založená především na morfologii nepohlavních spór (mikro- a makrokonídií) a členění konidioforů (Emmons 1934) a v minulosti byla několikrát výrazně pozměněna (Weitzman a Summerbell 1995).

Molekulárně genetické studie ukázaly, že dermatofyta jsou monofytetická skupina (Harmsen *et al.* 1995, Kawasaki *et al.* 1992) na rozdíl od morfologicky klasifikovaných rodů *Trichophyton* a *Microsporum*, které monofyletické nejsou (Kac 2000; Gräser *et al.* 2006, 2008), dokonce se uvažovalo o seskupení obou rodů do rodu jediného (Gräser *et al.* 1999a; Jousson *et al.* 2004a).

Dermatofyta infikují téměř každého člověka v průběhu jeho života (Gräser *et al.* 2008). Na léčbu těchto onemocnění je po celém světě ročně vynaloženo více než deset miliard českých korun (Kane *et al.* 1997). Prevalence dermatofytóz se celosvětově pohybuje mezi 20-25% (Havlickova *et al.* 2008) a je závislá na socioekonomických podmínkách nebo zkoumané věkové skupině. Prevalence infekcí nehtů se například u pacientů mladších 19 let pohybuje kolem 0,7% ve srovnání s 18,2% u pacientů mezi 60 až 79 lety (Gupta *et al.* 2000).

Důležitou vlastností dermatofyt je schopnost rozkládat keratin (keratinolýza), která může být prokázána *in-vitro*, a je také předpokladem pro napadení keratinizovaných tkání a vyvolání infekce (tinea). Dermatofyta je možné podle preference k hostiteli rozdělit do tří skupin geofilní, zoofilní a antropofilní (Georg 1960). V životním cyklu zoofilních a antropofilních dermatofyt rozlišujeme stádium patogenní (vyskytující se na hostiteli) a stádium saprotrofní (přítomné ve vnějším prostředí). (Gupta *et al.* 2012, Baldo *et al.* 2011). Patogenní stádium je typické tvorbou nepohlavních artrospor, zatímco saprotrofní stádium je typické tvorbou nepohlavních makro- a mikrokonídií a pohlavních askospor (Gupta *et al.* 2012, Rashid 2011). Artrospory jsou spory sloužící k přenosu infekce, jejichž tvorba je *in-vitro* vyvolána zvýšeným množstvím oxidu uhličitého, teplotou 37 °C, sníženým množstvím glukózy v médiu nebo zvýšenou dávkou antimykotika. (Gupta *et al.* 2012, Farnoodian *et al.* 2009). Přestože artrospory patogenního stádia jsou pravděpodobně výhradně určeny k přenosu infekce, konidie stádia saprotrofního jsou také schopné vyvolat onemocnění (Gupta *et al.* 2012)

Unikátní schopnost napadnout keratinizované tkáně a v některých případech také přítomnost patogenního stádia, odlišuje dermatofyta od skupiny nepatogenních dermatofytoid (např. *T. ajelloi*, *T. terrestre*) a ostatních keratinolytických hub, pravděpodobných evolučních přechůdců dermatofyt (Simpanya 2000). Přechod saprotrofních, keratinolytických hub k parazitárním formám mohl být podpořen silným konkurenčním prostředím v půdě. Jako příklad můžeme uvést celosvětově rozšířený půdní druh *Chrysosporium keratinophilum*, který produkuje do okolí látky bránící *in-vitro* růstu některých konkurenčních druhů dermatofyt jako např. *T. rubrum*, *T. interdigitale*, *T. tonsurans* a *Epidermophyton floccosum* (Gokulshankar *et al.* 2005). Pravděpodobný model vývoje dermatofyt pokládá geofilní druhy dermatofyt za nejpůvodnější. Dlouhodobým kontaktem dermatofyt rozkládajících keratin v norách, peleších a hnízdech zvířat se vysvětluje adaptace geofilních dermatofyt na zvířecího hostitele a vznik druhů zoofilních (Gräser *et al.* 1999a). Intenzivní speciace zoofilních druhů bývá spojována s kordičním šířením dermatofyt pomocí zvířecí srsti a následnou speciací zoofilních druhů na savce (Harmsen *et al.* 1995). Dalším krokem ve vývoji dermatofyt významným z antropocentrického pohledu byla možnost přenosu zoofilních druhů na člověka a přizpůsobení se některých druhů lidskému hostiteli jako hostiteli hlavnímu. Tento krok v některých případech vedl ke ztrátě nebo výraznému omezení pohlavního rozmnožování (Gräser *et al.* 2006). Pohlavní proces u zoofilních druhů dermatofyt pravděpodobně probíhá v prostředí nor nebo doupat zvířat, kde je stálý dostatek kreatinu. Křížení nebylo nikdy pozorováno na živém hostiteli a pravděpodobně k němu v tomto prostředí nedochází. Z tohoto důvodu může být ztráta pohlavního

rozmnožování u antropofilních druhů vysvětlena ztrátou prostředí vhodného ke křížení (Tanaka *et al.* 1992).

3. Druhov^á klasifikace dermatofyt

Skupina dermatofyt se vyvinula poměrně nedávno (32 miliony let), proto jsou jak genetické, tak morfologické rozdíly mezi jednotlivými druhy často poměrně malé (Davison *et al.* 1980; Wu *et al.* 2009). Rozdíly jsou minimální zejména mezi antropofilními druhy, které se v minulosti vyvíjely v geografických izolovaných lokalitách, kde docházelo k fixaci neutrální mutací (Gräser *et al.* 2006). S nárůstem migrační rychlosti lidí ale docházelo také ke ztrátám polymorfismů u zatím neúplně reprodukcⁿě izolovaných druhů (Gräser *et al.* 2006). To způsobuje problémy ve vymezení hranic mezi druhy jak na úrovni molekulárních markerů, tak na úrovni fenotypu (Gräser 2006).

3.1.1. Morfologicko-fyziologický druhový koncept

Od první poloviny 19. století byly nové druhy dermatofyt rozlišovány bez průběžné kultivace, a to pouze na základě přímé mikroskopie odebraných dermatologických vzorků a klinických příznaků infikovaných pacientů (Gräser *et al.* 2000a). Z těchto dob se proto nezachoval žádný materiál, a bylo nutné založit nový nomenklatorický systém na nově zvolených typových položkách, tzv. neotypech (Gräser *et al.* 1999c). Řád byl do taxonomie dermatofyt vnesen díky počátkům kultivaci dermatofyt na umělých mediích a sledováním makro- a mikromorfologie subkultur (Sabouraud 1910 podle Gräser *et al.* 1999c). Morfologická kritéria se ale ukázala jako velmi problematická (Georg a Camp 1957). Navzdory tomu jsou dodnes hlavním parametrem při diagnostickém vyšetření (Gräser *et al.* 1999c). Dermatofyta jsou obecně morfologicky variabilní a v *in-vitro* kulturách prodělávají často rychlé a nezvratné degenerativní změny (Davison *et al.* 1980; Kawasaki *et al.* 2008; Mochizuki *et al.* 2003a). Ty se často objevují brzy po izolaci nebo opakovaném vyšetření subkultury (Davison *et al.* 1980). Barevné metabolity se ztrácí, kolonie se stávají bílými, vatovitými a stejně tak mikromorfologie postrádá charakteristické rysy (Davison *et al.* 1980). V konečném důsledku se kultura stává zcela sterilní (Gräser *et al.* 2000a). Tento problém znemožňuje pozdější opětovné vyšetření starých referenčních kmenů a z tohoto důvodu nejsou morfologická kritéria vždy pro taxonomii dostačující (Gräser *et al.* 2000). Některé původně druhově specifické mikromorfologické znaky, např. přítomnost hyf, které se v ostrých úhlech větví ve směru i proti směru růstu ("reflexive hyphae") u *T. soudanense* (Larone 2002), se na základě molekulárních metod ukázaly jako nespecifické (Gräser *et al.* 2000a; Guarro a De Hoog *et al.* 1995). Nestabilita a variabilita morfologických znaků představuje velký problém nejen pro taxonomii, ale také pro diagnostiku dermatofyt a v minulosti vedla k nahodnocení počtu druhů dermatofyt (Gräser *et al.* 2006). Významná variabilita se objevuje i v rámci stejných genotypů jednoho druhu (Heidemann *et al.* 2010). Také kultivační podmínky mají velký vliv na makro- i mikromorfologii jedinců (Gräser *et al.* 1998). Některé druhy dermatofyt poměrně pomalu

rostou a charakteristické znaky se mohou objevit až opožděné nebo mohou úplně chybět (Turin *et al.* 2000). Častým problémem bývá také neúspěšná kultivace i po předchozím pozitivním mikroskopickém nálezu (Mügge *et al.* 2006).

Výsledkem snahy o doplnění problematického morfologického konceptu byl systém nutričních a tolerančních testů (Georg a Camp 1957; Shadomy a Philpot 1980). Ten sestával ze setu agarových medií pro zjištění specifických nutričních požadavků, testu *in vitro* perforace vlasů (Ajello a Georg 1957), odpovědi na thiamin a inositol (Georg a Camp 1957), růstu na leštěných rýžových zrnech a schopnosti štěpit močovinu (Philpot 1967), ke kterým bylo později přidáno ještě velké množství doplňkových testů, jako například tolerance k chloridu sodnému (Gräser *et al.* 2000a). Tyto metody však mají nízkou specifitu a spíše vnášejí do systému zmatek (Firdos Katiar a Kushwaha 2012; Gräser *et al.* 2000c). Celý proces je navíc časově, finančně i interpretačně náročný a měl by ho provádět vyškolený personál (Turin *et al.* 2000).

Vzhledem k nedostatkům morfologicko-fyziologického konceptu bylo třeba nalézt přiléhavější druhový koncept a zavést snadnější diagnostické metody, založené například na molekulárních metodách, jež do znané míry eliminují variabilitu a nespecifitu morfologických a fyziologických metod (Faggi *et al.* 2001; Gräser *et al.* 1998; Kim *et al.* 2001).

3.1.2. Ekologický koncept druhu

Tento koncept zdůrazňuje adaptaci druhů na konkrétní ekologické niky (Giraud *et al.* 2008). Ty v podstatě odpovídají anatomickým lokalitám zasažených infekcí (tinea), např. na t. capitis (kštice), t. manuum (ruce), t. pedis (nohy), t. unguium (nehty), apod. (Weitzman a Summerbell 1995), nebo preferenci k hostiteli na geofilní, zoofilní (s dalším podrobnějším členěním podle konkrétních druhů) a antropofilní (Tab. 1) (Georg 1960). Ačkoli jsou pro některé druhy známy lokality, kde přednostně k infekci dochází, tyto informace však více vypovídají o způsobu přenosu infekce a nejsou příliš druhově specifické, ale mohou mnoho vypovídat o ekologii konkrétních druhů. Například u geofilních dermatofyt se přirozeně více vyskytují infekce dolních končetin, protože zde dochází k nejčastějšímu kontaktu s hlínou, která je zdrojem infekce (Alsop a Prior 1961). Rozdělení dermatofyt na základě preference k hostiteli je naopak pro taxonomii dermatofyt užitečné a praktické se ukazuje také být pro klinickou praxi a epidemiologické studie (Tietz a Mendling 2001). U geofilních, zoofilních i antropofilních druhů se liší nejen způsob přenosu, ale také průběh onemocnění. K nákaze geofilními druhy obvykle dochází převážně z půdy. Vzácně je možný i přenos z nemocného na zdravého jedince (Bednář *et al.* 1996). Pro zoofilní druhy jsou přirozeným hostitelem zvířata. Na člověka se pak infekce přenáší jako antropozoonóza, interhumánní přenos je vzácný. Pro antropofilní druhy je hlavním hostitelem člověk. Přenos se uskutečňuje především interhumánně, infekce u zvířat jsou vzácné. Zatímco antropofilní druhy vyvolávají u člověka jen mírně zánětlivou odezvu a průběh je spíše chronický se sklonem k recidivám, zoofilní druhy zpravidla vyvolávají u člověka akutní, silně zánětlivé a hnisající reakce, které však mají dobrou tendenci k hojení (Bednář *et al.* 1996).

Klasifikace dermafyt na základě preference k určitému hostiteli (antropofilní, zoofilní a geofilní) se používá především v klinické diagnostice pro případ dvou druhů s podobným fenotypem, které je nutné rozlišit pro jejich odlišné vlastnosti. Například odlišnou citlivostí k léčbě, dobou trvání léčby nebo infekční zdroj (Gräser *et al.* 2008). Je tedy zásadní pro klinickou praxi (Tietz a Mendling 2001). Takovým příkladem může být druh *T. interdigitale* u kterého je vzhledem ke zmíněným klinickým a ekologickým aspektům užitečné rozlišovat mezi zoofilními a antropofilními kmeny (Tietz a Sterry 2006). Ovšem z taxonomického hlediska je rozdělení druhů podle hostitelské specifity prozatím sporné, protože se v některých případech rozchází s molekulárními daty (Anzawa *et al.* 2011). Některé druhy jsou tak rozdělovány na základě molekulárních dat bez ohledu na hostitelskou specifitu. Například při sloučení zoofilního druhu *T. equinum* a antropofilního druhu *T. tonsurans* do jednoho druhu na základě sekvenace ITS rDNA byl opomenut fakt hostitelské specifity (Guarro a De Hoog 1995). Sloučení těchto druhů se později ukázalo, na základě dodatečných molekulárních metod a fenotypové charakteristiky, jako chybné a druhy byly znovu rozděleny v souladu s hostitelskou specifitou (Probst *et al.* 2002; Summerbell *et al.* 2007). Zoofilní druh *M. gallinae* byl také podle některých autorů chybně synonymizován na základě molekulárních metod s geofilním druhem *M. vanbreuseghemii* (*A. grubyi*) bez ohledu na hostitelskou specifitu (Woodgyer 2004, Gräser *et al.* 2000a). Nezohlednění hostitelské specifity v taxonomii může vést ke ztrátě důležitých epidemiologických informací jako je např. zdroj infekce (Woodgyer 2004). Navíc jsou molekulární data pro řadu druhů dermatofyt stále omezena jen na sekvence oblastí rDNA, která je u různých skupin hub často málo informativní a tedy i nedostatečná jako jediný podklad pro takovou synonymizaci.

Ačkoli tento koncept má své zastoupení v taxonomii dermatofyt, v současné době bylo zjištěno, že hostitelská specifita některých druhů není tak jasně vymezená, jak se myslelo (Kawasaki 2011a). Stále častěji přibývají např. zprávy o infekcích zvířat vyvolaných antropofilním *T. rubrum* (Votava 2003). Stejně tak byly v Evropě zachyceny z případů lidských mykóz kmeny *T. simii*, které obvykle způsobují infekce u opic a slepic na indickém subkontinentě (Gräser *et al.* 1999c, Beguin *et al.* 2012a).

3.1.3. Biologický koncept druhu

Mayerova definice druhu, dnes známá jako “biologický koncept druhu“, hovoří o druhu: „jako o takové skupině křížících se nebo se potenciálně křížících populací, která je od ostatních populací reprodukčně izolována“ (Mayr 1942) a případní hybridy mají sníženou fitness a nejsou fertillní (Mayr 1970). Uplatnění biologického konceptu druhu se prakticky provádí pomocí tzv. křížících pokusů. Je důležité, aby křížící pokusy probíhaly v prostředí, které podněcuje sporulaci. Tedy v prostředí s co nejmenším podílem cukrů a dalších lehce rozložitelných látek. Z tohoto důvodu byla vytvořena řada médií, například zředěný sabouradův agar s a bez přídavku $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ a KH_2PO_4 (Takashio 1972), Takashio medium (Takashi 1973), medium s přídavkem semen *Guizotia abyssinica* (Takashio a De Vroey 1976), ovesný agar (Weitzman a Silva-Hutner 1967). Do těchto médií bývá přidáván také

zdroj keratinu, který má simulovat přirozené podmínky křížení (Dawson *et al.* 1964; Padhye *et al.* 1973). Důležitý pro křížící pokusy byl také vývin snadné a rychlé metody monosporické izolace, která umožnila opakované testování výsledků jinými výzkumníky (Choi *et al.* 1999). V neposlední řadě bylo zásadní pro aplikaci biologického konceptu vyvinutí a zdokonalení technik, pomocí kterých bylo možné určit párovací typy (Stockdale 1968; Takashio a De Vroey 1976). Schopnost jednotlivých izolátů heterotalických dermatofyt se mezi sebou křížit závisí na kompatibilitě párovacích typů (Takashio 1974; Dyer *et al.* 1992). U heterotalických druhů dermatofyt nacházíme dvě sexuálně opačně laděné skupiny jedinců (párovací typy), arbitrárně značené (+) a (-) (Takashio 1979). Jedince stejného párovacího typu určuje typ MAT genu v „párovacím“ lokusu (Turgeon 1998). Párovací typ (+) odpovídá jedincům, u kterých nacházíme na místech tzv. MAT genů idiomorfu MAT1-2, kódující HMG doménu (high mobility group) a párovací typ (-) patří jedincům, u kterých nacházíme idiomorfu MAT1, obsahující sekvenci kódující alfa box doménu (Kano *et al.* 2011b, 2012; Li *et al.* 2010).

Ačkoliv byla nalezena technika určující párovací typy, stále ještě existují další překážky, které nám nedovolí biologický koncept druhu aplikovat na některé skupiny dermatofyt. Biologické pojetí druhu totiž předpokládá, že se druhy sestávají z kmenů s rovnoměrně rozloženými párovacími typy, kde křížení probíhá náhodně a nedochází tak k narušení toku genů a teprve takovéto populace mohou být dobře reprodukčně izolované od jiných populací (Gräser *et al.* 2006). Realita je však taková, že rozmanité mechanismy zajišťující vztah patogen-hostitel a vlivy vnějšího prostředí mají tendenci vytvářet trvalé nerovnováhy (Gräser *et al.* 2006). U některých druhů byl v populaci dokonce zaznamenán pouze jeden párovací typ. Například u antropofilních druhů *T. tonsurans* a *T. rubrum* je zaznamenán pouze křížecí typ (-) (Kim *et al.* 2001; Stockdale 1968; Hayashi a Takashio 1984) a u zoofilního *T. equinum* a antropofilních izolátů *T. interdigitale*, pouze křížící typ (+) (Kano *et al.* 2011a; Stockdale 1968). Výrazný posun v poměru párovacích typů ve prospěch jednoho párovacího typu, nebo úplné vymizení jednoho typu může nastat v případě, že se druhy disponující pouze jedním křížícím typem při svém vzniku oddělily od původního druhu jako jeden jedinec, nebo malá skupinka jedinců se stejným párovacím typem (Summerbell 2000). Zjistilo se například, že se antropofilní izoláty *T. interdigitale* kříží s kmeny *A. vanbreuseghemii*, jejichž HMG domény MAT-2 genů vykazují 100% homologii za vzniku infertilních kleistothecií (Kano *et al.* 2012). Je tedy možné, že *T. interdigitale* je druh odvozený od sexuálních předků *A. vanbreuseghemii* s křížecím typem MAT-2 a adaptací na člověka jako hostitele (Kano *et al.* 2012).

U druhů disponujících pouze jedním párovacím typem není možné provést úspěšný křížící pokus (Takashio 1979). Otázkou ale zůstává, jestli druhý párovací typ není v populaci takových druhů jen extrémně vzácný a neuniká naší pozornosti. Zejména mezi antropofilními, ale také mezi zoofilními druhy je řada druhů s neznámou teleomorfou, množících se zdánlivě klonálně (White *et al.* 2008). Takovým příkladem je již zmíněný *T. rubrum* a *T. tonsurans* (Gräser *et al.* 1999c) nebo druhy *T. concentricum* a *T. verrucosum*, u kterých se při křížících pokusech nepodařilo navodit tvorbu teleomorfy (Gräser *et al.* 2006). Naopak téměř u všech geofilních druhů známe perfektní stádium

(Takashio 1979). Existence mnoha druhů dermatofyt, u kterých zatím nebylo nalezeno pohlavní stádium, však z několika důvodů neznamena jejich neschopnost křížení (Gräser *et al.* 2006). Některé druhy rodu *Trichophyton* jsou považovány za asexuální (klonální) druhy jen z důvodu chybějících zpráv o jejich úspěšném křížení (Gräser *et al.* 2006). Geny MAT lokusu jsou přítomné i u řady druhů dříve považovaných za asexuální (Symoens *et al.* 2011) a je tedy možné, že jsou schopny kryptického pohlavního procesu. Schopnost sexuální reprodukce některých druhů by z tohoto důvodu měla být přehodnocena, jak se tomu již stalo u několika druhů dermatofyt (Anzawa *et al.* 2010; Symoens *et al.* 2011). Výzkumem MAT lokusu v genomech vláknitých hub a cílenými křížícími experimenty byla v nedávné době objevena skrytá schopnost pohlavního rozmnožování u řady druhů dříve považovaných za přísně asexuální, jako např. u *A. fumigatus* (Fares a Wolfe 2003; O’Gorman *et al.* 2008). Tyto experimenty však často vyžadují druhově velmi specifické kultivační podmínky, které komplikují úspěšné navození pohlavního procesu u ostatních hub (O’Gorman *et al.* 2008). Také u druhu *T. rubrum*, považovaného za asexuální (všechny izoláty mají MAT-2 idiomorfu), bylo dosaženo mezidruhové rekombinace s MAT-1 izolátem *T. simii* a vzniku fertilního potomstva (Anzawa *et al.* 2010).

Stockdale (1968) uskutečnil křížící pokusy s izoláty *A. simii* párovacího typu MAT-1 a MAT-2, které nazýval jako testovací kmeny (tester strains) a kmeny 23 různých druhů dermatofyt. Nasledně rozdělil těchto 23 druhů do čtyř skupin podle stupně stimulace tvorby askomat opačně laděným testovacím izolátem *A. simii*. Výsledky této studie ukázaly, že feromony zodpovědné za tvorbu askomat u dermatofyt jsou si velmi podobné a mohou způsobovat tvorbu infertilních askomat u fylogeneticky nepříbuzných druhů. V této studii šlo o vznik infertilních askomat při mezidruhovém křížení, ale jsou dokumentované i případy vzniku mezidruhových hybridů, např. u již zmíněných druhů *T. rubrum* a *T. simii* (Anzawa *et al.* 2010). Křížení tedy může probíhat nejen uvnitř druhů definovaných molekulárními metodami, či morfologicky ale také napříč druhy, kdy dochází ke vzniku hybridního potomstva. Dermatofyta jsou skupinou evolučně mladou a ačkoli mají druhy uvnitř této skupiny pravděpodobně svou vlastní evoluční cestu, nedošlo ještě mezi některými z nich k vytvoření úplné reprodukční bariéry (Kawasaki *et al.* 2010). Nedostatečná reprodukční bariéra byla nalezena například mezi jasně taxonomicky oddělenými teleomorfami *Arthroderma benhamiae*, *A. simii* a *A. vanbreuseghemii*, mezi kterými bylo také zaznamenáno hybridní potomstvo (Kawasaki *et al.* 2010).

3.1.4. Fylogenetický koncept

Fylogenetický koncept je založený na společné vlastnosti asexuálně i sexuálně se rozmnožujících organismů - monofylečnosti, označující linii zahrnující jediného společného předka a všechny jeho potomky (Henning 1965). Druh vzniká tehdy, když se reprodukčně kompatibilní skupina rozdělí na dvě skupiny, mezi nimiž již neprobíhá výměna genetického materiálu (Hennig 1965). Fylogenetický koncept však má mnohá omezení. Mayden (1997) upozornil, že při použití vysoce

polymorfního genetického markeru jako znaku rozeznávající druh, by mohl být počet druhů značně nadhodnocen. Z tohoto důvodu je nutné používat více než jeden polymorfni lokus (Taylor *et al.* 2000). V současnosti nejpoužívanější aplikací tohoto konceptu je tzv. GCPSR koncept (genealogical concordance phylogenetic species recognition) (Avice a Ball 1990). Ten má za cíl vymezit hranice druhů za pomoci několika nezávislých fylogenetických analýz založených na odlišných genech. Tak umožňuje odlišit skupiny jedinců sdílející stejnou fylogenetickou minulost (na základě stejné topologie fylog. stromů, tzv. konkordance) od skupin, ve kterých probíhá rekombinace (Avice a Ball 1990). U hub, kde z důvodu nedávné radiace druhy mezi sebou ještě nejsou zcela reprodukčně izolované, nemusí být GCPSR koncept aplikovatelný (Graser *et al.* 2007; Kawasaki *et al.* 2010). Aplikací GCPSR konceptu se daří rozlišit skrytou genetickou diverzitu hub, kterou není možné zjistit aplikací jiných druhových konceptů (Dettman *et al.* 2003, 2006). GCPSR koncept také dokáže rozlišit kryptické druhy s malými nebo žádnými morfologickými rozdíly (O'Donnell *et al.* 2004, Rehner a Buckley 2005) a je u hub snadněji aplikovatelný a jednodušší na interpretaci než koncept biologický a morfologický (Taylor *et al.* 2000).

3.1.5. Polyfázický druhový koncept

Monofyletičnost, na které je založený fylogenetický druhový koncept, nemůže být určujícím druhovým znakem, protože se vyskytuje na všech taxonomických úrovních (Mallet 2007) a stanovení druhové hranice je vždy subjektivní záležitostí (Taylor *et al.* 2000). Počet druhů by se tedy mohl značně nadhodnotit, proto je třeba při klasifikaci druhů zahrnout i morfologická, či ekologická kritéria (Mishler a Donoghue 1982). Velkým problémem některých druhových konceptů je také čas, kdy genetická změna může zůstat kryptická a projeví se ve fenotypu až po změně podmínek (Fenchel 2005). Základním požadavkem na revizi nových druhů se tak stává polyfázický přístup (Graser *et al.* 2006), kdy jako základ používáme molekulárně-genetická kritéria. Nutná je však současná aplikace morfologických, ekofyziologických a biochemických dat (de Quieroz 2005; Vanormelingen *et al.* 2007). Podobně jako polyfázický koncept i kohezní druhový koncept ke stanovení druhové hranice zohledňuje více znaků, ale na rozdíl od polyfázického konceptu některé znaky upřednostňuje před jinými. Kohézní koncept definuje druh jako největší skupinu jedinců udržující si svoji fenotypovou a genotypovou soudržnost pomocí tzv. kohezních mechanismů. Na každý druh přitom působí jiné kohézní mechanismy. Mohou převažovat faktory genetické (např. genový tok) nebo demografické (např. genetický drift nebo selekce) (Templeton 1989). Templeton (1989) ale sám zdůrazňuje, že hlavním kohezním mechanismem, udržující stávající druh, jsou ekologická omezení, která limitují rozsah fenotypové variability (Templeton 1989). Populace obývající různé ekologické niky (např. v případě dermatofyt rozdílného hostitele, nebo odlišné části povrchu těla téhož hostitele), se vlivem nedostatku demografické výměny rozrůzní ve dva druhy (Kawasaki *et al.* 2008; Summerbell *et al.* 1997; Kawasaki 2011a).

Vrátíme-li se k rozdělení druhu *T. interdigitale* na antropofilní a zoofilní druh, pak by na základě kohezního konceptu k tomuto rozdělení měla přispívat nejen preference k hostiteli a makromorfologie kolonie (Nenoff *et al.* 2007), ale rozdělení by mělo být také podpořeno molekulárními daty. Heidemann *et al.* (2010) a Symoens *et al.* (2011) rozlišili antropofilní a zoofilní *T. interdigitale* na základě ITS sekvence. Anzawa *et al.* (2011) záhy toto rozdělení zpochybnil a jedinou nalezenou substitucí v nekódující sekvenci nepovažoval za důležitou pro stanovení hostitelské specifity. Navíc nepotvrdil žádnou korelaci mezi ITS genotypem, morfologickou charakteristikou, typem MAT-genu, nebo preferencí k hostiteli.

3.2. Změny druhové taxonomie dermatofyt

Výše uvedené koncepty demonstrují, že v taxonomii dermatofyt dnes existuje několik názorových proudů, jejichž následkem a neuváženými změnami vzniká zmatek, na který doplácí především uživatelská veřejnost. Do stávající taxonomie dermatofyt se z velké části promítly fylogenetické studie založené na sekvencích ITS rDNA. Správnost celé řady taxonomických změn provedených na základě molekulárních dat (Tab. 1) je stále předmětem diskuzí (Gräser *et al.* 1999c, 2000c, 2000b; Woodgyer 2004). Fylogenetické vztahy na základě ITS sekvenčních dat ne zcela odpovídají fylogenezím sestrojeným na základě jiných lokusů (Kawasaki *et al.* 2008). Dalším problémem taxonomie jsou stará jména, pro která neexistuje typový materiál. S ohledem na zřejmou potřebu změny stávající klasifikace bylo nutné pro některé druhy vytvořit neotypy, na kterých jsou současné taxony postaveny (Gräser *et al.* 2000c).

Změny nomenklatury, které proběhly na přelomu tisíciletí, s sebou přinesly zmatek v podobě chybných synonymizací několika druhů (Gräser *et al.* 1999a, 2000a; Woodgyer 2004). Závažný je tento problém především pro klinickou praxi, která není schopna reflektovat tak velké množství změn. Za příklad může posloužit *T. mentagrophytes*, jež byl již v minulosti mnohými autory pokládán za heterogenní skupinu (Ajello 1968; Guarro a Hoog 1995; Kane *et al.* 1997). V roce 1999 byla taxonomie komplexu založená na morfologii změněna na základě sekvenčních dat z oblasti ITS rDNA, PCR fingerprintingu a AFLP analýzy (Gräser *et al.* 1999c). Některé druhy byly redukovány na synonyma jiných druhů, zatímco některé poddruhy naopak dosáhly statusu druhů (Gräser *et al.* 1999c). Dvacet čtyři taxonů souvisejících s *T. mentagrophytes* a *T. tonsurans* bylo zredukováno na pět druhů (Gräser *et al.* 1999c). Sporná byla především synonymizace zoofilního druhu *T. equinum* a antropofilního *T. tonsurans*, která podnítila řadu dalších studií, ty pak druhy znovu oddělily (Probst *et al.* 2002; Summerbell *et al.* 2007). Nejvíce sporů stále panuje kolem jména *T. mentagrophytes* a vhodnosti volby neotypu, kvůli kterému jsou izoláty dříve v označované jako *T. mentagrophytes* dnes nutné označovat jako *T. interdigitale* a druh *T. mentagrophytes* naopak téměř ztratil klinický význam (Gräser 1999c; Beguin *et al.* 2012b).

Změny se nevyhnuly ani komplexu druhů blízkých *T. rubrum* a *M. canis*. Druhy byly revidovány na základě dat fenotypových, molekulárních dat z oblasti ITS rDNA, PCR fingerprintingu

a AFLP analýzy. Patnáct druhů a variet komplexu *T. rubrum* bylo redukováno na druhy *T. rubrum* a *T. violaceum* (Gräser *et al.* 2000b). Sporná byla synonymizace *T. soudanense* a *T. violaceum*, mezi kterými se našly významné rozdíly na populační úrovni (Ohst *et al.* 2004). Myšlenku samostatného druhu *T. soudanense* podporuje také jeho unikátní zeměpisná distribuce (Larone 2002; Padhye a Summerbell 2005). Oprávněnost synonymizace *T. soudanense* s *T. rubrum* byla ale později potvrzena na základě výsledků multigenní studie (Gräser *et al.* 2007), a tak tento druh pravděpodobně představuje jen geograficky odlišnou populaci *T. rubrum* s určitými odchylkami ve fenotypu. Otázkou je také status druhů *T. yaoundei* a *T. gourvilii*, které byly synonymizovány s *T. violaceum*, ale u kterých byl později nalezen charakteristický profil na základě analýzy mikrosatelitních markerů. Ačkoli jsou mikrosatelitní markery běžně druhově specifické (Kardjeva *et al.* 2006), ještě nikdy nebyly použity pro diskriminaci druhů, a proto nemohly být *T. yaoundei* a *T. gourvilii* uznány formálními taxony (Ohst *et al.* 2004). Obdobně bylo sedm dříve uznávaných druhů rodu *Microsporium* synonymizováno s *M. canis*, *M. audouinii* a *M. ferrugineum* (Gräser *et al.* 2000c). Předchozími studiemi byl na základě analýzy sekvencí ITS a analýzy mitochondriální DNA nalezen blízký vztah druhů *M. canis*, *M. audouinii* a *M. ferrugineum*, ačkoli druhy vykazovaly velmi odlišný fenotyp (Gräser *et al.* 2000a; Kawasaki *et al.* 1995). Gräser *et al.* (2000a) zjistili, že na diskriminaci druhů tohoto komplexu jsou citlivější metody jako PCR fingerprinting a AFLP více než ITS sekvenace. Nejvíce polymorfismů bylo nalezeno v nekódujících oblastech jako jsou mikrosatelitní markery (Gräser *et al.* 1999a; Kaszubiak *et al.* 2004). Některé další druhy rodu *Microsporium* byly synonymizovány, ačkoli šlo o druhy s rozdílnou ekologickou preferencí, např. zoofilní *M. gallinae* s geofilním *M. vanbreuseghemii* (Gräser 1999a; Woodgyer 2004). Některé druhy se dočkaly svého znovuzavedení do praxe, např. druhy *M. audouinii* a *T. schoenleinii*, které multigenová analýza potvrdila jako samostatné druhy (Kaszubiak *et al.* 2004; Probst *et al.* 2002).

Závěrem lze říci, že molekulární data sice nejsou neomylná, ale jejich přínosem bylo odstranění 300 nadbytečných označení druhů, která existovala v době před příchodem molekulární éry a která chybně vznikla na základě variabilní fenotypu dermatofyt (Gräser *et al.* 2006).

Tabulka 1. Změna taxonomie na základě molekulárních dat a preferovaná ekologická nika vybraných dermatofytů a druhu *T. ajelloi* (Gräser *et al.* 1999a, 1999b, 2000c, 2000b, 2008; Simpanya 2000).

V současnosti uznávané druhy		Synonymizované taxony
anamorfa	fylogeneticky blízká teleomorfa	
<i>T. rubrum</i> †		<i>T. fischeri</i> <i>T. kanei</i> <i>T. soudanense</i> <i>T. megninii</i> <i>T. raubitscheckii</i> <i>T. rubrum</i> var. <i>nigrans</i>
<i>T. interdigitale</i> † *	<i>A. vanbreuseghemii</i>	<i>T. mentagrophytes</i> var. <i>interdigitale</i> <i>T. mentagrophytes</i> var. <i>nodulare</i> <i>T. mentagrophytes</i> var. <i>goetzii</i>
<i>T. mentagrophytes sensu stricto</i> * (dříve <i>T. simii</i>)	<i>A. simii</i>	<i>T. mentagrophytes</i> var. <i>mentagrophytes</i> <i>T. langeronii</i> <i>T. sarkisovii</i> <i>T. mentagrophytes</i> var. <i>quinckeanum</i>
<i>T. sp.</i> *	<i>A. benhamiae</i>	<i>T. mentagrophytes</i> var. <i>granulosum</i>
<i>T. erinacei</i> *		<i>T. mentagrophytes</i> var. <i>erinacei</i>
<i>T. tonsurans</i> †		<i>T. tonsurans</i> var. <i>crateriforme</i> <i>T. tonsurans</i> var. <i>epilans</i> <i>T. tonsurans</i> var. <i>Sulfureum</i>
<i>M. audouinii</i> †		<i>M. audouinii</i> <i>M. rivalieri</i> <i>M. langeronii</i>
<i>M. canis</i> *	<i>A. otae</i>	<i>M. canis</i> <i>M. distortum</i> <i>T. equinum</i>
<i>M. ferrugineum</i> †		<i>M. ferrugineum</i>
<i>M. fulvum</i> □	<i>A. fulvum</i>	<i>K. longifusus</i> <i>M. boullardii</i> <i>M. ripariae</i>
<i>T. ajelloi</i> □	<i>A. uncinatum</i>	<i>T. ajelloi</i> var. <i>nanum</i> <i>E. stockdaleae</i>
<i>M. gallinae</i> □	<i>A. grubyi</i>	<i>M. vanbreuseghemi</i>
<i>T. violaceum</i> †		<i>T. glabrum</i> <i>T. gourvilii</i> <i>T. violaceum</i> var. <i>indicum</i> <i>T. yaoundei</i>
<i>T. verrucosum</i> *		<i>T. verrucosum</i> var. <i>album</i> <i>T. verrucosum</i> var. <i>discoides</i>

<i>T. concentricum</i> †	
<i>T. eboreum</i> □	
<i>T. schoenleinii</i> †	
<i>M. racemosum</i> □	<i>A. racemosum</i>
<i>E. floccosum</i> †	
<i>T. sarkisovii</i> †	
<i>T. vanbreusemii</i> □	<i>A. gertleri</i>
<i>M. persicolor</i> □	<i>A. persicolor</i>
<i>M. nanum</i> □	<i>A. obtusum</i>
<i>M. gypseum</i> □	<i>A. gypseum</i> , <i>A. incurvatum</i>
<i>M. cookei</i> □	<i>A. cajetanum</i>
<i>T. georgiae</i> □	<i>A. ciferrii</i>
<i>T. flavescens</i> □	<i>A. flavescens</i>
<i>T. gloriae</i> □	<i>A. gloriae</i>

* zoofilní, † antropofilní, □ geofilní

4. Molekulární metody

Velmi důležitá je volba vhodného genetického markeru podle cílové taxonomické úrovně, na které řešíme aktuální taxonomický, či epidemiologický problém. Tato volba má značný vliv i na interpretaci získaných dat (McDonald 1997). Molekulární markery můžeme rozdělit na dvě skupiny: na markery proteinové (alozymy, izoenzymy) a na DNA markery (Avisé 1994). Genetické markery jsou vysoce informativní a reprodukovatelné (McDonald 1997) a na rozdíl od proteinových markerů nejsou genetické markery tak výrazně ovlivněny prostředím a není tedy narušena jejich selektivní neutralita, což někdy neplatí pro izoenzymové markery (Watt 1994). Nicméně izoenzymy zůstávají účinným genetickým markerem u hub, které jsou v izoenzymových lokusech dostatečně variabilní (McDonald 1997). Protože je v současné době většina studií prováděna s DNA genetickými markery, zaměřím se ve své práci právě na ně.

Jako DNA markery mohou být použity geny nebo nekódující úseky mitochondriálního (mtDNA) i nukleárního (ntDNA) genomu (Avisé 1994). Mitochondriální DNA hub je charakteristická rychlými změnami, které v ní probíhají (Paquin *et al.* 1997). Pro srovnání, v homologní oblasti genů kódujících malou podjednotku rRNA mitochondriálního a nukleárního genomu hub probíhají substituce 16krát rychleji u mitochondriálních genů (Bruns a Szaro 1992a). Proto také mtDNA vykazuje vysokou mezidruhovou variabilitou (McDonald 1997). Výhodou mtDNA oproti ncDNA je její přítomnost v buňce ve vysokém počtu kopií a také možnost získat tuto DNA i z malých a částečně degradovaných vzorků. Nukleární DNA je ze starších vzorků hůře dostupná, protože snadněji degraduje (McDonald 1997). Při studiu mtDNA však bývají problémem somatické mutace nebo jaderné pseudogeny mitochondriálního původu (numts), které byly nalezeny v jaderném genomu u více než 64 eukaryotních druhů včetně hub (Bensasson *et al.* 2001; Ballard a Whitlock 2004).

V nedávné době bylo dokončeno sekvenování genomů sedmi druhů dermatofyt (*T. rubrum*, *T. tonsurans*, *T. equinum*, *M. canis*, *M. gypseum*, *T. verrucosum*, *A. benhamiae*), které jsou nyní k dispozici veřejnosti (Burmester *et al.* 2011; The Broad Institute; http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/dermatophyte_comparative/MultiHome.html).

Znalost genomů by měla přispět k našim znalostem o patogenezí dermatofytóz, o tom, co je druh u dermatofyt, komparativní genomické studie by měly najít geny zodpovědné za rozdílné ekologické (hostitelské) preference, apod.

Cílem této práce není detailně objasnit principy metod použitých v taxonomii a epidemiologii dermatofyt, ale podat přehled o jejich aplikaci a přínosu v konkrétních situacích. S podrobnými principy jednotlivých metod se odkazují na práci, kterou publikoval Avise (1994).

4.1. Molekulární metody na mezidruhové úrovni

Identifikace dermatofyt na druhové úrovni hraje nezastupitelnou úlohu především v půdní biologii, medicínské a veterinární praxi. Pro klinickou praxi je přesná a rychlá identifikace etiologického agens velmi důležitá, zejména kvůli volbě antimykotik, která mají různá spektra aktivity (Graser *et al.* 2008). Dermatofyta jsou poměrně rychle se vyvíjející skupinou, u které se ekologie druhů a jejich prevalence v populaci dynamicky mění a přesná druhová identifikace přináší cenná data pro epidemiologii (Gräser *et al.* 1998).

4.1.1. Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Polymerázová řetězová reakce a její varianty jsou vhodné metody při omezeném množství tkáně izolované pro extrakci DNA, čehož se využívá zejména v diagnostice, kde je snaha o co nejrychlejší identifikaci etiologického agens bez předchozí kultivace (McDonald 1997), neméně důležitá je však i identifikace založená na kultivaci etiologického agens. Polymerázová řetězová reakce pomocí vhodně vybraných primerů umožní amplifikaci určitého úseku DNA specifickou pro určitou skupinu organismů, ale pro za určitých okolností je nutné provést ještě postamplifikační analýzu, která se provádí například přímým sekvenováním nebo restriční analýzou.

Bock *et al.* (1994) navrhli dvojici primerů TR1 a TR2 pro amplifikaci fragmentu genu pro 18S podjednotku rDNA a úspěšně odlišili druhy běžných dermatofyt od jiných DNA eukaryot a prokaryot na základě velikosti fragmentů na elektroforetogramu. Turin *et al.* (2000) provedli obdobnou studii, ve které použili tytéž primery (TR1 a TR2) a primery B2F a B4R specifické pro ITS rDNA. Yoshida *et al.* (2006) navrhli dvojici primerů tonsF1 a tonsR1 specifickou pro ITS oblast druhu *T. tonsurans*, která umožnila tento druh úspěšně rozeznat od jiných druhů rodu *Trichophyton*.

Modifikacemi PCR (např. nested PCR, multiplex PCR, real-time qPCR) může být zvýšena citlivost a specifčnost PCR reakce (Kamiya *et al.* 2004; Kanbe *et al.* 2003a). Kim *et al.* (2011) použili mnohonásobnou (multiplex) PCR (v reakční směsi byly tři sady primerů specifických pro oblasti ITS, 28S a 18S rDNA) k identifikaci 11 běžných druhů dermatofyt. Nested PCR pracuje na systému tzv.

vnějších (nasednou v prvním kole amplifikace) a vnitřních primerů (nasednou v druhém kole), a proto někdy může vést k nespecifické amplifikaci (Nagao *et al.* 2005). Nested PCR zaměřená na oblast ITS rDNA provedená s primery specifickými pro rod *Trichophyton* na DNA izolované z parafinových řezů a klinických vzorků pokožky a nehtů, úspěšně identifikovala 26 druhů dermatofyt a nedermatofytních hub. (Uchida *et al.* 2009). Tato metoda nám tedy umožňuje zpětně určit původce onemocnění z klinických vzorků, například séra nebo parafinových řezů (Nagao *et al.* 2005).

4.1.2. DNA-DNA hybridizace

Při DNA-DNA hybridizaci je spojována denaturovaná jednořetězcovou DNA dvou organismů v nově vzniklý heteroduplex a při renaturaci zjišťujeme míru homologie studovaných genomů (Dutta *et al.* 1967). Problematická je interpretace naměřené homologie, konkrétně rozhodnutí o druhové hranici. Ta je většinou stanovená arbitrárně a v rámci dermatofyt se udává jako míra společné homologie 80% (Dutta *et al.* 1967; Gräser *et al.* 1999a). Např. pouze 70% homologii přineslo srovnání kmenů *T. mentagrophytes* s kmeny *A. benhamie*, což předznamenalo, že se nejedná o stejný druh, ačkoliv dřívějšími studiemi byly považovány za anamorfu a teleomorfu stejného druhu. Kombinací molekulárních technik se později prokázalo, že *A. benhamie* je teleomorfa nepojmenovaného druhu *Trichophyton sp.*, tedy ne druhu *T. mentagrophytes* (Gräser *et al.* 1999c, Gräser *et al.* 2008).

4.1.3. Metody založené na restikčních endonukleázách (RFLP, PCR-RFLP)

4.1.3.1. Restrikční štěpení mtDNA

Konvenční DNA fingerprinting je založený na detekci polymorfismů v DNA pomocí RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism). RFLP metoda je poměrně nenáročná a poskytuje možnost určit místa štěpení, nevýhodou je však velké množství izolované DNA, nezbytné k analýze fragmentu (Mochizuki *et al.* 1990, Kamiya *et al.* 2004, Kanbe *et al.* 2003a). Nevýhodou může být také nízká pravděpodobnost detekce mutace (polymorfizmu), která ovšem závisí na typu a počtu použitých enzymů (Beckmann a Soller 1983) a nízký počet znaků, který metoda poskytuje oproti sekvenování (Avisé 1994). Vzhledem k malé velikosti se dá mtDNA oproti jaderné DNA snadněji naštěpit restrikčními endonukleázami (Kac 2000) a objevuje v genomu ve více kopiích (Kováč *et al.* 1984), proto také byla velmi oblíbeným markerem v začátcích výzkumu dermatofyt. Pomocí restrikční analýzy mtDNA se například potvrdila myšlenka již dříve navrhované (Weitzman *et al.* 1986) synonymiky teleomorfických rodů *Nannizzia* a *Arthroderma* (Kawasaki *et al.* 1992). RFLP je však vhodná metoda i na mezidruhovou diskriminaci, což dokládá studie zkoumající teleomorfy komplexu *M. gypseum* (*A. gypseum*, *A. fulvum* a *A. incurvatum*) (Kawasaki *et al.* 1990), které byly pomocí restrikční analýzy mtDNA dány do jedné skupiny a analýza tak jasně vyčlenila čtvrtou teleomorfu - *A. otae*. Dále bylo analýzou 22 izolátů druhu *T. interdigitale* pomocí RFLP mtDNA zjištěno, že vzory

proužků těchto izolátů jsou totožné se vzory proužků *A. vanbreuseghemii*, jedné z teleomorf řazených do komplexu *T. mentagrophytes* (Mochizuki *et al.* 1990).

4.1.3.3. PCR-RFLP

PCR-RFLP je metoda využívaná především k rutinní detekci patogenů o známé sekvenci (Tab. 2) (Awise 1994). Rozdílný postup PCR-RFLP uplatňujeme, pokud je naším cílem rozlišit blízké příbuzné druhy od sebe nebo identifikace více druhů dermatofyt současně. V prvním případě je v diskriminačním genu nalezeno variabilní místo, podle kterého je vybrán restriční enzym štěpící pouze jeden z druhů. Druhově specifickým štěpení PCR produktu byl například rozlišen druh *T. tonsurans* a *T. equinum* nebo druh *M. ferrugineum* od příbuzných druhů *M. canis* a *M. audouinii* (Rezaei-Matehkolaei *et al.* 2012a, 2012b). Ve druhém případě dochází k amplifikaci úseku DNA (např. ITS regionu) pomocí specifických primerů a následně štěpení produktu pomocí restričních enzymů s výstupem ve formě fingerprintového pattern. RFLP analýza, zacílená například na ITS oblast rDNA, mtDNA a geny DNA topoizomerázy II (Kamiya *et al.* 2004), byla úspěšně použita pro studium fylogenetických vztahů nebo identifikaci dermatofyt na druhové úrovni (Brilhante *et al.* 2006; Jackson *et al.* 1999; Kamiya *et al.* 2004; Kanbe *et al.* 2003b; Mirhendi *et al.* 2012; Mochizuki *et al.* 2003b; Shehata *et al.* 2008). Gutzmer *et al.* (2004) úspěšně vyvinuli metodu založenou na real-time PCR, cílené na oblast ITS a následném štěpení fragmentů restričními endonukleázami, k identifikaci 21 běžných druhů dermatofyt, nedermatofytních patogeních hub a kvasinek. Jackson *et al.* (1999) a Mochizuki *et al.* (2003b) analyzovali genetickou variabilitu v ITS a NTS regionu rDNA dermatofyt PCR amplifikací těchto regionů a následným restričním štěpením. Metoda rozlišila většinu druhů zkoumaných dermatofyt s výjimkou některých blízké příbuzných sesterských druhů (*T. rubrum* a *T. soudanense*; *T. quinckeanum* a *T. schoenleinii*) (Jackson *et al.* 1999) a úspěšně rozlišila druh *T. tonsurans* (Mochizuki *et al.* 2003b). Mezi kmeny *T. rubrum* byla nalezena poměrně velká variabilita uvnitř NTS regionu (Jackson *et al.* 1999).

Úspěšně byl pro restriční enzymem použit také fragment genu pro DNA topoizomerázu II. Výsledná restriční pattern vykazovala vysokou stabilitu, reprodukovatelnost a byla schopná identifikovat téměř všechny druhy dermatofyt (Kamiya *et al.* 2004; Kanbe *et al.* 2003a, 2003b). Kanbe *et al.* (2003a) použili kombinaci nested PCR provedené pomocí sad primerů dPsD1, dPsD2, PsT, PsME a restriční enzymy. První sady primerů dPsD2 a dPsD1 stabilně generují asi 2380 bp dlouhý fragment DNA topoizomerázy II dermatofyt. PCR pomocí druhé sady primerů PST a PsME identifikovala pět druhů z 18 druhů dermatofyt. PCR produkty vytvořené dPsD2 byly natráveny restričními enzymy a pomocí DNA restričního profilu bylo identifikováno zbylých 18 běžných druhů dermatofyt kromě *T. interdigitale*, který měl stejný profil jako *T. mentagrophytes s. str.*. Specificita, reprodukovatelnost a stabilita tohoto systému PCR pro klinické izoláty byla hodnocena na setu 352 kmenů dermatofyt reprezentujících šest druhů (Kamiya *et al.* 2004).

Tabulka 2. Rozlišovací schopnost zkoumaných genů, amplifikačních primerů a restričních enzymů vybraných studií využívajících metodu PCR-RFLP.

amplifikovaný gen	primery	restriční enzymy	počet zkoumaných druhů	Nerozlišené druhy ¹	studie
18S, ITS, NTS	ITS1 a ITS4	MvaI	17	<i>Tru.</i> a <i>Tso.</i> ; <i>Tqu.</i> a <i>Tsch.</i>	Jackson <i>et al.</i> 1999
ITS region	ITS1 a ITS4	Mva I, BsrF I	2		Rezaei-Matehkolaei <i>et al.</i> 2012a
ITS region	ITS1 a ITS4	MvaI, HinfI	14	<i>Tto.</i> a <i>Teq.</i>	Mochizuki <i>et al.</i> 2003b
TOP2	primer sety dPsD1, dPsD2, PsT, PsME	Hinf I	6		Kamiya <i>et al.</i> 2004
TOP2	primer sety dPsD1, dPsD2, PsT, PsME	Hinc II, Hinf, Afl II, PflM I	18	<i>Tin.</i> a <i>Tme.</i>	Kanbe <i>et al.</i> 2003b

¹ *T. rubrum* (*Tru*), *T. soudanense* (*Tso*), *T. quinqueanum* (*Tqu*), *T. schoenleii* (*Tsch*), *T. tonsurans* (*Tto*), *T. interdigitale* (*Tin*), *T. mentagrophytes sensu stricto* (*Tme*), *T. equinum* (*Teq*).

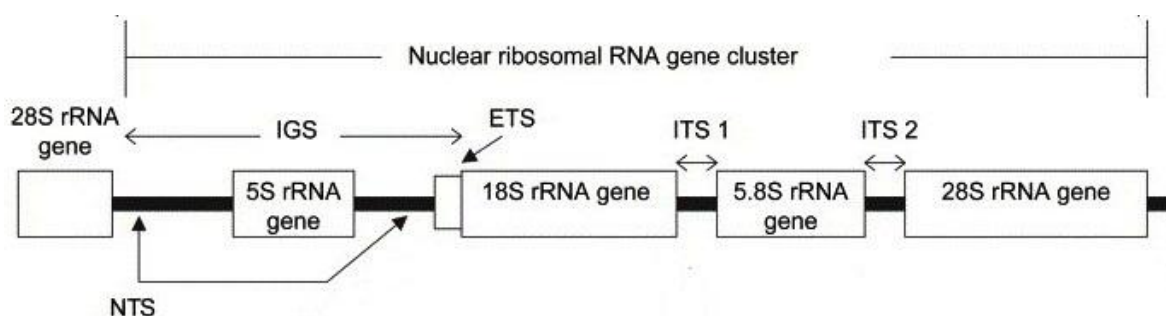
4.1.4. Sekvenování

Jako nejúčinnější metoda pro správnou identifikaci dermatofyt na druhové úrovni se uvádí sekvenování PCR produktů (Gräser *et al.* 1998; Jackson *et al.* 1999; Makimura *et al.* 1998; Mochizuki *et al.* 1999, 2001). Tato metoda je ale časově a finančně náročná při zpracování velkého počtu vzorků (Kanbe *et al.* 2003a). Přesto podle některých výpočtů (Kardjeva *et al.* 2006) není sekvenování například ITS rDNA o mnoho dražší než je identifikace druhů dermatofyt podle konvenčních metod s použitím setu médií a biochemických testů.

Pro sekvenční analýzu druhů dermatofyt byly úspěšně použity markery genů jako je chitin syntáza (CHS), aktin (ACT), oblasti ribozomální DNA, zejména ITS oblast, a Mn-dependentní superoxididmutáza (MnSOD) (Fréalles *et al.* 2007; Harmsen *et al.* 1995; Jousson *et al.*, 2004a; Kano *et al.* 1998, 2003; Okeke *et al.* 2001; Wakasa *et al.* 2010). Při studiu fylogenetických vztahů dermatofyt pomocí genově specifických primerů je nejužívanějším markerem především ITS oblast rDNA. Tento marker je vhodný také pro rutinní identifikaci druhů dermatofyt přímo z klinického materiálu (Turin *et al.* 2000, Jackson *et al.* 1999; Kanbe *et al.* 2003b, Uchida *et al.* 2009). Gen mitochondriální cytochrom oxidázy I používaný u mnoha organismů jako univerzální barcode sekvence, není pro některé rostliny, živočichy a houby dostatečně varibilní, aby odlišil blízké příbuzné sesterské druhy (Savolainen *et al.* 2005, Dupuis *et al.* 2012)

4.1.4.1. Sekvence ribozomální DNA

Metoda sekvenace cílená na klastr genů jaderné ribozomální DNA se osvědčila při studiu dermatofyt na různých taxonomických úrovních (Bruns *et al.* 1992b; Olsen, *et al.* 1986; Leclerc *et al.* 1994). Tato část genomu (Obr. 1) obsahuje 18S, 5.8S a 28S geny, které kódují rRNA a které mají mezi houbami relativně konzervované nukleotidové sekvence. Zahrnuje také několik variabilních regionů jako ITS1, ITS2 (Internally Transcribed Spacer 1, 2) (Iwen *et al.* 2002) a IGS (Intergenic Spacer), obsahující ETS (Externally Transcribed Spacer), NTS (Non-Transcribed Spacer) a gen pro 5S rRNA (Lott *et al.* 1993). Houby jsou obecně poměrně variabilní zejména v oblastech ITS, NTS a IGS (Maiden *et al.* 1998).



Obrázek 1. Klastr genů ribozomální RNA. Klastr se skládá ze tří hlavních genů (5.8S, 18S a 25S rRNA nebo 28S molekuly) a je rozptýlen mezi distančními regiony (IGS, NTS, ETS a ITS). IGS region zahrnuje NTS a ETS regiony a gen pro 5S rRNA (Mitchell a Zuccaro 2006).

Gen velké ribozomální podjednotky (LSU rDNA), který se úspěšně používá u jiných skupin hub k determinaci na úrovni rodů a vyšších taxonomických jednotek, není schopný zřetelně oddělit všechny tři anamorfní rody dermatofyt, ale byl úspěšně použit na oddělení skupiny dermatofyt od příbuzných rodů (Leclerc *et al.* 1994). Gen pro malou ribozomální podjednotku (18S rDNA) je také málo variabilní a vhodný pro studium hub na rodové úrovni a výše; u dermatofyt byl použit k demonstraci evoluční divergence 3 rodů dermatofyt a blízké příbuzných patogeních dimorfních hub např. rodu *Ajellomyces* (Harmsen *et al.* 1995). Pomocí 18S rDNA se zjistilo, že dermatofyta jsou monofyletického původu a patří do řádu Onygenales (Harmsen *et al.* 1995). Zatímco geny pro malou a velkou ribozomální podjednotku nejsou schopné determinovat dermatofyta ani na úrovni rodu, ribozomální regiony, které se sestávají z vnitřní přepisovaných oblastí (ITS1 a -2) a 5.8S rDNA, jsou velmi variabilní úseky vhodné k vymezení fylogenetických vztahů úzce příbuzných druhů (Kanbe 2008).

Oblast označovaná jako ITS1 se nachází mezi konzervovanými kódujícími oblastmi 18S a 5.8S ribozomální DNA, vyvíjí se rychleji než většina ostatních genů a díky vysokému množství polymorfismů může organismy rozlišit i na nejnižších taxonomických úrovních (Iwen *et al.* 2002).

Sekvenování oblasti ITS poskytuje poměrně přesnou metodu identifikace dermatofyt na druhové úrovni, ale ke správné diskriminaci druhů je nutné použít jak oblast ITS1, tak ITS2 (Li *et al.* 2008). Například některé kmeny *T. soudanence* jsou v oblasti ITS1 totožné s kmeny *T. violaceum*, ovšem v oblasti ITS2 se liší v řadě AT opakování (Li *et al.* 2008). ITS2 jasněji rozlišuje zástupce *M. canis* komplexu (*M. audouinii*, *M. canis* a *M. ferrugineum*), zatímco ITS1 je citlivější na odlišení druhů *T. rubrum*, *T. violaceum*, *T. soudanense*. Například poslední dva jmenované druhy vykazují v oblasti ITS2 sekvence identitu (Li *et al.* 2008). Přesto některé druhy v jedné z těchto oblastí mohou vykazovat jen nepatrné rozdíly, ačkoli jsou výrazně fenotypicky i ekologicky odlišné (Summerbell *et al.* 1999; Gräser *et al.* 2008). ITS je zatím jediný sekvenční marker zastoupený pro všechny v současnosti akceptované druhy v databázi GenBank a nabízí se tedy jeho použití pro snadnou identifikaci dermatofyt (Gräser *et al.* 2008). Nevýhodou databáze je velké množství chybně identifikovaných izolátů (Gräser *et al.* 2008; Summerbell *et al.* 2007) a přítomnost sekvenačních chyb u izolátů stejného druhu, které smazávají některé mezidruhové rozdíly (Summerbell *et al.* 2007). Z tohoto důvodu bylo navrženo vytvoření databáze standartních sekvencí (DNA barcoding), které by tento problém vyřešily. Zatím však byly v databázi Genbank zveřejněny standartní čárové kódy pouze k diskriminaci patnácti druhů dermatofyt (Benson *et al.* 2012; dostupné na <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>)

4.1.4.2. Sekvence genů kódujících proteiny

Významné v identifikaci a porozumění evoluce dermatofyt byly i studie užívající geny kódující proteiny (Fréalles *et al.* 2007; Jousson *et al.*, 2004a; Kano *et al.* 1998, 2003; Okeke *et al.* 2001). Pro studium nižších taxonomických úrovní je výhodou těchto genů s nepostradatelnou rolí v organismu jejich schopnost do určité míry podlehnout selekčnímu tlaku (Kano *et al.* 1997).

Fréalles *et al.* (2007) porovnávali citlivost dvou markerů u izolátů druhů *T. mentagrophytes* komplexu. Prvním byl housekeeping gen kódující MnSOD (enzym, podílející se na obraně proti oxidačnímu stresu), druhým markerem byla oblast ITS rDNA. Studie odhalila nižší stupeň genetické heterogenity druhů *T. mentagrophytes* komplexu v markeru MnSOD oproti ITS rDNA, ačkoli oba markery úspěšně rozlišovaly mezi jednotlivými druhy (Fréalles *et al.* 2007). Pomocí genu MnSOD se podobně jako pomocí ITS rDNA podařilo odlišit problematické druhy *T. mentagrophytes* komplexu druh (*T. interdigitale* / *A. vanbreuseghemii*, *T. mentagrophytes*, *T. erinacei* a *A. benhamiae*). Proto tento gen může být vhodným markerem v multi-lokusových studiích. Podobné výsledky byly získány pro gen kódující aktin (Okeke *et al.* 2001). Studie ukázala, že gen ACT je méně vhodným markerem oproti ITS rDNA, nedokázal totiž rozlišit některé blízké příbuzné druhy dermatofyt například *T. rubrum* a *T. violaceum* (Okeke *et al.* 2001; Tsuboi *et al.* 2002).

Srovnáním sekvencí genu CHS1 u kvasinek a vláknitých hub došlo k objevení vysoce konzervované oblasti, potenciálně vhodné k evolučním studiím (Bowen *et al.* 1992). Rod *Arthroderma* vykazuje 75-85% aminokyselinovou podobnost ve zkoumaném markeru s vybranými druhy

nedermatofytickými hub (Kano *et al.* 1997). V genu pro chitin syntázu je přítomno více konzervativních úseků označených CH1, CH2, CH3 a všechny jsou u vláknitých hub přibližně stejně dobře použitelné pro tvorbu fylogenetických stromů (Bowen *et al.* 1992, Chua *et al.* 1994), úsek CH1 je ale nejvíce zastoupený v databázích (Hirai *et al.* 2003). Rod *Microsporium* byl pomocí úseku CH1 jednoznačně oddělen od rodu *Trichophyton* a *Chrysosporium* (Hirai *et al.* 2003). Tento výsledek fylogenetické analýzy ovšem nepoporuji data založená na ITS rDNA ani izoenzymová data (Graser *et al.* 1999, Jousson *et al.* 2004a). Kano *et al.* (1997) rozdělili rod *Arthroderma* do tří klastřů pomocí genu CHS1. První skupina sdružovala teleomorfy *T. mentagrophytes* komplexu (*A. simii*, *A. vanbreuseghemii* a *A. benhamiae*), do druhé skupiny patřily teleomorfy komplexu *M. gypseum* (*A. fulvum*, *A. gypseum* a *A. incurvatum*) a třetí skupina se osahovala teleomorfy *A. grubyi* (anamorfa *M. vanbreuseghemii*) a *A. otae* (anamorfa *M. canis*). Podobných výsledků bylo dosaženo i na základě mtDNA (Kawasaki *et al.* 1996) a sekvencí 28S a 18S rDNA (Leclerc *et al.* 1994; Harmsen *et al.* 1995). Gen pro chitin syntázu rozeznal u rodu *Trichophyton* pouze dva klastry (Hirai *et al.* 2003).

4.1.4.3. Multigenový přístup

Sekvence několika genů za účelem získání přesného fylogenetického vztahu mezi druhy, se ukazuje jako užitečný přístup k revizi druhu (Beguín *et al.* 2012b). Pro dva blízké příbuzné taxony *T. tonsurans* a *T. equinum*, lišící se preferencí k hostiteli (člověk, kůň), jsou k dispozici tyto sekvenční markery: ITS rDNA, část genu pro β -tubulin (BT2) a translační elongační faktor 1- α (TEF1). Rezaei-Matehkolaei *et al.* (2012a) ukázali, že v lokusech ITS a BT2 jsou jen malé mezidruhové rozdíly na rozdíl od genu TEF1, který dva druhy přesvědčivě rozlišil, a proto byl vytvořen postup, který na základě restričního štepení fragmentu genu TEF1 umožňuje odělit oba geny bez nutnosti sekvenace. Obdobně byl gen TEF1 nejvhodnější pro odlišení druhu *M. ferrugineum* od příbuzných druhů *M. canis* a *M. audouinii* (Rezaei-Matehkolaei *et al.* 2012b). Beguín *et al.* (2012b) provedl multigenovou studii na základě genů pro aktin, β -tubulin a ITS rDNA. Tato studie mimo jiné zpochybnila spojení teleomorfy *A. vanbreuseghemii* a anamorfy *T. interdigitale*. Autoři dále zjistili, že *T. quinckeanum* není pravděpodobně variantou *T. mentagrophytes* a tyto taxony by měly být považovány za odlišné druhy (Beguín *et al.* 2012b).

Aplikace GCPSR konceptu u multigenních studiích zahrnuje podmínku tzv. konkordancí mezi jednotlivými fylogenezemi založenými na rozdílných genech. Fylogenetické stromy několika nezávislých genů se porovnávají na základě topologie (Taylor *et al.* 2000). Kawasaki *et al.* (2008) provedli srovnávací studii fylogeneze dermatofyt na základě sekvencí genů pro aktin, ITS rDNA a DNA topoizomerázy II. Podobná srovnávací studie byla provedena také později tentokrát na základě sekvencí genů pro aktin, DNA topoizomerázu II a glyceralddehyd-3-fosfát dehydrogenázu a genů pro 5.8S rRNA a ITS rDNA (Kawasaki *et al.* 2011b). Tyto dvě studie byly provedené za účelem upozornit na problémy nově navrhované taxonomie založené převážně na fylogenetických stromech vzniklých na základě ITS oblasti rDNA (Kawasaki 2011a). Výsledné fylogenetické stromy se v obou studiích

lišily v závislosti na použitém genu, a proto fylogenetický strom na základě ITS oblasti sám o sobě nemusí představovat přesný obraz fylogeneze dermatofyt (Kawasaki *et al.* 2008, 2011b). Kawasaki (2011a) doporučuje prozatím zachovat stávající taxonomii, novou taxonomii navrhuje postavit na základě GCPSR druhového konceptu, který se má až dalšími studii ukázat jako vhodný nebo nevhodný koncept pro taxonomii dermatofyt.

4.1.5. Metody PCR fingerprintingu (kromě PCR-RFLP)

PCR fingerprinting je soubor metod, které analyzují často celé genomy pomocí metody PCR. Podle specifity nasednutí primerů je můžeme rozdělit na genově specifické (typicky některé aplikace PCR-RFLP - viz. kapitola 4.1.3.3.) a genově nespecifické například RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), RAMD (Random Amplified Monomorphic DNA) nebo AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), DAF (DNA Amplification Fingerprinting) a AP-PCR (Arbitrarily Primed PCR). AFLP analýza byla úspěšně použita ve třech studiích značně redukcí množství dermatofyt z *T. rubrum*, *T. mentagrophytes* a *M. canis* komplexů (Gräser *et al.* 1999c, 1999b, 2000c), ale metody RAMD a DAF zatím nenašly mezi skupinou dermatofyt významné uplatnění.

Metody používající genově nespecifickou PCR (primery) nevyžadují znalost cílových sekvencí DNA (Munthali *et al.* 1992), mohou však mít nízkou reprodukovatelnost ve srovnání s PCR s genově specifickými primery (Kanbe 2008; Mochizuki *et al.* 1997; Tyler *et al.* 1997). Problémem metod bývá možná komigrace proužků o podobné molekulové hmotnosti, které nemusí nutně reprezentovat homologní úseky DNA, tzv. konvergence znaků (Munthali *et al.* 1992). Také kontaminace zásobní DNA např. bakteriální nebo hostitelskou DNA může významně ovlivnit vzory proužků, což může být problémem zvláště pokud templátová DNA byla izolována přímo z klinických vzorků (Kanbe *et al.* 2003a; Loeffler *et al.* 1999). Nicméně při získání kvalitních vzorků templátové DNA, užití standardizovaných koncentrací činidel od stejných výrobců a stejného termocyklieru je možné dosáhnout vysoké reprodukovatelnosti výsledků (Baeza *et al.* 2006; Turin *et al.* 2000). Jednou z metod využívající nespecifické primery je například RAPD nebo AP-PCR. Metody PCR fingerprintingu jsou obecně rychlé, jednoduché a levné metody identifikace druhů dermatofyt, méně často jsou dnes již využívány pro účely fylogenetických studií (Gräser *et al.* 1998).

Metodou RAPD byly např. rozlišeny antropofilní druhy *T. interdigitale*, *T. rubrum* a *E. floccosum* za použití primerů OPE-01, OPE-02, OPE-04, RC08, R28 (Mochizuki *et al.* 1997); druhy *M. canis* a *M. gypseum* za použití primeru FM1 (Kano *et al.* 1998).

Metoda AP-PCR se liší od předchozí RAPD pouze upraveným PCR cyklem a primery různé délky (Welsh a McClelland 1990). Liu *et al.* (1996) úspěšně použili primer OPAA11, kterým identifikovali běžné druhy dermatofyt (*T. rubrum*, *T. tonsurans*, *T. mentagrophytes*). V další studii byl použit stejný primer a navíc také OPD18. Tento primer byl schopný produkovat druhově-specifické profily DNA fragmentů pro všech 28 zkoumaných druhů s výjimkou *T. rubrum* a *T. gourvilli*, a dále nerozlišil antropofilní a zoofilní varianty *T. interdigitale* (Liu *et al.* 1997). Kombinace dvou primerů

(OPD18 a OPAA17) dokázala identifikovat 23 z 25 zkoumaných druhů nebo poddruhů dermatofyt (Liu *et al.* 2000).

Zvláštností některých PCR-fingerprintových metod je, že primery používané pro amplifikaci fragmentů nasedají na mini- a mikrosatelitní lokusy. Microsatelity můžeme analyzovat metodou STMS (Sequence Microsatellite Site), která používá primery nasedající na mikrosatelitní lokus v konkrétních místech a pomocí kterých analyzujeme délku lokusu (počet repetice - viz Metody na vnitrodruhové úrovni, viz. kapitola 4.3.4.) (Thomas a Scott *et al.* 1993), nebo je můžeme analyzovat metodou ISSR-PCR (Inter Single Sequences Repeat PCR), která používá právě primer v podobě jedné z repetitivních sekvencí. Ten mívá často i tzv. kotvíci sekvenci, také nasedá na okraj mikrosatelitního lokusu (Zietkiewicz *et al.* 1994). Metoda STMS se v rámci dermatofyt používá v epidemiologických studiích, ISSR se používá na druhovou diskriminaci dermatofyt ale i v epidemiologických studiích, kde se např. primer (GACA)₄ osvědčil pro typizaci druhu *M. persicolor* (Shehata *et al.* 2008). Užitečný se tento primer ukázal být i v diskriminaci dermatofyt na druhové úrovni (Faggi *et al.* 2001, 2002; Roque *et al.* 2006; Shehata *et al.* 2008). Tato metoda stejně jako STMS metoda analýzy mikrosatelitů (Ohst *et al.* 2004) např. objevila velmi blízký vztah mezi druhy *T. rubrum* a *T. violaceum* (Shehata *et al.* 2008). U izolátů určených jako *T. mentagrophytes* byly objeveny tři odlišné profily proužků, dva odpovídaly kmenům *T. mentagrophytes* s. str., třetí pak *T. interdigitale* (Faggi *et al.* 2001). Profily primeru (GACA)₄ vykazují vyšší komplexnost než je tomu u profilů získaných PCR-RFLP, a navíc se ukazuje, že je tato metoda lépe reprodukovatelná (Shehata *et al.* 2008), ale negeneruje žádnou vnitrodruhovou variabilitu (Faggi *et al.* 2001). Dobrou opakovatelnost metody dokazují dvě nezávislé studie, jejichž výsledkem byly stejné fingerprintové pattern s přibližně stejným rozsahem velikostí fragmentů 600-2500 bp (Faggi *et al.* 2001; Shehata *et al.* 2008). Spesso *et al.* (2013) provedli také studii, ve které primer (GACA)₄ produkoval jednoduché a reprodukovatelné vzory proužků, kterými byly rozpoznány běžné druhy dermatofyt. Navíc byl ve studii použit druhý primer (GTG)₅, který úspěšně odlišoval *T. mentagrophytes* a *T. tonsurans*. Roque *et al.* (2006) použil mikrosatelitní primery M13, (GACA)₄, (GTG)₅ a specificky vytvořený primer pro *M. audouinii* MA1 k rozlišení běžných druhů dermatofyt. Primery M13 a (GTG)₅ v několika případech, a v jednom také (GACA)₄, nebyly schopné rozlišit mezi *M. audouinii* a *M. canis*. MA1 byl navrhnutý jako primer specifický pro izoláty *M. audouinii* (Roque *et al.* 2006). Kardjeva *et al.* (2006) použili primer T1 specificky odlišující *T. rubrum* od *T. violaceum*. Pro zhodnocení schopnosti PCR fingerprintingu identifikovat 26 druhů dermatofyt byly použity čtyři primery (AC)₁₀, AP3, M13-core sekvence, přičemž 17 druhů ukázalo charakteristické vzory, diskriminační schopnost posledního primeru (GTG)₅ nebyla tak vysoká (Gräser *et al.* 1998). Velmi podobné pattern proužků se vyskytovaly u tří dvojic druhů: *M. gallinae* a *M. vanbreuseghemii*; *M. audouinii* a *M. canis*; *T. verrucosum* a *T. erinacei*, což naznačuje blízkou příbuznost těchto druhů (Gräser *et al.* 1998).

4.2. Molekulární metody na vnitrodruhové úrovni

Typizace kmenů na nižší než druhové úrovni hraje nezastupitelnou úlohu pro epidemiologické šetření zjišťující zdroje nákazy přenesené z prostředí, ze zvířat, či z mezilidského kontaktu (El-Fari a Gräser *et al.* 2000). Molekulární epidemiologické metody mohou být neocenitelné při vyšetřování ohnisek infekcí (El-Fari a Gräser 2000), příkladem může být epidemie tinea corporis gladiatorum způsobená *T. tonsurans* mezi mladými zápasníky (El-Fari a Gräser 2000). Molekulární typizace kmenů byla provedena jen u malého množství druhů dermatofyt např. u druhů *T. mentagrophytes* (Kac *et al.* 1999), *T. tonsurans* (El-Fari a Gräser 2000), *T. rubrum* (Gräser *et al.* 1999b), *M. canis* (Sharma *et al.* 2007) a *M. persicolor* (Sharma *et al.* 2008). Typizační metody jsou obecně používány k řešení dvou různých otázek. Pochází izoláty získané z ohniska choroby ze stejného nebo odlišného kmene (krátkodobá nebo místní epidemiologie) (Maiden *et al.* 1998)? Jak jsou kmeny, způsobující onemocnění v jedné zeměpisné oblasti, příbuzné kmenům izolovaným jinde na světě (dlouhodobá nebo globální epidemiologie) (Maiden *et al.* 1998)?

4.2.1 Sekvenování

Oblast ITS rDNA se osvědčila jako dobrý nástroj pro mezidruhovou diskriminaci. Naproti tomu NTR oblast rDNA je použitelný i jako marker ve vnitrodruhové diskriminaci (Gaedigk *et al.* 2003, Gupta *et al.* 2001; Jackson *et al.* 1999). Jackson *et al.* (1999) zjistil, že ve NTR oblasti rDNA *T. rubrum* se nachází polymorfismus tvořený dvěma tandemově se opakujícími prvky (TRSs), TRS-1 a TRS-2 (Jackson *et al.* 2000). Sekvenování jediného PCR produktu nepředstavuje příliš dobrý nástroj k posouzení vnitrodruvé variability, naproti tomu sekvenování několika lokusů (MLST) je použitelné i na populační úrovni. Fari a Gräser (2000) použili sekvence ITS oblasti a PCR fingerprinting k odlišení kmenů *T. tonsurans* s variabilním vzhledem kolonií, žádný polymorfismus však nenalezl. Heidemann *et al.* (2010) a Symoens *et al.* (2011) rozlišili antropofilní a zoofilní *T. interdigitale* na základě ITS rDNA sekvence. Sekvence ITS a 28S rDNA rozdělily kmeny *A. benhamiae* do dvou populací, americko-evropské a africké (Makimura *et al.* 1999, 1998; Kano *et al.* 2002, 2008). V další studii se ke dvěma větvím *A. benhamie* připojila třetí, izolovaná z ježků (*Atelerix albiventris*) (Kano *et al.* 2008).

4.2.1.1. MLST

MLST (multi-locus sequence typing) vykazuje vysokou vnitrodruhovou diskriminační schopnost bakteriálních a houbových organizmů. Proto je tato metoda hojně využívána v populačních studiích (Robles *et al.* 2004). Problémem je nutnost velmi kvalitních sekvencí a vysoká finanční náročnost. Na druhou stranu velká výhoda MLST je v možném sdílení výsledků analýz mezi laboratořemi a možností vytvořit globální databáze (Maiden *et al.* 1998, Behringer *et al.* 2011). V rámci skupiny dermatofyt ještě MLST schémata vytvořena nebyla. Z dosud publikovaných

molekulárních dat je patrné, že sekvenované lokusy (ACT, TOP2, BT2, ITS a GPD) nejsou příliš vhodné pro druh *T. rubrum* a *T. interdigitale*, ale naopak rozlišily řadu haplotypů uvnitř druhu *A. benhamiae* (Beguin *et al.* 2012b, Kawasaki *et al.* 2008, 2011b).

4.2.2. Metody založené na restrikčních endonukleázách (RFLP a PCR-RFLP)

MtDNA-RFLP byla dříve používána pro studium fylogenetických vztahů spíše než v epidemiologii dermatofyt (Mochizuki *et al.* 1990; Kawasaki *et al.* 1990.), přesto je několik studií založených na RFLP mtDNA, která se pro typizaci dermatofyt už několikrát osvědčila. Pomocí restrikční analýzy mtDNA se našla např. vnitrodruhová variabilita v rámci druhů rodu *Microsporum* a *E. floccosum* (Kawasaki *et al.* 1995; Kawasaki *et al.* 1996). Pomocí této techniky se také podařilo zjistit dva genotypy mezi izoláty *T. rubrum* (De Bievre *et al.* 1987, Nishio *et al.* 1992), výsledky ale neodpovídaly ani morfotypům, ani geografickému rozložení. Tato data byla později přezkoumána a bylo zjištěno, že jedna ze skupin *T. rubrum* jsou ve skutečnosti špatně identifikované izoláty *T. mentagrophytes*, a že populace *T. rubrum* je geneticky homogenní při analýze mtDNA RFLP (Gräser *et al.* 1999b). RFLP-PCR analýza NTS regionu rDNA *T. rubrum* se ukázala jako velmi užitečný nástroj při typizačních a epidemiologických studiích (Baeza *et al.* 2006). RFLP analýzou NTS regionu rDNA bylo rozlišeno 14 RFLP vzorců mezi izoláty *T. rubrum*. Studie ukázala, že RFLP analýza NTS a ITS oblastí rDNA je cenná technika pro typizaci izolátů *T. rubrum* (Jackson *et al.* 1999). Také variabilita kmenů *T. tonsurans*, *T. mentagrophytes* a *A. benhamiae* byla zjišťována pomocí PCR-RFLP analýzy NTS regionu. V rámci druhu *T. tonsurans* byly odhaleny tři genotypy způsobující epidemii u zápasníků v Japonsku a jedna linie, která se na této epidemii nepodílela (Mochizuki *et al.* 2007). Naopak RFLP analýza ITS oblasti neodhalila vnitrodruhovou variabilitu mezi fenotypově odlišnými kmeny *T. tonsurans* (Brilhante *et al.* 2006) a ukázala se také jako málo účinná v typizaci komplexu *T. mentagrophytes*. Úspěšnější byla RFLP analýza NTS regionu rDNA, která odhalila 23 různých RFLP vzorů mezi izoláty komplexu *T. mentagrophytes*? (Mochizuki *et al.* 2003a). Větší variabilita v NTS regionu mezi izoláty byla zjištěna u druhu *T. mentagrophytes* s. str. než u izolátů *T. interdigitale* (Mochizuki *et al.* 2003a). Obdobně bylo objeveno pět odlišných RFLP pattern u druhu *A. benhamiae* (Mochizuki *et al.* 2001). Abdel-Rahman *et al.* (2010) typizovali druh *T. tonsurans* pomocí analýzy 27 různých sekvenčních variant (především typu SNPs – jednonukletidové polymorfismy) v 13 různých genech kombinací několika metod, mezi nimiž byla také metoda PCR-RFLP. Výsledkem studie vzorků získaných ze 14 zemí světa bylo odhalení populační struktury *T. tonsurans* v Severní Americe, kde byly odhaleny významné genetické rozdíly mezi dvěma geograficky oddělenými populacemi v Mexiku a v USA. Tyto genotypy se téměř nevyskytovaly jinde ve světě na rozdíl od nejběžnějšího evropského genotypu, který byl běžný i v jiných částech světa (Abdel-Rahman *et al.* 2010). Od kmenů ze Severní Ameriky byly odvozeny klonální populace v Austrálii a Japonsku, jejich přenos zejména do Austrálie je časově nejasný (Donald 1959 podle

Abdel-Rahman *et al.* 2010). Vzhledem ke stupni genetické variability a geografické distribuci druhu *T. tonsurans* je autory studie předpokládána alopatická speciace (Abdel-Rahman *et al.* 2010).

4.2.3. Metody PCR fingerprintingu (kromě PCR-RFLP)

Molekulární metody, jako jsou např. RAPD, často nedokáží identifikovat ani výrazně odlišné vnitrodruhové populace. Někdy dokáží rozlišit alespoň variety některých druhů (Gräser *et al.* 1998; Liu *et al.* 1996, Mochizuki *et al.* 2009, Zhong *et al.* 1997). Metody jako AFLP, SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) a RAMD, které zatím byly zkoumány pouze v typizační analýze druhu *T. rubrum*, nejsou dostatečně citlivé a neodhalily žádnou vnitrodruhovou variabilitu (Gräser *et al.* 1999b), na rozdíl od metody PCR-RFLP, zacílené na oblast NTS regionu rDNA a analýzy mikrosatelitů (Gaedigk *et al.* 2003, Ohst *et al.* 2004).

Před výběrem vhodného primeru(ů) pro RAPD analýzu se zpravidla provádí počáteční pilotní studie s velkým množstvím primerů na menším počtu vzorků, a ze setu primerů jsou potom vybrány ty, které mají největší schopnost od sebe rozlišit jednotlivé kmeny. Kac *et al.* (2003) našel pouze jeden takový primer schopný od sebe rozlišit různé izoláty *T. mentagrophytes*. Obdobně Baeza a Mendes-Giannini (2004) našli dva primery schopné 12, respektive 11 různých genotypů mezi 67 kmeny *T. rubrum*.

Kac *et al.* (1999) vyšetřili 46 klinických izolátů *T. mentagrophytes* komplexu získaných od pacientů z různých zemí pomocí RAPD analýzy. Mezi kmeny našli 23 různých genotypů a rozdělili je do tří klastrů bez zjevné souvislosti s geografickým původem (Kac *et al.* 1999).

Vnitrodruhová variabilita mezi 33 klinickými izoláty *M. canis* byla detekována pomocí AP-PCR s primery OPI-07 a OPK-20 (Spesso *et al.* 2013). Výsledky studie ukazují, že detekce vnitrodruhových polymorfismů *M. canis* pomocí AP-PCR může být použita v budoucích molekulárně-epidemiologických studiích např. pro detekci ohnisek nebo k identifikaci původu kmene způsobujícího infekci (Yu *et al.* 2004, Spesso *et al.* 2013).

Metoda RAPD rozlišila pět různých podtypů *T. mentagrophytes* pomocí tří primerů (Kim *et al.* 2001). Použití prvního primeru (ATGs) ukázalo, že všechny kmeny *T. mentagrophytes* (dnešní *T. interdigitale*) vykazovaly identické vzory proužků s teleomorfou *A. vanbreuseghemii*. Druhým použitým primerem (ATG) se nepodařilo rozlišit kmeny *T. mentagrophytes* dle morfotypů kolonií, s výjimkou jednoho proužku v pattern navíc u práškové formy kolonie. Primer OPAO-15 odhalil velkou genetickou variabilitu zvířecích izolátů *T. mentagrophytes* na rozdíl od jednotného vzoru u lidských izolátů (Kim *et al.* 2001).

TRS oblasti *T. rubrum* byly použity ve dvou epidemiologických studiích. V první studii byly zkoumány kmeny *T. rubrum* izolované z případů onychomykóz a bylo zjištěno, že pacienti mohou být najednou infikovány i více kmeny *T. rubrum* (Yazdanparast *et al.* 2003). Ovšem mezi kmeny *T. rubrum* se objevovaly pouze tři charakteristické vzory (pattern) PCR proužků. Tato omezená

diverzita byla tehdy vykládána absencí sexuální rekombinace a dělá tuto analýzu nedostatečně citlivou pro některá epidemiologická šetření (Baeza *et al.* 2006). Ve druhé studii byla pomocí této metody pozorována významná míra variability citlivosti na antimykotika mezi genotypově odlišnými izoláty *T. rubrum* (de Assis Santos *et al.* 2007). Další studie, ve které byla úspěšně použita RAPD analýza NTS regionu rDNA, odhalila dva odlišné genotypy mezi japonskými a čínskými izoláty *T. rubrum*. Téměř všechny čínské izoláty (91%) patřily do jednoho klastru, zatímco izoláty z Japonska byly rozdělené mezi tento i druhý klastr. Převažovaly ovšem v druhém (70%) a vzhledem k tomu, že jde o dvě sousední země, jde o zajímavou informaci z hlediska šíření infekce (Yang *et al.* 2009).

4.3.4 Analýza mini a mikrosatelitů

Mikrosatelity jsou hypervariabilní DNA sekvence složené z motivů krátkých tandemových repetitiv (Tautz a Renz 1984), které se v genomech všech doposud studovaných eukaryotických organismů vyskytují s poměrně vysokou frekvencí (Li *et al.* 2002). Mikrosatelity mají mnohem vyšší mutační rychlost (10^{-2} - 10^{-5} na nukleotidový pár na generaci) oproti 10^{-9} rychlosti, která se uvádí pro bodové mutace v nekodujících lokusech jako je např. ITS oblast (Ohst *et al.* 2004). Tato proměnlivost vytváří vysokou vnitrodruhovou variabilitu (Henderson a Petes 1992). Mikrosatelity jsou z tohoto důvodu u hub, ale i v jiných říších organismů, používány především v populačních studiích (Gräser *et al.* 2006). Aplikace mikrosatelitních markerů na typizaci druhů ukazuje, že některé druhy antropofilních a zoofilních dermatofytů jsou teprve na začátku svého evolučního vývoje a obsahují malé množství polymorfismů (Gräser *et al.* 2006). Mikrosatelitní markery jsou velice vhodným nástrojem pro studium vztahů uvnitř populací i mezi nimi, zejména v případech, kdy máme o studovaných populacích ještě doplňující informace, jako například demografické údaje (DeYoung a Honeycutt 2005; Jame a Lagoda 1996). Typizace kmenů pomocí mikrosatelitních markerů probíhá stejně jako v metodě MLST mapováním celého úseku sekvence a sledováním genetické variability, avšak v tomto případě nejde o bodové mutace, ale o délku polymorfismů. Hypervariabilita mikrosatelitních lokusů může vytvářet alely, které mohou mít stejnou délku, ale mohou být odlišného původu (homoplázie). Také u mikrosatelitů bylo zjištěno, že mohou být polymorfní v jedné alele a monomorfní v jiných (Avisé 1994). Studie využívající mikrosatelitní markery ovšem naznačují, že problém homoplázie a monomorfismu může být překonán současným použitím mnoha mikrosatelitních lokusů (Gräser *et al.* 2007).

V rámci skupiny dermatofytů byla metoda mikrosatelitních markerů použita zejména u druhů často izolovaných z klinického materiálu (Tab. 3) např. u antropofilního *T. rubrum* (Ohst *et al.* 2004) a dvou zoofilních druhů s častým přenosem na člověka *M. canis* (Sharma *et al.* 2007) a *M. persicolor* (Sharma *et al.* 2008). Analýza mikrosatelitních markerů *T. rubrum* ukázala na dvě geograficky oddělené populace, z nichž jedna vykazuje celosvětovou distribuci s výjimkou afrického kontinentu a druhá se nachází pouze na africkém kontinentě (Gräser *et al.* 2007). Přestože z Afriky byl analyzován

menší počet vzorků, byla u těchto kmenů prokázána vyšší variabilita, což poukazuje na pravděpodobně africký původ druhu *T. rubrum* (Gräser *et al.* 2007). V roce 2004 byla uskutečněna na základě mikrosatelitního lokusu T1 studie, do které byl kromě druhu *T. rubrum* zahrnut i blízký příbuzný druh *T. violaceum* (Ohst *et al.* 2004). I přes velké rozdíly ve fenotypu obou skupin, byla metodou analýzy mikrosatelitů nalezena jejich blízká příbuznost, což naznačuje poměrně nedávnou speciaci (Ohst *et al.* 2004). Největší stupeň rozdílnosti v použitém diskriminačním markeru těchto dvou druhů a zároveň největší fenotypová variabilita *T. rubrum* byla nalezena na africkém kontinentě, což opět svědčí pro předpokládaný původ *T. rubrum* v Africe (Ohst *et al.* 2004). Dále je předpokládán pozdější přenos *T. rubrum* z Afriky do Asie, kde pandemicky expandoval a dal vznik novému genotypu (Ohst *et al.* 2004). Tento genotyp byl pravděpodobně několikrát nezávisle zanesen společně s původním genotypem do Ameriky a odtud se šířil pouze nově vzniklý genotyp do celé Evropy, kde vykazuje *T. rubrum* klonalitu (Ohst *et al.* 2004). Celý tento předpoklad stojí na myšlence vývoje nového genotypu *T. rubrum* v jihovýchodní Asii (Rippon 2004 podle Ohst *et al.* 2004) a opakovaným zanesením infekce do Ameriky (Kane *et al.* 1990), předpokládané dřívějšími publikacemi a podporované zjištěnými daty (Ohst *et al.* 2004).

Zatímco u druhů *T. rubrum* a *M. canis* byly sbírány kmeny z celého světa, u druhu *M. persicolor* byly získány vzorky pouze z oblasti centrální Indie, nemůžeme tedy o struktuře populace *M. persicolor* mnohé usuzovat. Omezením odběru pouze na jedinou lokalitu nám ale dává cenné informace o tamnější populační struktuře. Analýza mikrosatelitů ukázala, že *M. persicolor* je díky vysokému počtu nalezených genotypů v centrální Indii původním druhem (Sharma *et al.* 2008). Autoři dokládají svůj předpoklad na příkladu hub *Armillaria mellea* (Coetzee *et al.* 2001) a *Ceratocystis fimbriata* var. *platani* (Engelbrecht *et al.* 2004). *Armillaria mellea* byla na základě srovnání molekulárních dat mezi vzorky z různých míst na světě pravděpodobně v 17. století zavlečena z Evropy do Jižní Afriky. Tento fakt má dokládat zjištění, že zde byly na základě analýzy mikrosatelitů rozpoznány pouze klonální populace (Coetzee *et al.* 2001). Stejně tak druh *Ceratocystis fimbriata* var. *platani* byl zavlečen během 1. sv. války do severní Evropy, kde na základě analýzy mikrosatelitů vykazuje klonální populace (Engelbrecht *et al.* 2004).

Zatímco *M. persicolor* vykazuje v Indii silně rekombinující populaci a *T. rubrum* je naproti tomu celosvětově téměř klonálním druhem, populace druhu *M. canis* se skládá jak z klonálních tak rekombinujících subpopulací (Sharma *et al.* 2007). *Microsporium canis* je zoofilním druhem s častým přenosem na člověka, proto mezi zkoumanými kmeny byly nejen lidské izoláty, ale i izoláty ze zvířecích hostitelů jako jsou kočky, koně a psi (Sharma *et al.* 2007). Byly nalezeny tři genotypy *M. canis* s různým zastoupením zvířecích a lidských izolátů, které se lišily v míře vnitropopulační rekombinace. Jeden ze zjištěných genotypů se úspěšněji než ostatní dva přenášel na lidskou populaci a zahrnoval až 74% kmenů izolovaných z lidských infekcí (Sharma *et al.* 2007).

Tabulka 3. Mikrosatelitní markery použité k typizaci druhu *T. rubrum*, *M. canis* a *M. persicolor*.

	repetitivní element	Ta (C°) ¹	forward primer (5'-3')	reverse primer	
<i>T. rubrum</i>	CA ₁₅	60	GTAAGGATGGCTAGTTAGGGGG	TGGTCTGGCCTTGA CTGACC	Ohst <i>et al.</i> 2004
	T ₁₇	56-62	CCCATCGAGGTCATATACGC	ATTTTGGTTTCTTTTTTGAGTG	Gräser <i>et al.</i> 2007
	GA ₁₈ CA ₁₃	56-63	CTCCGTCGGTCCAGATG	CGCTGCTGGTAAGAGATGAC	
	GA ₁₇	56-64	CGTCGCTTGCTTTGGTACAC	TATGGACTTGTTCCGGATGGG	
	GA ₁₈	56-65	GACTCAACGGTTCCAGATTAC	CTTATTTGTCCGCTTCTCTCG	
	GA ₂₅	56-66	GCGATGGTTGGAGGAGTTG	GCCTGTCGCTGCTTACTTG	
	CT ₂₀	56-67	GCGGTGGCGTCTTCTATC	CAGCAGACAACATAGCAGTCG	
<i>M. canis</i>	GT ₁₃	60	GATCGGAGCATGCCATACAG	TCTTCCCACCCTTCTCAATG	Sharma <i>et al.</i> 2007
	GT ₁₇	60	GCTCTGGGATAAGGTGTTTG	GTAGCAGTAAAGCCAAGAGGG	
<i>M. persicolor</i>	CA ₂₃	64	TCGGCCTCCTCATCCTTC	TCGGGATGTAAGTGAAAGGG	Sharma <i>et al.</i> 2008
	CT ₁₇	58	GGGCAATTCTATGGGCAAG	CTTCTTCCAAGCTCTGCCTG	
	GA ₂₇	60	GGCTTGAGTGGCGTCTTC	AGCAAACGAACCGCTGAG	

¹teplota annealingu

5. Závěr:

Tato práce shrnuje úlohu molekulárních metod v diskriminaci dermatofyt na druhové a vnitrodruhové (populační) úrovni. Dále předkládá klíčové poznatky o druhovém konceptu dermatofyt, klade důraz na výhody a nevýhody jednotlivých přístupů, kriticky hodnotí v literatuře velmi diskutovaný koncept zohledňující hostitelskou specificitu, biologický koncept druhu a koncepty založené na molekulárních datech. V probíraných druhových konceptech nalézají velké množství nedostatků, pokud jsou aplikovány samostatně. Například z hlediska biologického konceptu považuje za problematické skupiny dermatofyt, u kterých se zatím nepodařilo navodit pohlavní proces a dále skupiny blízkých druhů, které ještě nemají zcela vytvořenou mezidruhovou reprodukční bariéru. Tato práce tedy zdůrazňuje potřebu aplikace polyfázického konceptu, který v sobě spojuje více přístupů.

V roce 1999 a 2000 byly provedeny nejméně čtyři klíčové studie, které významně snížily počet druhů a variant dermatofyt. Tyto studie byly provedené na základě molekulárních dat, zejména sekvenace oblasti ITS rDNA, která je doposud nejrozšířenějším způsobem identifikace druhů dermatofyt. Tyto studie však narazily na nedostatky, několik druhů bylo chybně synonymizováno. Je tedy jasné, že ITS oblast sama o sobě nepředstavuje marker schopný identifikovat všechny druhy dermatofyt. Některé markery jako například BT2 a TEF1 jsou při diskriminaci některých druhů citlivější než ITS region. Ostatní sekvenační markery byly aplikovány pouze u omezeného počtu druhů, u kterých nedosahovaly potenciálu ITS oblasti rDNA, ale jsou velmi užitečné jako nezávislé markery při aplikaci GCPSR konceptu.

Nejen sekvenace, ale také fingerprintové metody, se ukazují jako velmi užitečné při diskriminaci dermatofyt na druhové úrovni, avšak do budoucna se o nich uvažuje spíše jako o

diagnostických metodách, které by nahradily stávající nevyhovující systém založený na morfologicko-fyziologických testech. U některých skupin dermatofyt se však tyto metody ukazují jako citlivější, než jsou například metody sekvenační. Nezanedbatelnou výhodou těchto metod oproti sekvenování jsou i menší finanční náklady. Studie ukazují, že PCR-RFLP studie cílené například na gen DNA topoizomerázy II vykazují vysokou stabilitu, reprodukovatelnost a jsou schopny identifikovat téměř všechny druhy dermatofyt (Kamiya et al. 2004; Ganlin et al. 2005).

Mezi metodami, které se pokouší odhalit vnitrodruhovou variabilitu dermatofyt, se prosadila zejména metoda PCR-RFLP založená na NTS oblastech rDNA a metody analýzy mikrosatelitních markerů. Do budoucna se také počítá s MLST jako s metodou, která přináší největší množství dat a zároveň dobře interpretovatelných. Zatím pomocí této metody byl analyzován pouze zlomek dermatofyt z důvodu její vysoké finanční náročnosti.

Odhalení vnitrodruhové variability dermatofyt je klíčové zejména pro epidemiologické studie. Takovými jsou např. studie zjišťující profesní nákazy pracovníků se zvířaty. Ačkoli byl přenos infekce ze zvířat na lidi opakovaně prokázán (Drouot et al. 2009, Torres-Rodriguez et al. 1992, Van Rooij et al. 2006), je žádoucí potvrdit, zda pracovníci byli nakaženi stejným kmenem jako jejich zvířata. Z tohoto důvodu jsou vytvářena typizační schémata, která by odhalila populační strukturu druhů infikujících člověka, jejichž rezervoárem jsou zvířata. Jedny z takovýchto dermatofyt, jehož prevalence se zejména v Evropě zvyšuje, jsou druhy komplexu *T. mentagrophytes* (Korstanje a Staats 1994). Rezervoár izolátů těchto zoofilních druhů představují v případě *A. benhamiae* zejména morčata a v případě *A. vanbreuseghemii* lidi, myši a činčily a kočky, zejména evropská krátkosrstá kočka (Drouot et al. 2009). Variabilita zoofilních kmenů *T. mentagrophytes* komplexu byla zjišťována např. metodou PCR-RFLP zacílenou na NTS region rDNA (Mochizuki et al. 2001) nebo metodou sekvenace ITS regionu rDNA (Cafarchia et al. 2012; Symoens et al. 2013), která podpořila myšlenku, že nákazy pracovníků farem a jejich zvířat jsou zpravidla vyvolány stejným kmenem. Zatím však o struktuře jak místní, tak celosvětové populace těchto zoofilních druhů nemáme bližší informace.

Závěrem lze konstatovat, že výzkum v oblasti molekulárních metod cílených na dermatofyta se v posledních 10 letech zaměřuje především na diagnostické metody použitelné v klinické praxi. Proto zůstává celá řada nevyřešených otázek zejména z oblasti taxonomie a epidemiologie dermatofyt, kde jsou typizační schémata vytvořena jen pro zlomek klinicky významných druhů.

6. Zdroje

Abdel-Rahman, S. M., Sugita, T., González, G. M., Ellis, D., Arabatzis, M., Vella-Zahra, L., ... & Preuett, B. (2010). Divergence among an international population of *Trichophyton tonsurans* isolates. *Mycopathologia*, 169:1-13.

Avise, J. C. (1994). *Molecular markers: natural history and evolution*. New York: Chapman & Hall. 511 p.

- Avise, J. C., & Ball, R. M. (1990).** Principles of genealogical concordance in species concepts and biological taxonomy. *Oxf. Surv. Evol. Biol.*, 7:45-67.
- Ajello, L. (1968).** A taxonomic review of the dermatophytes and related species. *Med. Mycol.*, 6:147-159.
- Ajello, L., & Georg, L. K. (1957).** In vitro hair cultures for differentiating between atypical isolates of *Trichophyton mentagrophytes* and *Trichophyton rubrum*. *Mycopathologia*, 8:3-17.
- Anzawa, K., Kawasaki, M., Hironaga, M., & Mochizuki, T. (2011).** Genetic Relationship between *Trichophyton mentagrophytes* var. *interdigitale* and *Arthroderma vanbreuseghemii*. *Med. Mycol. J.*, 52:223-227.
- Anzawa, K., Kawasaki, M., Mochizuki, T., & Ishizaki, H. (2010).** Successful mating of *Trichophyton rubrum* with *Arthroderma simii*. *Med. Mycol.*, 48:629-634.
- Alsop, J., & Prior, A. P. (1961).** Ringworm infection in a cucumber greenhouse. *Brit. Med. J.*, 1:1081-1083.
- Baeza, L. C., & Mendes-Giannini, M. J. S. (2004).** Strain differentiation of *Trichophyton rubrum* by random amplification of polymorphic DNA (RAPD). *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*, 46:339-341.
- Baeza, L. C., Matsumoto, M. T., Almeida, A. M. F., & Mendes-Giannini, M. J. S. (2006).** Strain differentiation of *Trichophyton rubrum* by randomly amplified polymorphic DNA and analysis of rDNA nontranscribed spacer. *J. Clin. Microbiol.*, 55:429-436.
- Baldo, A., Monod, M., Mathy, A., Cambier, L., Bagut, E. T., Defaweux, V., ... & Mignon, B. (2011).** Mechanisms of skin adherence and invasion by dermatophytes. *Mycoses*, 55:218-223.
- Ballard, J. W. O., & Whitlock, M. C. (2004).** The incomplete natural history of mitochondria. *Mol. Ecol.*, 13:729-744.
- Bednář, M., Fraňková, V., Schindler, J., Souček, A., & Vávra, J. (1996).** Lékařská mikrobiologie. Praha: Marvil. 558p.
- Beckmann, J. S., & Soller, M. (1983).** Restriction fragment length polymorphisms in genetic improvement: methodologies, mapping and costs. *Theor. Appl. Genet.*, 67:35-43.
- Beguín, H., Goens, K., Hendrickx, M., Planard, C., Stubbe, D., & Detandt, M. (2012a).** Is *Trichophyton simii* endemic to the Indian subcontinent?. *Med. Mycol.*, 51:444-448.
- Beguín, H., Pyck, N., Hendrickx, M., Planard, C., Stubbe, D., & Detandt, M. (2012b).** The taxonomic status of *Trichophyton quinckeanum* and *T. interdigitale* revisited: a multigene phylogenetic approach. *Med. Mycol.*, 50:871-882.
- Behringer, M., Miller, W. G., & Oyarzabal, O. A. (2011).** Typing of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from live broilers and retail broiler meat by *flaA*-RFLP, MLST, PFGE and REP-PCR. *J. Microbiol. Meth.*, 84:194-201.
- Bensasson, D., Zhang, D. X., Hartl, D. L., & Hewitt, G. M. (2001).** Mitochondrial pseudogenes: evolution's misplaced witnesses. *Trends. Ecol. Evol.*, 16:314-321.
- Benson, D. A., Karsch-Mizrachi, I., Clark, K., Lipman, D. J., Ostell, J., & Sayers, E. W. (2012).** GenBank. *Nucleic. Acids. Res.*, 40:48-53.
- Bock, M., Maiwald, M., Kappe, R., Nickel, P., & Näher, H. (1994).** Polymerase chain reaction-based detection of dermatophyte DNA with a fungus-specific primer system. *Mycoses*, 37:79-84.
- Bowen, A. R., Chen-Wu, J. L., Momany, M., Young, R., Szaniszló, P. J., & Robbins, P. W. (1992).** Classification of fungal chitin synthases. *P. Natl. Acad. Sci.*, 89:519-523.

- Brilhante, R. S. N., Cordeiro, R. A., Gomes, J. M. F., Sidrim, J. J. C., & Rocha, M. F. G. (2006).** Canine dermatophytosis caused by an anthropophilic species: molecular and phenotypical characterization of *Trichophyton tonsurans*. *J. Clin. Microbiol.*, 55:1583-1586.
- Bruns, T. D., & Szaro, T. M. (1992a).** Rate and mode differences between nuclear and mitochondrial small-subunit rRNA genes in mushrooms. *Mol. Biol. Evol.*, 9:836-855.
- Bruns, T. D., Vilgalys, R., Barns, S. M., Gonzalez, D., Hibbett, D. S., Lane, D. J., ... & Sogin, M. L. (1992b).** Evolutionary relationships within the fungi: analyses of nuclear small subunit rRNA sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 1:231-241.
- Burmester, A., Shelest, E., Glöckner, G., Heddergott, C., Schindler, S., Staib, P., ... & Brakhage, A. A. (2011).** Comparative and functional genomics provide insights into the pathogenicity of dermatophytic fungi. *Genome. Biol.*, 12:1-7.
- Cafarchia, C., Weigl, S., Figueredo, L. A., & Otranto, D. (2012).** Molecular identification and phylogenesis of dermatophytes isolated from rabbit farms and rabbit farm workers. *Vet. Microbiol.*, 154:395-402.
- Chua, S. S., Momany, M., Mendoza, L., & Szaniszló, P. J. (1994).** Identification of three chitin synthase genes in the dimorphic fungal pathogen *Sporothrix schenckii*. *Curr. Microbiol.*, 29:151-156.
- Choi, Y. W., Hyde, K. D., & Ho, W. H. (1999).** Single spore isolation of fungi. *Fungal Divers.*, 3:29-38.
- Coetzee, M., Wingfield, B. D., Harrington, T. C., Steimel, J., Coutinho, T. A., & Wingfield, M. J. (2001).** The root rot fungus *Armillaria mellea* introduced into South Africa by early Dutch settlers. *Mol. Ecol.*, 10:387-396.
- Davison, F. D., Mackenzie, D. W. R., & Owen, R. J. (1980).** Deoxyribonucleic acid base compositions of dermatophytes. *J. Gen. Microbiol.*, 118:465-470.
- Davison, F. D., & Mackenzie, D. W. R. (1984).** DNA homology studies in the taxonomy of dermatophytes. *Med. Mycol.*, 22:117-123.
- Dawson, C. O., Gentles, J. C., & Brown, E. M. (1964).** Environmental conditions affecting sexual reproduction in species of *Arthroderma* and *Nannizzia*. *Med. Mycol.*, 3:245-250.
- De Assis Santos, D., de Carvalho Araújo, R. A., Kohler, L. M., Machado-Pinto, J., Hamdan, J. S., & Cisalpino, P. S. (2007).** Molecular typing and antifungal susceptibility of *Trichophyton rubrum* isolates from patients with onychomycosis pre-and post-treatment. *Int. J. Antimicrob. Ag.*, 29:563-569.
- De Bievre, C., Dauguet, C., Nguyen, V. H., & Ibrahim-Granet, O. (1987).** Polymorphism in mitochondrial DNA of several *Trichophyton rubrum* isolates from clinical specimens. *Ann. Inst. Pasteur. Mic.*, 138:719-727.
- Guarro, J., & De Hoog, G.S. (1995).** Atlas of clinical fungi. Baarn: Centraalbureau voor Schimmelcultures. 1126 p.
- Dettman, J. R., Jacobson, D. J., & Taylor, J. W. (2003).** A multilocus genealogical approach to phylogenetic species recognition in the model eukaryote *Neurospora*. *Evolution*, 57:2703-2720.
- Dettman, J. R., Jacobson, D. J., & Taylor, J. W. (2006).** Multilocus sequence data reveal extensive phylogenetic species diversity within the *Neurospora discreta* complex. *Mycologia*, 98:436-446.
- DeYoung, R. W., & Honeycutt, R. L. (2005).** The molecular toolbox: genetic techniques in wildlife ecology and management. *J. Wildlife. Manage.*, 69:1362-1384.

- *Donald, G. F. (1959). A warning on the frequency of endothrix tinea capitis among the aboriginal and part-aboriginal population of South Australia. *Med. J. Australia.*, 46:435-436.
- Dutta, S. K., Richman, N., Woodward, V. W., & Mandel, M. (1967). Relatedness among species of fungi and higher plants measured by DNA hybridization and base ratios. *Genetics*, 57:719-727.
- Dupuis, J. R., Roe, A. D., & Sperling, F. A. (2012). Multi-locus species delimitation in closely related animals and fungi: one marker is not enough. *Mol. Ecol.*, 21:4422-4436.
- Dyer, P. S., Ingram, D. S., & Johnstone, K. (1992). The control of sexual morphogenesis in the Ascomycotina. *Biol. Rev.*, 67:421-458.
- Faggi, E., Pini, G., & Campisi, E. (2002). PCR fingerprinting for identification of common species of dermatophytes. *J. Clin. Microbiol.*, 40:4804-4805.
- Faggi, E., Pini, G., Campisi, E., Bertellini, C., Difonzo, E., & Mancianti, F. (2001). Application of PCR to distinguish common species of dermatophytes. *J. Clin. Microbiol.*, 39:3382-3385
- Farnoodian, M., Yazdanparast, S. A., & Sadri, M. F. (2009). Effects of environmental factors and selected antifungal agents on arthroconidia production in common species of *Trichophyton* genus and *Epidermophyton floccosum*. *J. Biol. Sci.*, 9:561-566.
- Fares, M. A., & Wolfe, K. (2003). Evidence from comparative genomics for a complete sexual cycle in the "asexual" pathogenic yeast *Candida glabrata*. *Genome. Biol.*, 4:1-10.
- Fenchel, T. (2005). Cosmopolitan microbes and their cryptic' species. *Aquat. Microb. Ecol.*, 41:49-54.
- Fréalte, E., Rodrigue, M., Gantois, N., Aliouat, C. M., Delaporte, E., Camus, D., ... & Delhaes, L. (2007). Phylogenetic analysis of *Trichophyton mentagrophytes* human and animal isolates based on MnSOD and ITS sequence comparison. *Microbiology*, 153:3466-3477.
- El-Fari, M., & Gräser, Y. (2000). An epidemic of tinea corporis caused by *Trichophyton tonsurans* among children (wrestlers) in Germany. *Mycoses*, 43:191-196.
- Emmons, C. W. (1934). Dermatophytes: Natural grouping based on the form of the spores and accessory organs. *Arch. Dermatol.*, 30:337-362.
- Engelbrecht, C. J. B., Harrington, T. C., Steimel, J., & Capretti, P. (2004). Genetic variation in eastern North American and putatively introduced populations of *Ceratocystis fimbriata* f. *platani*. *Mol. Ecol.*, 13:2995-3005.
- Gaedigk, A., Gaedigk, R., & Abdel-Rahman, S. M. (2003). Genetic heterogeneity in the rRNA gene locus of *Trichophyton tonsurans*. *J. Clin. Microbiol.*, 41:5478-5487.
- Ganlin, H., Jiawen, L., Juan, D., & Zhijan, T. (2005). Identification of common species of dermatophytes by PCR-RFLP. *J. Huazhong Univ. Sci.*, 25:458-460.
- Gräser, Y., De Hoog, G. S., & Kuijpers, A. F. A. (2000a). Recent advances in the molecular taxonomy of dermatophytes. In: Kushwaha, R. K. S., Guarro, J. (eds.). *Biology of dermatophytes and other keratinophilic fungi*. Revista Iberoamericana de Micología, Bilbao: 17–21.
- Gräser, Y., De Hoog, S., & Summerbell, R. C. (2006). Dermatophytes: recognizing species of clonal fungi. *Med. Mycol.*, 44:199-209.
- Gräser, Y., El-Fari, M., Presber, W., Sterry, W., & Tietz, H. J. (1998). Identification of common dermatophytes (*Trichophyton*, *Microsporum*, *Epidermophyton*) using polymerase chain reactions. *Brit. J. Dermatol.*, 138:576-582.

- Gräser, Y., El-Fari, M., Presber, W., Kuijpers, A. F. A., & Hoog, G. D. (2000c).** Molecular and conventional taxonomy of the *Microsporum canis* complex. *Med. Mycol.*, 38:143-153.
- Gräser, Y., El-Fari, M., Vilgalys, R., Kuijpers, A. F. A., De Hoog, G. S., Presber, W., & Tietz, H. J. (1999a).** Phylogeny and taxonomy of the family Arthrodermataceae (dermatophytes) using sequence analysis of the ribosomal ITS region. *Med. Mycol.*, 37:105-114.
- Gräser, Y., Fröhlich, J., Presber, W., & De Hoog, S. (2007).** Microsatellite markers reveal geographic population differentiation in *Trichophyton rubrum*. *J. Clin. Microbiol.*, 56:1058-1065.
- Gräser, Y., Kühnisch, J., & Presber, W. (1999b).** Molecular markers reveal exclusively clonal reproduction in *Trichophyton rubrum*. *J. Clin. Microbiol.*, 37:3713-3717.
- Gräser, Y., Kuijpers, A. F. A., Presber, W., & De Hoog, G. S. (1999c).** Molecular taxonomy of *Trichophyton mentagrophytes* and *T. tonsurans*. *Med. Mycol.*, 37:315-330.
- Gräser, Y., Kuijpers, A. F. A., Presber, W., & De Hoog, G. S. (2000b).** Molecular taxonomy of the *Trichophyton rubrum* complex. *J. Clin. Microbiol.*, 38:3329-3336.
- Gräser, Y., Scott, J., & Summerbell, R. (2008).** The new species concept in dermatophytes—a polyphasic approach. *Mycopathologia*, 166:239-256.
- Georg, L. K. (1960).** Epidemiology of the dermatophytoses sources of infection, modes of transmission and epidemicity. *Ann. NY. Acad. Sci.*, 89:69-77.
- Georg, L. K., & Camp, L. B. (1957).** Routine nutritional tests for the identification of dermatophytes. *J. Bacteriol.*, 74:113-121.
- Giraud, T., Refrégier, G., Le Gac, M., de Vienne, D. M., & Hood, M. E. (2008).** Speciation in fungi. *Fungal Genet. Biol.*, 45:791-802.
- Gokulshankar, S., Ranjithsingh, A. J. A., Ranjith, M. S., Ranganathan, S., & Palaniappan, R. (2005).** Role of *Chrysosporium keratinophilum* in the parasitic evolution of dermatophytes. *Mycoses*, 48:442-446.
- Gupta, S., Mishra, A., & Gupta, A. K. (2012).** Isolation and Identification of Keratinophilic Fungi from Soil of Gwalior Region and their Control by Methanolic Plant Extracts. *J. Biomed. Pharma. Res.*, 1:1-21.
- Gupta, A. K., Kohli, Y., & Summerbell, R. C. (2001).** Variation in Restriction Fragment Length Polymorphisms among Serial Isolates from Patients with *Trichophyton rubrum* Infection. *J. Clin. Microbiol.*, 39:3260-3266.
- Gutzmer, R., Mommert, S., Küttler, U., Werfel, T., & Kapp, A. (2004).** Rapid identification and differentiation of fungal DNA in dermatological specimens by LightCycler PCR. *J. Med. Microbiol.*, 53:1207-1214.
- Harmsen, D., Schwinn, A, Weig, M, Bröcker, EB, & Heesemann, J (1995)** Phylogeny and dating of some pathogenic keratinophilic fungi using small subunit ribosomal RNA. *Med. Mycol.*, 33:299–303.
- Heidemann, S., Monod, M., & Gräser, Y. (2010).** Signature polymorphisms in the internal transcribed spacer region relevant for the differentiation of zoophilic and anthropophilic strains of *Trichophyton interdigitale* and other species of *T. mentagrophytes sensu lato*. *Brit. J. Dermatol.*, 162:282-295.
- Henderson, S. T., & Petes, T. D. (1992).** Instability of simple sequence DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.*, 12:2749-2757.
- Hennig, W. (1965).** Phylogenetic systematics. *Annu. Rev. Entomol.*, 10:97-116.

- Hirai, A., Kano, R., Nakamura, Y., Watanabe, S., & Hasegawa, A. (2003).** Molecular taxonomy of dermatophytes and related fungi by chitin synthase 1 (CHS1) gene sequences. *Anton. Leeuw.*, 83:11-20.
- Hayashi, N., & Takashio, M. (1984).** Mating type of *Trichophyton tonsurans*. *Mycoses*, 27:377-379.
- Iwen, P. C., Hinrichs, S. H., & Rupp, M. E. (2002).** Utilization of the internal transcribed spacer regions as molecular targets to detect and identify human fungal pathogens. *Med. Mycol.*, 40:87-109.
- Jackson, C. J., Barton, R. C., & Evans, E. G. V. (1999).** Species identification and strain differentiation of dermatophyte fungi by analysis of ribosomal-DNA intergenic spacer regions. *J. Clin. Microbiol.*, 37:931-936.
- Jackson, C. J., Barton, R. C., Kelly, S. L., & Evans, E. G. V. (2000).** Strain identification of *Trichophyton rubrum* by specific amplification of subrepeat elements in the ribosomal DNA nontranscribed spacer. *J. Clin. Microbiol.*, 38:4527-4534.
- Kamiya, A., Kikuchi, A., Tomita, Y., & Kanbe, T. (2004).** PCR and PCR-RFLP techniques targeting the DNA topoisomerase II gene for rapid clinical diagnosis of the etiologic agent of dermatophytosis. *J. Dermatol. Sci.*, 34:35-48.
- Kac, G., Bougnoux, M. E., Feuilhade De Chauvin, M., Sene, S., & Derouin, F. (1999).** Genetic diversity among *Trichophyton mentagrophytes* isolates using random amplified polymorphic DNA method. *Brit. J. Dermatol.*, 140:839-844.
- Kac, G. (2000).** Molecular approaches to the study of dermatophytes. *Med. Mycol.*, 38:329-336
- Kac, G., Bougnoux, M. E., Feuilhade De Chauvin, M., Sene, S., & Derouin, F. (2003).** Genetic diversity among *Trichophyton mentagrophytes* isolates using random amplified polymorphic DNA method. *Brit. J. Dermatol.*, 140:839-844.
- Kanbe, T. (2008).** Molecular approaches in the diagnosis of dermatophytosis. *Mycopathologia*, 166:307-317.
- Kanbe, T., Suzuki, Y., Kamiya, A., Mochizuki, T., Fujihira, M., & Kikuchi, A. (2003a).** PCR-based identification of common dermatophyte species using primer sets specific for the DNA topoisomerase II genes. *J. Dermatol. Sci.*, 32:151-161.
- Kanbe, T., Suzuki, Y., Kamiya, A., Mochizuki, T., Kawasaki, M., Fujihira, M., & Kikuchi, A. (2003b).** Species-identification of dermatophytes *Trichophyton*, *Microsporum* and *Epidermophyton* by PCR and PCR-RFLP targeting of the DNA topoisomerase II genes. *J. Dermatol. Sci.*, 33:41-54.
- Kane, J., Krajdén, S., Summerbell, R. C., & Sibbald, R. G. (1990).** Infections caused by *Trichophyton raubitschekii*: clinical and epidemiological features. *Mycoses*, 33:499-506.
- Kane, J., Summerbell, R., Sigler, L., Krajdén, S., & Land, G. (1997).** Laboratory handbook of dermatophytes: a clinical guide and laboratory handbook of dermatophytes and other filamentous fungi from skin, hair, and nails. Belmont: Star Publishing, 344 p.
- Kano, R. (2011a).** Classification of dermatophytes by mating type (MAT) gene analysis. *Med. Mycol. J.*, 53:175-178.
- Kano, R., Hirai, A., & Hasegawa, A. (2002).** Chitin synthase 1 gene of *Arthroderma benhamiae* isolates in Japan. *Mycoses*, 45:277-281.
- Kano, R., Kawasaki, M., Mochizuki, T., Hiruma, M., & Hasegawa, A. (2012).** Mating genes of the *Trichophyton mentagrophytes* complex. *Mycopathologia*, 173:103-112.

- Kano, R., Nakamura, Y., Watari, T., Watanabe, S., Takahashi, H., Tsujimoto, H., & Hasegawa, A. (1997).** Phylogenetic analysis of 8 dermatophyte species using chitin synthase 1 gene sequences. *Mycoses*, 40:411-414.
- Kano, R., Nakamura, Y., Watari, T., Watanabe, S., Takahashi, H., Tsujimoto, H., & Hasegawa, A. (1998).** Molecular analysis of chitin synthase 1 (CHS1) gene sequences of *Trichophyton mentagrophytes* complex and *T. rubrum*. *Curr. Microbiol.*, 37:236-239.
- Kano, R., Okabayashi, K., Nakamura, Y., Ooka, S., Kashima, M., Mizoguchi, M., ... & Hasegawa, A. (2000).** Differences among chitin synthase 1 gene sequences in *Trichophyton rubrum* and *T. violaceum*. *Med. Mycol.*, 38:47-50.
- Kano, R., Sano, A., Makimura, K., Watanabe, S., Nishimura, K., Yamaguchi, H., & Hasegawa, A. (2008).** A new genotype of *Arthroderma benhamiae*. *Med. Mycol.*, 46:739-744.
- Kano, R., Yamada, T., Makimura, K., Kawasaki, M., Mochizuki, T., Kamata, H., & Hasegawa, A. (2011b).** *Arthroderma benhamiae* (The Teleomorph of *Trichophyton mentagrophytes*) mating type-specific genes. *Mycopathologia*, 171:333-337.
- Kardjeva, V., Summerbell, R., Kantardjiev, T., Devliotou-Panagiotidou, D., Sotiriou, E., & Gräser, Y. (2006).** Forty-eight-hour diagnosis of onychomycosis with subtyping of *Trichophyton rubrum* strains. *J. Clin. Microbiol.*, 44:1419-1427.
- Kaszubiak, A., Klein, S., De Hoog, G. S., & Gräser, Y. (2004).** Population structure and evolutionary origins of *Microsporum canis*, *M. ferrugineum* and *M. audouinii*. *Infect. Genet. Evol.*, 4:179-186.
- Kawasaki, M. (2011a).** Verification of a Taxonomy of Dermatophytes Based on Mating Results and Phylogenetic Analyses. *Med. Mycol. J.*, 52:291-295.
- Kawasaki, M., Anzawa, K., Ushigami, T., Kawanishi, J., & Mochizuki, T. (2011b).** Multiple gene analyses are necessary to understand accurate phylogenetic relationships among *Trichophyton* species. *Med. Mycol. J.*, 52:245-254.
- Kawasaki, M., Anzawa, K., Wakasa, A., Takeda, K., Mochizuki, T., Ishizaki, H., & Hemashettar, B. (2010).** Matings among three teleomorphs of *Trichophyton mentagrophytes*. *Jpn. J. Med. Mycol.*, 51:143-152.
- Kawasaki, M., Anzawa, K., Wakasa, A., Takeda, K., Tanabe, H., Mochizuki, T., ... & M. Hemashettar, B. (2008).** Different genes can result in different phylogenetic relationships in *Trichophyton* species. *Jpn. J. Med. Mycol.*, 49:311-318.
- Kawasaki, M., Aoki, M., & Ishizaki, H. (1995).** Phylogenetic relationships of some *Microsporum* and *Arthroderma* species inferred from mitochondrial DNA analysis. *Mycopathologia*, 130:11-21.
- Kawasaki, M., Aoki, M., Ishizaki, H., Nishimura, K., & Miyaji, M. (1996).** Phylogeny of *Epidermophyton floccosum* and other dermatophytes. *Mycopathologia*, 134:121-128.
- Kawasaki, M., Aoki, M., Ishizaki, H., Nishio, K., Mochizuki, T., & Watanabe, S. (1992).** Phylogenetic relationships of the genera *Arthroderma* and *Nannizzia* inferred from mitochondrial DNA analysis. *Mycopathologia*, 118:95-102.
- Kawasaki, M., Inoue, T., Ohsawa, T., Ishioka, S., Mochizuki, T., & Ishizaki, H. (2002).** Two *Arthroderma benhamiae* isolates showing mitochondrial DNA type of *Trichophyton verrucosum*. *Jpn. J. Med. Mycol.*, 43:103-106.

- Kawasaki, M., Ishizaki, H., Aoki, M., & Watanabe, S. (1990).** Phylogeny of *Nannizzia incurvata*, *N. gypsea*, *N. fulva* and *N. otae* by restriction enzyme analysis of mitochondrial DNA. *Mycopathologia*, 112:173-177.
- Kim, J. Y., Choe, Y. B., Ahn, K. J., & Lee, Y. W. (2011).** Identification of dermatophytes using multiplex polymerase chain reaction. *Ann. Dermatol.*, 23:304-312.
- Kim, J. A., Takahashi, Y., Tanaka, R., Fukushima, K., Nishimura, K., & Miyaji, M. (2001).** Identification and subtyping of *Trichophyton mentagrophytes* by random amplified polymorphic DNA. *Mycoses*, 44:157-165.
- Kim, J. A., Takizawa, K., Fukushima, K., Nishimura, K., & Miyaji, M. (1999).** Identification and genetic homogeneity of *Trichophyton tonsurans* isolated from several regions by random amplified polymorphic DNA. *Mycopathologia*, 145:1-6.
- Korstanje, M. J., & Staats, C. C. (1994).** Tinea capitis in Northwestern Europe 1963–1993: etiologic agents and their changing prevalence. *Int. J. Dermatol.*, 33:548-549.
- Larone, D. H. (2002).** Medically important fungi: a guide to identification. Washington, DC: ASM press. 274 p.
- Leclerc, M. C., Philippe, H., & Gueho, E. (1994).** Phylogeny of dermatophytes and dimorphic fungi based on large subunit ribosomal RNA sequence comparisons. *Med. Mycol.*, 32:331-341.
- Li, Y. C., Korol, A. B., Fahima, T., Beiles, A., & Nevo, E. (2002).** Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. *Mol. Ecol.*, 11:2453-2465.
- Li, H. C., Bouchara, J. P., Hsu, M. M. L., Barton, R., Su, S., & Chang, T. C. (2008).** Identification of dermatophytes by sequence analysis of the rRNA gene internal transcribed spacer regions. *J. Clin. Microbiol.*, 57:592-600.
- Li, W., Metin, B., White, T. C., & Heitman, J. (2010).** Organization and evolutionary trajectory of the mating type (MAT) locus in dermatophyte and dimorphic fungal pathogens. *Eukaryot. Cell*, 9:46-58.
- Liu, D., Coloe, S., Baird, R., & Pedersen, J. (1997).** Molecular determination of dermatophyte fungi using the arbitrarily primed polymerase chain reaction. *Brit. J. Dermatol.*, 137:351-355.
- Liu, D., Coloe, S., Baird, R., & Pedersen, J. (2000).** Application of PCR to the identification of dermatophyte fungi. *J. Clin. Microbiol.*, 49:493-497.
- Liu, D., Coloe, S., Pedersen, J., & Baird, R. (1996).** Use of arbitrarily primed polymerase chain reaction to differentiate *Trichophyton dermatophytes*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 136:147-150.
- Loeffler, J., Hebart, H., Bialek, R., Hagemeyer, L., Schmidt, D., Serey, F. P., ... & Einsele, H. (1999).** Contaminations occurring in fungal PCR assays. *J. Clin. Microbiol.*, 37:1200-1202.
- Lott, T. J., Kuykendall, R. J., & Reiss, E. (1993).** Nucleotide sequence analysis of the 5,8S rDNA and adjacent ITS2 region of *Candida albicans* and related species. *Yeast*, 9:1199-1206.
- Maiden, M. C., Bygraves, J. A., Feil, E., Morelli, G., Russell, J. E., Urwin, R., ... & Spratt, B. G. (1998).** Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *P. Natl. Acad. Sci.*, 95:3140-3145.
- Makimura, K., Mochizuki, T., Hasegawa, A., Uchida, K., Saito, H., & Yamaguchi, H. (1998).** Phylogenetic classification of *Trichophyton mentagrophytes* complex strains based on DNA sequences of nuclear ribosomal internal transcribed spacer 1 regions. *J. Clin. Microbiol.*, 36:2629-2633.

- Makimura, K., Tamura, Y., Mochizuki, T., Hasegawa, A., Tajiri, Y., Hanazawa, R., ... & Yamaguchi, H. (1999).** Phylogenetic classification and species identification of dermatophyte strains based on DNA sequences of nuclear ribosomal internal transcribed spacer 1 regions. *J. Clin. Microbiol.*, 37:920-924.
- Mallet, J. (2007).** Hybrid speciation. *Nature*, 446:279-283.
- Mayden, R. L. (1997).** A hierarchy of species concepts: the denouement in the saga of the species problem. In: Claridge, M.F., Dawah, H.A., Wilson, M.R. (eds.) *Species: the Units of Biodiversity*, London, Chapman & Hall: 381-324
- McDonald, B. A. (1997).** The population genetics of fungi: tools and techniques. *Phytopathology*, 87:448-453.
- Mitchell, J. I., & Zuccaro, A. (2006).** Sequences, the environment and fungi. *Mycologist*, 20:62-74.
- Mirhendi, H. (2012).** Discrimination of *Trichophyton tonsurans* and *Trichophyton equinum* by PCR-RFLP and by β -tubulin and Translation Elongation Factor 1- α sequencing. *Med. Mycol.*, 50:760-764.
- Mishler, B. D., & Donoghue, M. J. (1982).** Species concepts: a case for pluralism. *Syst. Zool.*, 31:491-503.
- Mochizuki, T., Ishizaki, H., Barton, R. C., Moore, M. K., Jackson, C. J., Kelly, S. L., & Evans, E. G. V. (2003a).** Restriction fragment length polymorphism analysis of ribosomal DNA intergenic regions is useful for differentiating strains of *Trichophyton mentagrophytes*. *J. Clin. Microbiol.*, 41:4583-4588.
- Mochizuki, T., Kawasaki, M., Ishizaki, H., Kano, R., Hasegawa, A., Tosaki, H., & Fujihira, M. (2001).** Molecular epidemiology of *Arthroderma benhamiae*, an emerging pathogen of dermatophytoses in Japan, by polymorphisms of the non-transcribed spacer region of the ribosomal DNA. *J. Dermatol. Sci.*, 27:14-20
- Mochizuki, T., Kawasaki, M., Ishizaki, H., & Makimura, K. (1999).** Identification of several clinical isolates of dermatophytes based on the nucleotide sequence of internal transcribed spacer 1 (ITS 1) in nuclear ribosomal DNA. *J. Dermatol.*, 26:276-281.
- Mochizuki, T., Kawasaki, M., Tanabe, H., Anzawa, K., Ishizaki, H., & Choi, J. S. (2007).** Molecular epidemiology of *Trichophyton tonsurans* isolated in Japan using RFLP analysis of non-transcribed spacer regions of ribosomal RNA genes. *Jpn. J. Infect. Dis.*, 60:188-192.
- Mochizuki, T., Sugie, N., & Uehara, M. (1997).** Random amplification of polymorphic DNA is useful for the differentiation of several anthropophilic dermatophytes. *Mycoses*, 40:405-409.
- Mochizuki, T., Tanabe, H., Kawasaki, M., Ishizaki, H., & Jackson, C. J. (2003b).** Rapid identification of *Trichophyton tonsurans* by PCR-RFLP analysis of ribosomal DNA regions. *J. Dermatol. Sci.*, 32:25-32.
- Mochizuki, T., Takada, K., Watanabe, S., Kawasaki, M., & Ishizaki, H. (1990).** Taxonomy of *Trichophyton interdigitale* (*Trichophyton mentagrophytes* var. *interdigitale*) by restriction enzyme analysis of mitochondrial DNA. *Med. Mycol.*, 28:191-196
- Mügge, C., Hausteiner, U. F., & Nienhoff, P. (2006).** Causative agents of onychomycosis — a retrospective study. *J. Dtsch. Dermatol. Ges.*, 4:218-228.
- Munthali, M., Ford-Lloyd, B. V., & Newbury, H. J. (1992).** The random amplification of polymorphic DNA for fingerprinting plants. *Genome Res.*, 1:274-276.
- Nagao, K., Sugita, T., Ouchi, T., & Nishikawa, T. (2005).** Identification of *Trichophyton rubrum* by nested PCR analysis from paraffin embedded specimen in trichophytia profunda acuta of the glabrous skin. *Jpn. J. Med. Mycol.*, 46:129-132.

- Nenoff, P., Herrmann, J., & Gräser, Y. (2007).** *Trichophyton mentagrophytes* sive interdigitale? A dermatophyte in the course of time. *J. Dtsch. Dermatol. Ges.*, 5:198-202.
- Nishio, K., Kawasaki, M., & Ishizaki, H. (1992).** Phylogeny of the genera *Trichophyton* using mitochondrial DNA analysis. *Mycopathologia*, 117:127-132.
- O’Gorman, C. M., Fuller, H. T., & Dyer, P. S. (2008).** Discovery of a sexual cycle in the opportunistic fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Nature*, 457:471-474.
- Ohst, T., De Hoog, S., Presber, W., Stavrakieva, V., & Gräser, Y. (2004).** Origins of microsatellite diversity in the *Trichophyton rubrum*-*T. violaceum* clade (dermatophytes). *J. Clin. Microbiol.*, 42:4444-4448.
- Okeke, C. N., Tsuboi, R., Kawai, M., Hiruma, M., & Ogawa, H. (2001).** Isolation of an intron-containing partial sequence of the gene encoding dermatophyte actin (ACT) and detection of a fragment of the transcript by reverse transcription-nested PCR as a means of assessing the viability of dermatophytes in skin scales. *J. Clin. Microbiol.*, 39:101-106.
- Olsen, G. J., Lane, D. J., Giovannoni, S. J., Pace, N. R., & Stahl, D. A. (1986).** Microbial ecology and evolution: a ribosomal RNA approach. *Annu. Rev. Microbiol.*, 40:337-365
- Padhye, A. A., Sekhon, A. S., & Carmichael, J. W. (1973).** Ascocarp production by *Nannizzia* and *Arthroderma* on keratinous and non-keratinous media. *Med. Mycol.*, 11:109-114.
- Paquin, B., Laforest, M. J., Forget, L., Roewer, I., Wang, Z., Longcore, J., & Lang, B. F. (1997).** The fungal mitochondrial genome project: evolution of fungal mitochondrial genomes and their gene expression. *Curr. Genet.*, 31:380-395.
- Philpot, C. (1967).** The differentiation of *Trichophyton mentagrophytes* from *T. rubrum* by a simple urease test. *Med. Mycol.*, 5:189-193.
- Probst, S., De Hoog, G. S., & Gräser, Y. (2002).** Development of DNA markers to explore host shifts in dermatophytes. *Stud. Mycol.*, 1:57-74.
- Rashid, A. (2001).** Arthroconidia as vectors of dermatophytosis. *Cutis*, 67:23-23.
- Rehner, S. A., & Buckley, E. (2005).** A *Beauveria* phylogeny inferred from nuclear ITS and EF1- α sequences: evidence for cryptic diversification and links to *Cordyceps* teleomorphs. *Mycologia*, 97:84-98.
- Rezaei-Matehkolaei, A., Makimura, K., De Hoog, G. S., Shidfar, M. R., Satoh, K., Najafzadeh, M. J., & Mirhendi, H. (2012a).** Discrimination of *Trichophyton tonsurans* and *Trichophyton equinum* by PCR-RFLP and by β -tubulin and Translation Elongation Factor 1- α sequencing. *Med. Mycol.*, 50:760-764.
- Rezaei-Matehkolaei, A., Makimura, K., De Hoog, G. S., Shidfar, M. R., Satoh, K., Najafzadeh, M. J., & Mirhendi, H. (2012b).** Multilocus differentiation of the related dermatophytes *Microsporum canis*, *Microsporum ferrugineum* and *Microsporum audouinii*. *J. Clin. Microbiol.*, 61:57-63.
- Robles, J. C., Koreen, L., Park, S., & Perlin, D. S. (2004).** Multilocus sequence typing is a reliable alternative method to DNA fingerprinting for discriminating among strains of *Candida albicans*. *J. Clin. Microbiol.*, 42:2480-2488.
- Roque, H. D., Vieira, R., Rato, S., & Luz-Martins, M. (2006).** Specific primers for rapid detection of *Microsporum audouinii* by PCR in clinical samples. *J. Clin. Microbiol.*, 44:4336-4341.
- *Sabouraud, R. J. A. (1910).** *Maladies du cuir chevelu; II Les maladies desquamatives.* Paris: Masson et Cie. 715 p.

- Savolainen, V., Cowan, R. S., Vogler, A. P., Roderick, G. K., & Lane, R. (2005).** Towards writing the encyclopaedia of life: an introduction to DNA barcoding. *Philos. T. R. Soc. B.*, 360:1805-1811.
- Shadomy, H. J., & Philpot, C. M. (1980).** Utilization of standard laboratory methods in the laboratory diagnosis of problem dermatophytes. *Am. J. Clin. Pathol.*, 74:197-201.
- Sharma, R., De Hoog, S., Presber, W., & Gräser, Y. (2007).** A virulent genotype of *Microsporium canis* is responsible for the majority of human infections. *J. Clin. Microbiol.*, 56:1377-1385.
- Sharma, R., Presber, W., Rajak, R. C., & Gräser, Y. (2008).** Molecular detection of *Microsporium persicolor* in soil suggesting widespread dispersal in central India. *Med. Mycol.*, 46:67-73.
- Shehata, A. S., Mukherjee, P. K., Aboulatta, H. N., El Akhras, A. I., Abbadi, S. H., & Ghannoum, M. A. (2008).** Single-step PCR using (GACA) 4 primer: utility for rapid identification of dermatophyte species and strains. *J. Clin. Microbiol.*, 46:2641-2645.
- Simpunya, M. F. (2000).** Dermatophytes: their taxonomy, ecology and pathogenicity. – In: Kushwara, R. K. S., Guarro, J. (eds.), *Biology of dermatophytes and other keratinophilic fungi*, Bilbao, Revista Iberoamericana de Micología: 1-12.
- Spesso, M. F., Nuncira, C. T., Burstein, V. L., Masih, D. T., Dib, M. D., & Chiapello, L. S. (2013).** Microsatellite-primed PCR and random primer amplification polymorphic DNA for the identification and epidemiology of dermatophytes. *European J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 1:1-7
- Storck, R., & Alexopoulos, C. J. (1970).** Deoxyribonucleic acid of fungi. *Bacterial. Rev.*, 34:126-154.
- Stockdale, P. M. (1968).** Sexual stimulation between *Arthroderma simii* Stockd., Mackenzie & Austwick and related species. *Med. Mycol.*, 6:176-181.
- Summerbell, R. C. (2000).** Form and function in the evolution of dermatophytes. – In R. K. S. Kushwaha and J. Guarro (ed.), *Biology of dermatophytes and other keratinophilic fungi*, Revista Iberoamericana de Micología, Bilbao, Spain: 30-43
- Summerbell, R. C. (2002).** What is the evolutionary and taxonomic status of asexual lineages in the dermatophytes? *Stud. Mycol.*, 42:97-102.
- Summerbell, R. C., Moore, M. K., Starink-Willemse, M., & Van Iperen, A. (2007).** ITS barcodes for *Trichophyton tonsurans* and *T. equinum*. *Med. Mycol.*, 45:193-200.
- Summerbell, R. C., Li, A., & Haugland, R. (1997).** What constitutes a functional species in the asexual dermatophytes? *Microb. Cult. Coll.*, 13:29-37.
- Symoens, F., Jousson, O., Packeu, A., Fratti, M., Staib, P., Mignon, B., & Monod, M. (2013).** The dermatophyte species *Arthroderma benhamiae*: intraspecies variability and mating behaviour. *J. Clin. Microbiol.*, 62:377-385.
- Symoens, F., Jousson, O., Planard, C., Fratti, M., Staib, P., Mignon, B., & Monod, M. (2011).** Molecular analysis and mating behaviour of the *Trichophyton mentagrophytes* species complex. *International J. Clin. Microbiol.*, 301:260-266.
- Takashio, M. (1972).** Sexual reproduction of some *Arthroderma* and *Nannizzia* on diluted Sabouraud agar with or without salts¹). *Mycoses*, 15:11-17.
- Takashio, M. (1973).** Study of the reproduction phenomena related to senescence and rejuvenation of fungus cultures. *Ann. Soc. Belg. Med. Tr.*, 53:429-580.

- Takashio, M. (1974).** Observations on African and European strains of *Arthroderma benhamiae*. *Int. J. Dermatol.*, 13:94-101.
- Takashio, M. (1979).** Taxonomy of dermatophytes based on their sexual states. *Mycologia*, 71:968–976.
- Takashio, M., & De Vroey, C. (1976).** Reproduction sexuée de certains dermatophytes sur milieu à base de graines de niger (*Guizotia abyssinica*). *B. Soc. Fr. Mycol. Med.*, 5:141-144.
- Tanaka, S., Summerbell, R. C., Tsuboi, R., Kaaman, T., Sohnle, P. G., Matsumoto, T., & Ray, T. L. (1992).** Advances in dermatophytes and dermatophytosis. *Med. Mycol.*, 30:29-39.
- Tautz, D., & Renz, M. (1984).** Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. *Nucleic Acids Res.*, 12:4127-4138.
- Taylor, J. W., Jacobson, D. J., Kroken, S., Kasuga, T., Geiser, D. M., Hibbett, D. S., & Fisher, M. C. (2000).** Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi. *Fungal Genet. Biol.*, 31:21-32.
- Taylor, J. W., Jacobson, D. J., & Fisher, M. C. (1999).** The evolution of asexual fungi: reproduction, speciation and classification. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 37:197-246.
- Thomas, M. R., & Scott, N. S. (1993).** Microsatellite repeats in grapevine reveal DNA polymorphisms when analysed as sequence-tagged sites (STSs). *Theor. Appl. Genet.*, 86:985-990.
- Templeton, A. R. (1989).** The meaning of species and speciation: A genetic perspective. – In: Otte, D., Endler, J. A., (eds.), *Speciation and Its Consequences*, Sinauer, Sunderland, MA: 3–27.
- The Broad Institute (2011)** Dermatophyte Comparative Database. Available at: http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/dermatophyte_comparative/MultiHome.html. Accessed 2 March 2012.
- Tietz, HJ, Mendling, W (2001).** Haut- und Vaginalmykosen. Berlin: Blackwell. 141 p.
- Tietz, H. J., & Sterry, W. (2006).** Antimykotika von A-Z. Stuttgart: Thieme, 4.Auflage. 139 p.
- Tsuboi, R., Okeke, C., Inoue, A., Yamazaki, M., Hiruma, M., & Ogawa, H. (2002).** Identification and viability assessment of dermatophytes infecting nail based on quantitative PCR of dermatophyte actin (ACT) mRNA. *Jpn. J. Med. Mycol.*, 43:91-93.
- Turgeon, B. G. (1998).** Application of mating type gene technology to problems in fungal biology. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 36:115-137.
- Turin, L., Riva, F., Galbiati, G., & Cainelli, T. (2000).** Fast, simple and highly sensitive double-rounded polymerase chain reaction assay to detect medically relevant fungi in dermatological specimens. *Eur. J. Clin. Invest.*, 30:511-518.
- Tyler, K. D., Wang, G., Tyler, S. D., & Johnson, W. M. (1997).** Factors affecting reliability and reproducibility of amplification-based DNA fingerprinting of representative bacterial pathogens. *J. Clin. Microbiol.*, 35:339-346.
- Vanormelingen, P., Chepurinov, V. A., Mann, D. G., Cousin, S., & Vyverman, W. (2007).** Congruence of morphological, reproductive and ITS rDNA sequence data in some Australasian *Eunotia bilunaris* (Bacillariophyta). *Eur. J. Phycol.*, 42:61-79.
- Votava, M. (2003).** Lékařská mikrobiologie speciální. Brno: Neptun. 495 p.
- Wakasa, A., Anzawa, K., Kawasaki, M., & Mochizuki, T. (2010).** Molecular typing of *Trichophyton mentagrophytes* var. *interdigitale* isolated in a university hospital in Japan based on the non-transcribed spacer region of the ribosomal RNA gene. *J. Dermatol.*, 37:431-440.

- Watt, W. B. (1994).** Allozymes in evolutionary genetics: self-imposed burden or extraordinary tool?. *Genetics*, 136:11-16.
- Weitzman, I., McGinnis, M. R., Padhye, A. A., & Ajello, L. (1986).** The genus *Arthroderma* and its later synonym *Nannizzia*. *Mycotaxon*, 25:505-518.
- Weitzman, I., & Silva-Hutner, M. (1967).** Non-keratinous agar media as substrates for the ascigerous state in certain members of the gymnoascaceae pathogenic for man and animals. *Med. Mycol.*, 5:335-340.
- Weitzman, I., & Summerbell, R. C. (1995).** The dermatophytes. *Clin. Microbiol. Rev.*, 8:240-259.
- Welsh, J., & McClelland, M. (1990).** Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.*, 18:7213-7218.
- White, T. C., Oliver, B. G., Gräser, Y., & Henn, M. R. (2008).** Generating and testing molecular hypotheses in the dermatophytes. *Eukaryot. Cell.*, 7:1238-1245.
- Woodgyer, A. (2004).** The curious adventures of *Trichophyton equinum* in the realm of molecular biology: a modern fairy tale. *Med. Mycol.*, 42:397-403.
- Wu, Y., Yang, J., Yang, F., Liu, T., Leng, W., Chu, Y., & Jin, Q. (2009).** Recent dermatophyte divergence revealed by comparative and phylogenetic analysis of mitochondrial genomes. *BMC genom.*, 10:238-252.
- Yang, X., Sugita, T., Takashima, M., Hiruma, M., Li, R., Sudo, H., ... & Ikeda, S. (2009).** Differentiation of *Trichophyton rubrum* clinical isolates from Japanese and Chinese patients by randomly amplified polymorphic DNA and DNA sequence analysis of the non-transcribed spacer region of the rRNA gene. *J. Dermatol. Sci.*, 54:38-42.
- Yazdanparast, A., Jackson, C. J., Barton, R. C., & Evans, E. G. V. (2003).** Molecular strain typing of *Trichophyton rubrum* indicates multiple strain involvement in onychomycosis. *Brit. J. Dermatol.*, 148:51-54.
- Yoshida, E., Makimura, K., Mirhendi, H., Kaneko, T., Hiruma, M., Kasai, T., ... & Tsuboi, R. (2006).** Rapid identification of *Trichophyton tonsurans* by specific PCR based on DNA sequences of nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) 1 region. *J. Dermatol. Sci.*, 42:225-230.
- Yu, J., Wan, Z., Chen, W., Wang, W., & Li, R. (2004).** Molecular typing study of the *Microsporum canis* strains isolated from an outbreak of tinea capitis in school. *Mycopathologia*, 157:37-41.
- Zhong, Z., Li, R., Li, D., & Wang, D. (1997).** Typing of common dermatophytes by random amplification of polymorphic DNA. *Japn. J. Med. Mycol.*, 38:239-246.
- Zietkiewicz, E., Rafalski, A., & Labuda, D. (1994).** Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*, 20:176-183.