

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Mykologie

Studijní obor: Botanika



Adéla Čmoková

Molekulární typizace izolátů z komplexu *Arthroderma benhamiae*, původce epidemické zoonotické dermatofytózy v Evropě

Molecular typization of isolates from *Arthroderma benhamiae* complex, a zoonotic agent of epidemic dermatophytosis in Europe

Diplomová práce

Vedoucí závěrečné práce: Mgr. Vít Hubka

Konzultant: Mgr. Miroslav Kolařík, Ph.D.

Praha 2015

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 předložená k získání jiného nebo stejného akademického titulu

V Praze, dne 12. 8. 2015

.....

Adéla Čmoková

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému školiteli Mgr. Vítu Hubkovi, na kterého jsem se vždy mohla s čímkoli obrátit a pokaždé si na mě udělal čas. Ráda bych mu poděkovala za neúnavnou kontrolu každé publikace, abstraktu a posteru, které jsem kdy napsala, za velmi zajímavé téma diplomové práce a podnětné připomínky k jejímu vypracování.

Podobně bych za připomínky k této práci chtěla poděkovat i Mgr. Miroslavovi Kolaříkovi, PhD., kterému děkuji mimo jiné také za možnost pracovat pod jeho vedením v Laboratoři genetiky a metabolismu hub AVČR na velmi zajímavých výzkumných tématech.

Moje poděkování patří také Mgr. Gabriele Fuxové, která mi během řešení práce věnovala mnoho času a v počátcích mi umožnila nahlédnout do problematiky práce s mikrosatelitními markery. Dále bych chtěla poděkovat Ing. Lence Flaškové a RNDr. Miladě Chudíčkové za důvěru a všemožnou pomoc, bez které by tato práce nemohla být uskutečněna.

V neposlední řadě bych chtěla poděkovat Prom. biol. Karlovi Prášilovi za neochvějnou důvěru, kterou do mě od počátku studia vkládal. Zuzaně Heilkové a Mgr. Ondřejovi Koukolovi, PhD. děkuji za ochotu poradit a za pomoc nejen s organizačními záležitostmi.

Velké díky patří také mé rodině a Petrovi Mikulovi, kteří se mnou měli trpělivost a všemožně mě podporovali během celého studia a všem studentům a pedagogům z bezcévného oddělení katedry botaniky PŘF UK za rady, pomoc a přátelský kolektiv.

Grantové agentuře Univerzity Karlovy děkuji za finanční podporu pro práci na tématu diplomové práce (projekt GAUK 1344214) a možnost prezentovat výsledky práce na kongresu 7th Trends in Medical Mycology, který se uskuteční v říjnu 2015 v Lisabonu.

ABSTRAKT

Před několika lety byl druh *Arthroderma benhamiae* mezi klinickými mykology téměř neznámý, přesto dnes působí v České republice kolem 40 % dermatofytických infekcí přenesených ze zvířat na člověka. Rezervoárem druhu jsou především morčata a další hlodavci. Podobná situace je i v dalších státech střední a západní Evropy. Příčina výrazného nárůstu v incidenci infekcí zatím nebyla zjištěna, stejně jako nebyly navrženy dostatečně variabilní molekulární markery, které by tuto příčinu pomohly odhalit.

Pro potřeby studie byly vybrány izoláty (n=268) z případů lidských i zvířecích dermatofytóz z ČR, Německa, Belgie, Švýcarska, Itálie, Japonska a USA. K odhalení vnitrodruhové variability bylo navrženo deset variabilních mikrosatelitních markerů a byla provedena sekvenční analýza dvou genetických lokusů (oblast ITS rDNA a gen *gpdh*). Studován byl také fenotyp kmenů na úrovni mikro- a makromorfologie, a růstové parametry kmenů při několika teplotách a na několika kultivačních médiích. Určeny byly i párovací typy jednotlivých izolátů a provedeny křížící pokusy mezi geneticky příbuznými i vzdálenými kmeny.

Sekvenční analýza odhalila celkem 6 různých genotypů (SG1-SG6) mezi kmeny druhu *A. benhamiae*, většina (99%) kmenů patřila do 3 hlavních subpopulací: americko-evropské (SG1), evropské (SG2) a evropsko-japonské (SG3). Mikrosatelitová analýza odhalila celkem 32 odlišných genotypů distribuovaných do 4 velkých subpopulací, které se shodovaly se sekvenční analýzou. Rozdílem bylo odlišení kmenů evropského a amerického původu v subpopulaci SG1. Rozdělení do 4 hlavních skupin bylo podpořeno i fenotypem kultur. Ve všech 4 subpopulacích byl výrazně vychýlen poměr párovacích typů, většinou (kromě SG2) ve prospěch MAT1-1 párovacího typu. Všechny subpopulace (kromě SG2) byly vyhodnoceny jako klonální. Vysvětlením rekombinace v rámci subpopulace SG2 může být existence přirozeného rezervoáru infekcí mezi volně žijícími zvířaty.

Jako původce epidemie v Evropě byly označeny kmeny evropského původu subpopulace SG1, které měly na svědomí 78% všech evropských infekcí a ve své morfologii byly tyto izoláty velmi uniformní (žlutě zbarvené kolonie, bez makrokonidií, pomalý růst). Byl u nich zjištěn silně klonální způsob množení a pouze párovací typ MAT1-1. Pravděpodobný původ těchto izolátů, jejichž přítomnost v klinickém materiálu v Evropě byla zjištěna až v roce 2003, je předpokládán v Severní Americe, kde se nachází centrum genetické variability druhu a tamější populace je geneticky blízká evropské. Tato hypotéza ale musí být dále testována.

Mikrosatelitní markery navržené v této práci představují vhodný nástroj pro další monitoring probíhající epidemie, zejména umožňují detekovat šíření virulentních genotypů do dalších geografických oblastí a změny v zastoupení genotypů na konkrétních lokalitách.

Klíčová slova: dermatofyty, mikrosatelity, epidemiologie, typizační schéma, morče, *Arthroderma benhamiae*

ABSTRACT

Arthroderma benhamiae has been almost unknown among clinical mycologists but it is a cause of around 40 % of dermatophytic infections according to current studies in the Czech Republic. The species is primarily transmitted to humans from guinea pigs and other rodents. The epidemiological situation is similar in other countries in Central and Western Europe. The reason of significant increase in the incidence of infections has not been identified yet, and no sufficiently informative molecular markers have been developed for typification of the species that could help to resolve the cause of this problem.

For the purposes of this study, isolates (n=268) from cases of human and animal dermatophytoses from the Czech Republic, Germany, Belgium, Switzerland, Italy, Japan and USA were selected. Ten variable microsatellite markers were developed and sequence analysis of two genetic loci (ITS rDNA and *gpdh* gene) were performed to reveal intraspecific variation. Phenotype was also studied at the level of micro- and macromorphology of the strains and growth parameters at several temperatures and on several cultivation media. Mating type idiomorph of each isolate was determined and mating experiments were performed by crossing pairs of genetically related as well as genetically distant strains.

Sequence analysis revealed six different genotypes (SG1-SG6) among strains of *A. benhamiae*, the majority (99%) of strains belonged to three major subpopulations: Euroamerican (SG1), European (SG2) and the European-Japanese (SG3). Microsatellite analysis revealed 32 different genotypes distributed into four major subpopulations, which were concordant with sequence analysis. However, microsatellites markers were able to distinguish between strains of European and American origin in the Euroamerican subpopulation (SG1). Phenotypic studies also supported distribution of strains into the same four main groups. Disequilibrium was found between ratio of mating types in all four subpopulations (except for SG2), MAT1-1 mating type predominate. All subpopulations (except SG2) were assumed to be clonal. Explanation of recombination within the subpopulation SG2 may be the presence of natural reservoir of infection among wild animals. European isolates of subpopulation SG1 have been identified as a cause of the epidemic in Europe. This isolates were responsible for 78% of all infections in Europe and their morphology was very uniform (yellow-coloured colonies, no production of macroconidia, slow growth parameters). Strongly clonal reproduction was detected between these isolates, all of them were of mating type MAT1-1. The first detection of this genotype in Europe is dated around 2003 and its origin can be in North America where is located the center of genetic variability of *A. benhamiae* this and this population is genetically closely related. This hypothesis, however, should be more thoroughly tested. Microsatellite markers designed in this study represent suitable tool for future precise monitoring of the epidemic's progression, spread of virulent genotypes detection to other geographical areas and changes in the genotype spectrum in specific geographic locations.

Key words: dermatophytes, microsatellites, epidemiology, typization scheme, guinea pig, *Arthroderma benhamiae*

OBSAH

PŘEDMLUVA	7
1. ÚVOD	8
1.1 <i>Arthroderma benhamiae</i> – význam a taxonomie.....	8
1.2 Morfologie druhu <i>A. benhamiae</i>	8
1.3 Spektrum hostitelských druhů	9
1.4 Klinický obraz.....	9
1.5 Mechanizmy přenosu dermatofytóz	10
1.6 Pohlavní systém a klonalita	13
1.7 Vnitrodruhová variabilita	14
1.8 Epidemiologie <i>A. benhamiae</i> v ČR.....	15
2. METODY.....	17
2.1 Studované kmeny druhu <i>Arthroderma benhamiae</i>	17
2.2 Studium fenotypu.....	17
2.3 Extrakce DNA.....	18
2.4. Amplifikace cílových genů	18
2.5. Určení pohlavního ladění izolátů.....	19
2.6 Indukce tvorby pohlavního stádia - křížící pokusy	19
2.7 Analýza mikrosatelitních lokusů	20
2.7.1 Statistická analýza mikrosatelitových dat	22
3. VÝSLEDKY	23
3.1 Epidemiologie	23
3.2 Studium fenotypu.....	24
3.3 Sekvenční analýza a analýza MAT genů	32
3.4 Analýza mikrosatelitních dat	34
3.4.1 Molekulárně genetická struktura populace <i>A. benhamiae</i>	35
3.4.2 Populační struktura	40
3.4.3 Klonalita subpopulací	41
3.4.5 Manifestace onemocnění v závislosti na příslušnosti k mikrosatelitní subpopulaci.....	43
3.4.6. Křížící pokusy	44

4. DISKUZE	46
4.1 Struktura populace druhu <i>A. benhamiae</i>	46
4.1.1 Druhový koncept	47
4.1.2 Klonalita vs. rekombinace	47
4.1.3 Zastoupení párovacích typů	48
4.1.4 Křížení	49
4.1.5 Rezervoár druhu <i>A. benhamiae</i>	50
4.2. Epidemie způsobená druhem <i>A. benhamiae</i> v Evropě	51
4.2.1 Genetická charakteristika a původ kmenů působících epidemii v Evropě	52
4.3. Epidemiologická situace v Japonsku	53
5. ZÁVĚR	54
6. ZDROJE	55
7. PŘÍLOHA 1 - obrazová příloha	63
8. PŘÍLOHA 2 – články	71

PŘEDMLUVA

Diplomová práce se soustředí na epidemiologii medicínsky významného zoonózního druhu *Arthroderma benhamiae*. Tento druh, jehož hlavním rezervoárem jsou udávána morčata, byl v minulosti mezi klinickými mykology v Evropě (a také Japonsku) téměř neznámý a infekce člověka byly vzácné. Dnes patří *A. benhamiae* ve střední a západní Evropě (v menší míře také v Japonsku) mezi nejčastější původce dermatofytóz. Pro tento druh zatím chyběl dostatečně polymorfní marker, který by dokázal poodhalit jeho vnitrodruhovou variabilitu. Diplomová práce proto měla následující cíle:

1. Navrhnout dostatečně polymorfní genetické markery pro vnitrodruhovou typizaci druhu, které by mohly sloužit k monitoringu právě probíhající vlny infekcí způsobených druhem *A. benhamiae* v Evropě.
2. Porovnat diskriminační schopnost těchto markerů s doposud použitými (např. sekvenování ITS regionu rDNA).
3. Zjistit, zda jsou přítomné rozdíly v zastoupení genotypů u lidských a zvířecích izolátů, a jestli se zastoupení genotypů liší také v závislosti na jejich geografickém původu.
4. Určit, jestli jsou některé zvířecí genotypy ve zvýšené míře přenášeny na člověka (zvýšená virulence) a zda měly tyto genotypy na svědomí také infekce člověka a zvířat v minulosti (před počátkem epidemie). Může tedy příčina současné epidemie spočívat ve změně zastoupení genotypů oproti minulosti?

Kromě izolátů pocházejících z Evropy byly do studie zařazeny také izoláty z USA a Japonska, které by mohly pomoci objasnit následující otázky:

5. Vyskytují se v těchto oblastech stejné genotypy zachycené v evropské populaci? Pokud ano, může současná epidemie ve střední Evropě souviset se zavlečením virulentního genotypu ze zahraničí?

Diplomové práce byla doplněná o studium fenotypové variability a zabývala se také určením párovacího typu (MAT1-1, MAT1-2) všech izolátů. Znalost párovacích typů byla využita pro křížící pokusy, které měly za cíl objasnit, jestli jsou nově nalezené genotypy schopné pohlavního procesu (křížení v rámci jednoho genotypu i mezi zjištěnými genotypy navzájem).

1. ÚVOD

1.1 *Arthroderma benhamiae* – význam a taxonomie

Druh *A. benhamiae* patří do skupiny mikroskopických, keratinolytických hub nazývaných dermatofyty. Tato skupina v úzkém pojetí zahrnuje tři rody, a sice *Trichophyton*, *Microsporum* a *Epidermophyton*. Zástupci skupiny jsou známy jako původci dermatofytóz - infekcí kůže a kožních adnex lidí a zvířat. Dermatofytózy patří k nejběžnějším onemocněním člověka, jejich prevalence v určitých skupinách může dosahovat až desítky procent (Havlickova et al 2008). Na léčbu těchto onemocnění u lidských pacientů jsou po celém světě ročně vynaloženy značné prostředky, stejnou ne-li větší finanční zátěž však představuje léčba a následky těchto onemocnění u hospodářských a domácích zvířat (Kane et al 1997).

Nejvýznamnějším rodem dermatofytů je z pohledu celosvětové prevalence infekcí rod *Trichophyton*. Anamorfa druhu *A. benhamiae* patří morfologicky i fylogeneticky do rodu *Trichophyton*, ale kombinace „*Trichophyton benhamiae*“ nebyla nikdy vytvořena a tento druh se tedy v literatuře objevuje pod jménem pohlavního stádia – *Arthroderma*. Příčinou této nekonzistentní taxonomie je fakt, že se vědecká komunita studující dermatofyty v minulosti domnívala, že druh *T. mentagrophytes* má na základě křížících pokusů hned tři pohlavní stádia, a sice *A. benhamiae* (Ajello & Cheng 1967), *A. simii* (Stockdale et al 1965) a *A. vanbreuseghemii* (Takashio 1973). Taxonomie založená na molekulárních datech ale potvrdila, že se jedná o tři odlišné a fylogeneticky dobře oddělené druhy (Gräser et al 1999b).

1.2 Morfologie druhu *A. benhamiae*

Druh *T. mentagrophytes* byl pro svoji proměnlivou makromorfologii (která se ukázala být z části důsledkem toho, že se jednalo o druhový komplex) dříve rozdělován do několika morfologických variet. Tyto variety však nebyly pevně definovány a mnohými autory dodržovány, proto není možné ve starších studiích podle morfologie odlišit izoláty druhu *A. benhamiae* od ostatních druhů původně také nazývaných *T. mentagrophytes*. Druh *A. benhamiae* byl popsán jako pohlavní stadium získané křížením dvou izolátů druhu *T. mentagrophytes* var. *granulosum* původem z USA (konkrétně z Missouri a Illinois), získaných z případu dermatofytózy psa a člověka (Ajello & Cheng 1967). Morfologie těchto izolátů se vyznačovala krémově zbarvenými koloniemi s granulární strukturou a náznakem červeného pigmentu na reverzu kolonií, četnými mikrokonidii a přítomností makrokonidií. Pohlavní stadium bylo popisováno jako bílá až nažloutlá askomata globózního tvaru o velikosti 400–500 µm, peridiální hyfy tenkostěnné, dichotomicky větvené, přehrádkované, zakončené buď protáhlými na koncích se zužujícími hyfami, 60–200 µm dlouhými, nebo přívěsky ve formě spirálních hyf. Buňky peridiálních hyf byly popisovány jako hyalinní, činkovité, asymetrické, hrubě bradavčité o velikosti 2,8–5,7 × 5,7–13,9 µm. Oválná vřevka byla velikosti 3,6–6,0 × 4,2–7,2 µm většinou obsahovala osm askospor 1,2–1,8 × 1,2–2,8 µm velkých (Ajello & Cheng 1967).

V recentních studiích byly mezi izoláty druhu *A. benhamiae* rozlišeny podle makromorfologie kolonií dvě výrazně odlišné skupiny. Podle barvy a textury kultur na SAB (Sabouraudův agar) byl rozlišován žlutý a bílý fenotyp (Symoens et al 2013). Bílý fenotyp byl popisován jako rychleji rostoucí a výrazně více sportující na SAB než žlutý fenotyp (Symoens 2013). Kromě těchto dvou základních fenotypů jsou popisovány ještě další, jejichž barva reverzu se pohybuje od žlutých odstínů přes červené až po hnědé a textura kolonií obvykle granulární nebo vatovitá (Kawasaki et al 2002).

1.3 Spektrum hostitelských druhů

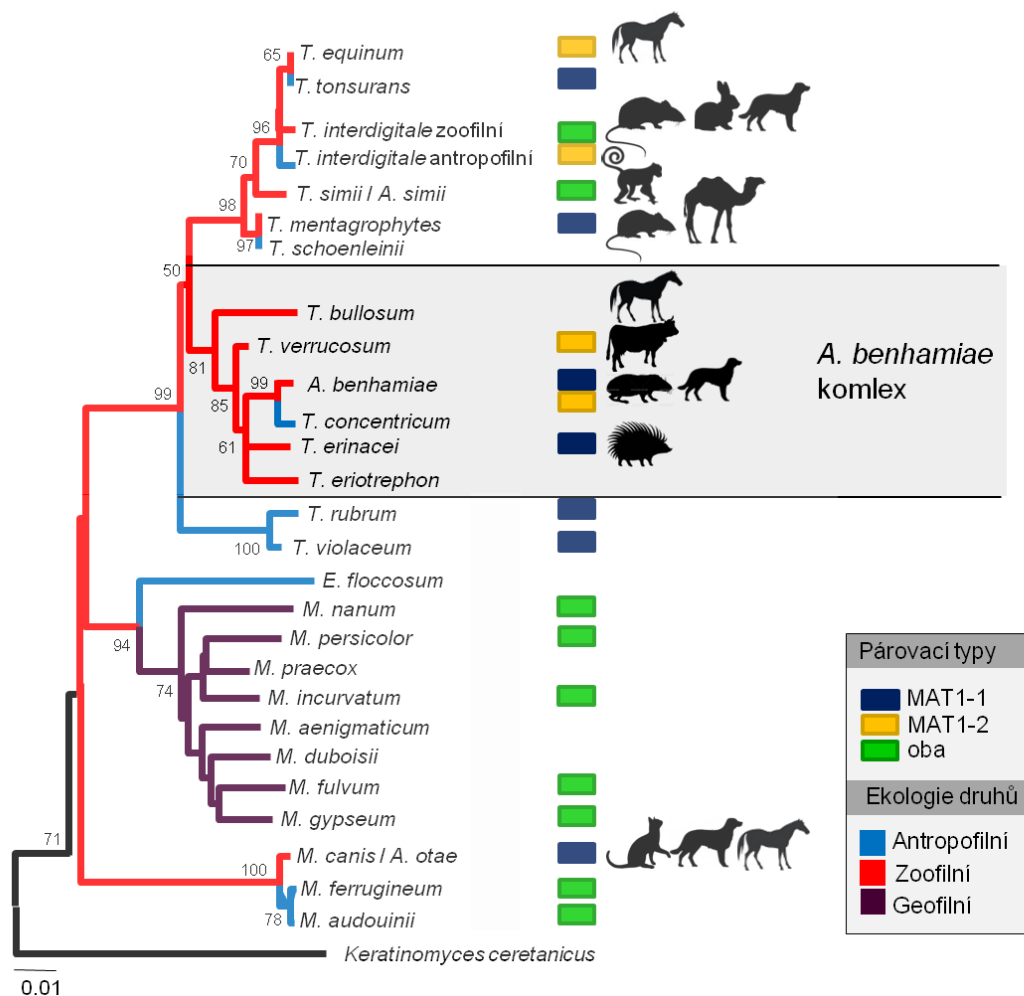
Dermatofyty jsou nalézány na různých substrátech, jako např. v půdě, na kůži, srsti a peří hostitelů, v jejich peleších a v případě člověka v prachu domácností, na rekreačních místech apod. (Fari & Gräser 2000, Sharma et al 2008, Singh et al 2009, Vidyasagar et al 2005). Dermatofyty, které primárně nalézáme v půdě, z níž se může člověk a další obratlovci nakazit, označujeme jako geofilní. Primárně patogenní druhy izolované jako původce dermatofytóz u zvířat označujeme jako zoofilní dermatofyty (Georg 1960). Jako zvláštní skupina zoofilních dermatofytů se vyčleňují specializovaní patogeni člověka - antropofilní dermatofyty (Georg 1960). Dermatofyty mohou být vázané ke konkrétnímu hostiteli, nebo mít různě široké hostitelské spektrum (viz Obr. 1). Přitom ale není vzácné, že se relativně silně hostitelsky specializované druhy přenesou i na jiné druhy hostitelů. Jde ale většinou o jednotlivé případy s omezenými možnostmi šířit se dále. Z *in vitro* pokusů víme, že některé druhy dávají přednost keratinu o určitých vlastnostech (hostitelské preference) (Vidyasagar et al 2005). Evolučním trendem je přechod od dermatofytů geofilních přes zoofilní až k antropofilním (Summerbell 2002). K antropofilním druhům řadíme mimo jiné i nejčastějšího původce lidských dermatofytóz v Evropě, druh *T. rubrum*, nebo např. antropofilní kmeny *T. interdigitale*, zbytek kmenů druhů *T. interdigitale*, je však zoofilní. Naopak *A. benhamiae* patří spolu se zoofilními kmeny *T. interdigitale* (dříve mylně označované jako *T. mentagrophytes*) k nejdůležitějším zoofilním dermatofytům v ČR (Obr. 4) (Hubka et al 2014b).

Ve střeoevropských podmínkách jsou infekce způsobené druhem *A. benhamiae* na člověka přenášeny především z přirozeného hostitele a rezervoáru druhu, morčete (*Cavia porcellus*) (Cafarchia et al 2012, Drouot et al 2009, Fumeaux et al 2004, Chermette et al 2008). Morčata jsou ale častým hostitelem i druhu *T. interdigitale*, vzácně i druhu *M. canis* (Alteras 1966, Efuntoye & Fashanu 2002, Goss et al 1963, Hiruma et al 2014). Dále jsou u druhu *A. benhamiae* popisovány případy infekce psů, králíků, čincil a dalších hlodavců (Kawasaki et al 2000). V Severní Americe jsou infekce druhem *A. benhamiae* popisovány především ze psů (Sieklucki et al 2014).

1.4 Klinický obraz

Druh *A. benhamiae* způsobuje u některých morčat léze charakteristické vypadáváním chlupů na čenichu a kolem očí, v závažných případech jsou postiženy i drápy a hřbet (Kraemer et al 2012). Infekce je ale často asymptomatická (Balsari et al 1981) a projeví se až následkem stresu (např. po změně prostředí) (Kraemer et al 2012a, Kraemer et al 2012b, Vangeel et al 2000). Dříve se předpokládalo, že se dermatofytóza u morčat objeví jako následek jiných souběžně prodělaných onemocnění, to se však nepotvrdilo (Kraemer et al 2012a). Zřejmě ale hraje roli stáří zvířete, přičemž častěji jsou postižena mladší zvířata (Drouot et al 2009, Vella Zahra et al 2003).

U lidí druh *A. benhamiae* vyvolává na kůži silně zánětlivé léze v místě kontaktu s nakaženým zvířetem, pravděpodobně jde v řadě případů o traumatické zanesení houby do kůže následkem drobného poranění (Shiraki et al 2006b, Tietz & Hämmerling 2007). Infekce se nemusí rozvinout a může probíhat téměř bezpříznakově a projevovat se pouze svěděním v místě infekce (Hemsworth & Pizer 2006). Nákaza se u lidí nejčastěji manifestuje v oblasti obličeje, krku, dekoltu a končetin (Hubka et al 2014b, Skořepová et al 2014), může být doprovázena i celkovými příznaky, jako jsou horečka a záněty lymfatických uzlin, hnisavé záněty kůže (bakteriální superinfekce). Infekce jsou běžné zejména u mladších osob, většinou dívek, typicky pod 20 let (Nenoff et al 2013, Skořepová et al 2014). Klinický obraz je nerozeznatelný od napadení ostatními zoofilními druhy dermatofytů (Skořepová et al 2014).



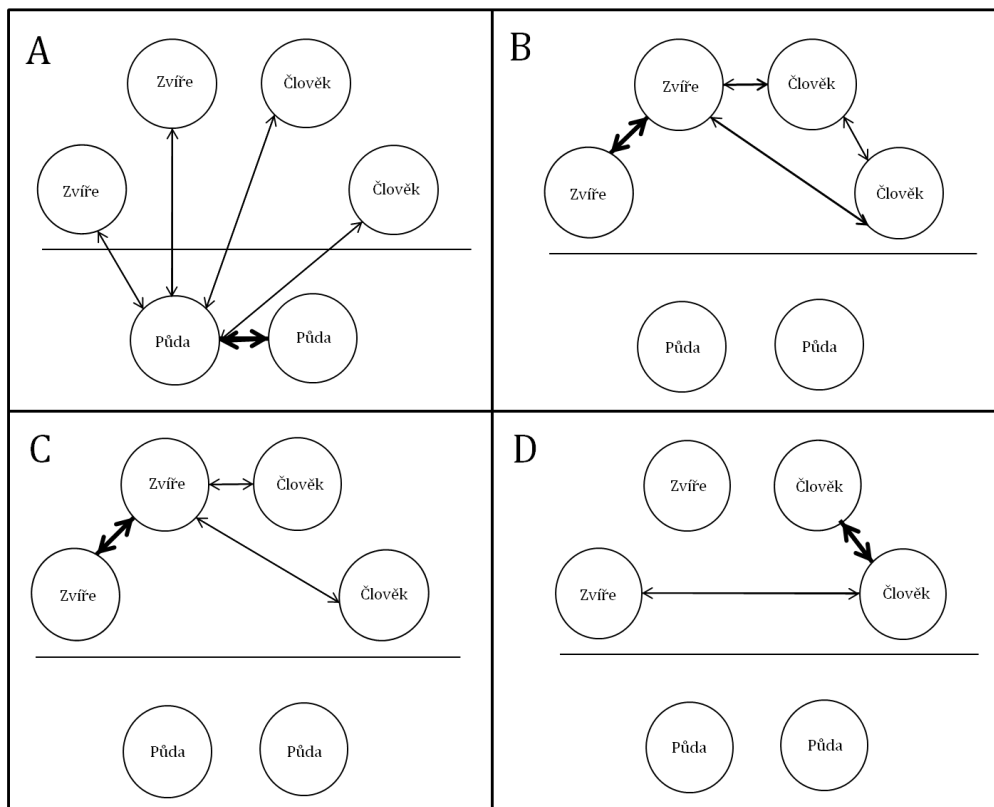
Obrázek 1: Fylogenetický strom vytvořený na základě sekvencí ITS rDNA vybraných druhů dermatofytů. Vyznačena byla ekologie jednotlivých druhů (barva větví); přítomnosti párovacích typů v populaci druhů (MAT1-1 nebo MAT1-2) (Graser et al 2006, Hiruma et al 2014, Sharma et al 2007, Sharma et al 2008). Nejvýznamnější hostitelé zoofilních druhů jsou znázorněny siluetou zvířete (Dolenc-Voljč 2015, Fehr 2015, Gräser et al 1999b, Chermette et al 2008, Nenoff et al 2007). Topologie stromu převzata z (Hubka et al 2014a).

1.5 Mechanismy přenosu dermatofytóz

Některé druhy dermatofytů (např. *T. rubrum* nebo *M. canis*) jsou kosmopolitní organismy (Benger et al 2004, Cano et al 2005). Rozšíření obligátně patogenních dermatofytů, které nemají rezervoár v půdě, reflektuje výskyt svých hlavních hostitelů (*T. rubrum* – člověk, *M. canis* – kočky, psi). Některé druhy dermatofytů jsou ale téměř endemické, např. druh *T. simii* (typický pro Indii) (Beguin et al 2013, Stockdale et al 1965) nebo *T. soudanense* (typický pro severní a východní Afriku) (Ali-Shtayeh et al 2015, Nweze 2010, Scott & Scott 1973) a pouze vzácně izolované mimo oblasti hlavního výskytu (Beguin et al 2013, Hubka et al 2014b). Důvodů, proč je pro jednotlivé regiony nacházena odlišná prevalence dermatofytóz, může být mnoho např. místní klima, hustota zalidnění, hygienické standardy, přístup ke zdravotní péči, kulturní specifika (např. zvyky), aj. (Buxton et al 1996).

Přenos antropofilních a zoofilních dermatofytů probíhá přímým kontaktem s nakaženým jedincem, nebo s kontaminovanými předměty (žíněnky, hřebeny, aj.) a půdou (Donnelly et al 2000, Hashimoto 1991, Moretti et al 2013, van Avermaete 2014). Modely přenosu dermatofytů na

hostitele v závislosti na jejich ekologii jsou znázorněny na Obrázku 2. Mezi rizikové faktory, které zvyšují možnost přenosu, patří například věk, stres, těhotenství, imunodeficience, přítomnost ektoparazitů a dalších onemocnění, hygienické podmínky, vysoká populační hustota (přirozených hostitelů i těch náhodných) (Donnelly et al 2000, Kraemer et al 2012b, Pritchard et al 2000). Dokumentováno je mnoho případů epidemií v rámci malého území (školy, sportoviště, statku), kde důvodem epidemie byl vysoce zamořený prostor (ohnisko) odkud se infekce šířila (Ergin et al 2006, Kamihama et al 1997, Kane et al 1988, Overy et al 2015, Shah et al 1988, Shroba et al 2009, Snider et al 1993, Yu et al 2004).

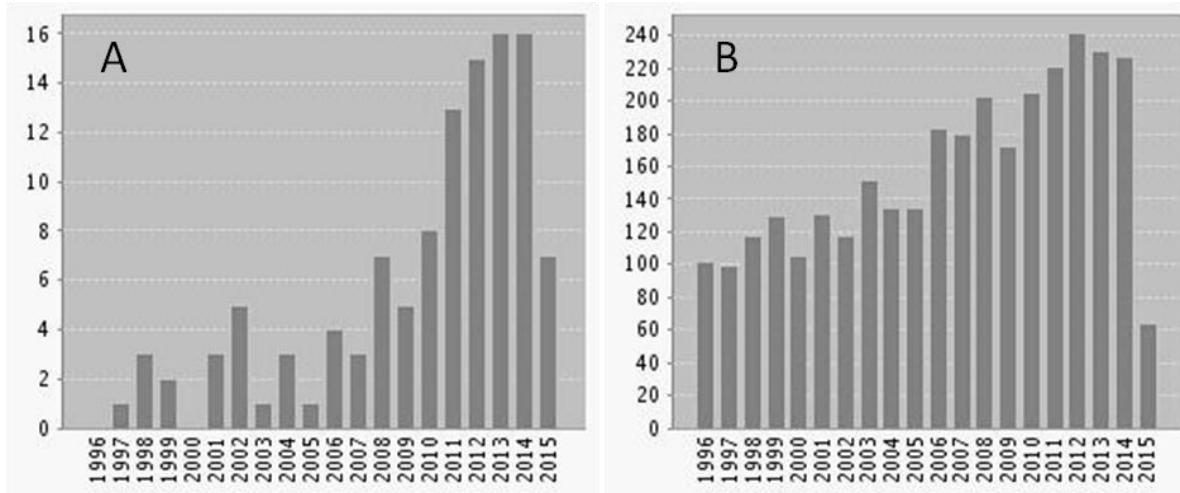


Obrázek 2: Modely získání (a šíření) infekcí způsobených dermatofyty s rozdílnou ekologií: geofilní dermatofyty (A); zoofilní dermatofyty s častým (B) a méně častým (C) přenosem na člověka; antropofilní dermatofyty (D). Překresleno podle (Dvořák & Otčenášek 1969).

Promořenost některých chovů morčat a králíků je vysoká. Symptomatická, či asymptomatická infekce druhu *T. mentagrophytes* komplexu byla v rámci některých chovů zjištěna u 30 až 75 % morčat (Alteras 1966, Alteras & Cojocar 1969, Kraemer et al 2012a, Kraemer et al 2012b, Torres-Rodriguez et al 1992), naopak v některých chovech nebyly druhy komplexu *T. mentagrophytes* ve větší míře zaznamenány (d'Ovidio et al 2014, Vangeel et al 2000). O velké promořenosti některých chovů svědčí i drobné epidemie dermatofytóz u chovatelů a zaměstnanců zverimexů způsobených druhem *A. benhamiae* (Cafarchia et al 2012, Shiraki et al 2006a, Šimaljaková 2010, van Avermaete 2014). Přenosy druhu *A. benhamiae* z hlodavců na člověka jsou dobře dokumentované a časté (Nakamura et al 2002, Skořepová et al 2014), až ve 40 % případů byla jednoznačně prokázána nákaza od morčete (Kraemer et al 2012b).

V minulosti počet dermatofytických infekcí přenesených ze zvířat na lidi s rozvojem zemědělství prudce narůstal (Aly 1994, Rippon 1985), dnes je však tendence k ústupu těchto zoonóz v souvislosti se změnami postupů (méně pracovníků v zemědělství, lepší ochranné pomůcky,

bezkontaktní postupy), zlepšené péče o nakažená zvířata, včetně nových možností léčby a prevence v podobě vakcinace (Borman et al 2007). Zcela opačná je ale situace u druhu *A. benhamiae*, v minulosti vzácně izolovaného z klinického materiálu, u něhož v posledních letech dochází k prudkému nárůstu zachycených případů u zvířat a člověka. V souvislosti s tímto druhem se dá v některých evropských zemích hovořit o epidemii (ve smyslu definice „výskyt onemocnění výrazně vyšší než obvykle očekávaný výskyt tohoto onemocnění v závislosti na místě a čase“). Zprávy o epidemickém výskytu zoonózy způsobené *A. benhamiae* přichází zejména z Německa (Kraemer et al 2012a, Kraemer et al 2012b, Nenoff et al 2011, Nenoff et al 2013, Nenoff et al 2014, Uhrlass et al 2013). Časovou ohraničenost epidemického výskytu zoonózy dobře dokumentuje popis vůbec prvního případů této infekce ve Švýcarsku v roce 2004 (Fumeaux et al 2004). Významný je tento druh také v Nizozemí (van Avermaete 2014). První případy této infekce u člověka v Japonsku byly popsány v roce 1997 (Kano et al 1997). V České republice byla sice popisována izolace *A. benhamiae* z klinického materiálu (Hejtmánek & Hejtmankova 1988, Hejtmánek & Hejtmankova 1989), nelze však spolehlivě zjistit jestli se opravdu jednalo o daný druh. Příslušnost izolátu k druhu *A. benhamiae* byla tehdy zjišťována křížením s referenčním kmenem, které vedlo k produkci pseudoaskomat bez přítomnosti askospor. Podle zjištění v současnosti probíhající dvouleté studie zabývající se molekulární epidemiologií dermatofytóz v ČR (Hubka et al 2012), tvoří tento druh v ČR zhruba 40% lidských dermatofytóz přenesených na člověka ze zvířat. Tyto izoláty však představují jen zlomek celkových případů (značná část pacientů je léčena bez mykologického vyšetření, nebo se nepodaří původce kultivovat z odebraného materiálu). U většiny těchto případů existuje jasná etiologická souvislost s chovem morčete, činčily, nebo králíka. Teorie dávající do souvislosti nárůst těchto infekcí se zvýšeným zájmem o chov drobných domácích zvířat, která se tak dostávají do úzkého kontaktu se svými chovateli, nenachází v ČR podporu. Obliba chovu morčat jako nejdůležitějšího rezervoáru byla totiž podobná i před rokem 1989, případy přenosu nákazy na člověka ale nebyly známy. Jedním z možných vysvětlení může být objevení se nového genotypu (případně rozšíření specifického, dříve vzácného genotypu), který se s mnohem vyšší úspěšností přenáší na člověka. Počátek epidemie může být také dokumentován nárůstem zájmu o studium tohoto v minulosti téměř neznámého druhu (Obr. 3). Před rokem 1997 bylo publikováno jen několik studií zabývajících se tímto druhem. Další nárůst zájmu o studium druhu *A. benhamiae* můžeme zaznamenat po roce 2011, kdy byl publikován jeho genom (Obr. 3, pro srovnání zájem o studium všech dermatofytů).



Obrázek 3: Počet prací publikovaných během let 1996–2015 v indexovaných databázích podle Web of science, které byly publikovány na téma „*Arthroderma benhamiae*“ (A); dermatofyty při zadání temínu „dermatophytes“ (B).

1.6 Pohlavní systém a klonalita

Druh *A. benhamiae* je heterotalický, stejně jako další klinicky významné dermatofyty, To znamená, že k tomu aby došlo k pohlavnímu procesu (tvorbě askomat a vrceček), je nutná přítomnost dvou opačně laděných jedinců s rozdílnými párovacími typy, označovanými také znaménky „-“ (popřípadě malé a) a „+“ (popřípadě velké A). Příslušnost kmenů k jednomu ze dvou párovacích typů je u *A. benhamiae* určena přítomností jednoho ze dvou genů (idiomorf) tzv. MAT lokusu (mating type locus) označované jako *MAT1-1* (u *A. benhamiae* odpovídá znaménku „-“) a *MAT1-2* (u *A. benhamiae* odpovídá znaménku „+“) (Kano et al 2011). Gen *MAT1-1* kóduje protein spoluutvářející tzv. alfa doménu a gen *MAT1-2* kóduje tzv. HMG doménu (high mobility group box domain). Obě domény pravděpodobně působí jako aktivátory transkripce a spolupodílejí se tak na regulaci pohlavního procesu a nejspíše mají význam také v regulaci jiných buněčných mechanismů (Becker et al 2015, Benkhali et al 2013, Coppin et al 1997). *MAT1-1* kmeny mají vyšší expresi genů spojených s tvorbou primordia askomat, naopak *MAT1-2* kmeny genů spojených s vegetativním růstem (Samils et al 2013a). Některé z těchto genů mohou mít také význam jako faktory virulence. Rozdíl ve virulenci mezi párovacími typy byl zjištěn u druhu *Cryptococcus neoformans* a *Aspergillus fumigatus* (Chang et al 2000, Cheema & Christians 2011, Kwon-Chung et al 1992, Yue et al 1999). Změnu fenotypu u druhu *C. neoformans* (tvorba melaninu a buněčného pouzdra) vyvolává gen *Ste12α* přítomný pouze u párovacího typu *MAT1-1* (Chang et al 2000). Tento gen je sekvenčně podobný genu *Ste12* u *Saccharomyces cerevisiae* (Wickes et al 1997) a je dobře konzervovaný i u jiných rodů hub např. *Aspergillus nidulans*, *Candida albicans*, *Kluyveromyces lactis* (Chang et al 2000). Důsledkem úspěšnějšího šíření virulentnějších jedinců jednoho párovacího typu v populaci hostitele může být vychýlení celé populace prospěch tohoto typu.

Další možností, jak vychýlit populaci ve prospěch jednoho párovacího typu je nestejně přežívání askospor (popř. snížená životnost kultur z nich odvozených) s konkrétním párovacím typem. U bazidiomycet byly objeveny tzv. smrtící alely (haplo-lethal alleles), které zabijí nově vytvořenou sporu po několika děleních. Bylo zjištěno, že tyto alely jsou vázané na jeden z MAT genů, čímž vychylují populaci ve prospěch jednoho párovacího typu (Antonovics et al 1998, Yockteng et al 2007).

Nahrazení jednoho párovacího typu jiným může být důsledkem i jiných mechanismů, zřejmě převažujících u dermatofyt (Graser et al 2006). Může jít pouze o důsledek klonality, vzniklé např. na principu efektu zakladatele. Pokud je druh úspěšně přenesen na jiného hostitele, či do jiného geografického regionu, může se dostat do podmínek, kde mu není umožněno pohlavní množení, a kde se určitý kmen (nebo velmi omezená populace kmenů) uchytí a rozšíří se pouze pomocí nepohlavních spor (mají vždy stejný párovací typ jako mateřský jedinec). Taková populace má potom klonální povahu (Brasier 1988).

U všech primárně patogenních dermatofytů je populace vychýlena ve prospěch jednoho z párovacích typů, dokonce u některých druhů nebyl druhý párovací typ vůbec zaznamenán (Obr. 1)(Graser et al 2006). V rámci druhu *A. benhamiae* byly zjištěny oba párovací typy, ale pro jednotlivé subpopulace (rozlišitelné sekvencí ITS rDNA) byl vždy jeden z párovacích typů převažující, nebo dokonce jediný přítomný (Symoens et al 2013). Výrazně vychýlený byl poměr párovacích typů (ve prospěch párovacího typu *MAT1-1*) subpopulace euroamerické (bílý fenotyp, viz morfologie) a japonské (Hiruma et al 2015, Summerbell et al 2002, Symoens et al 2013).

Biologický koncept druhu, který je u části eukaryotických organismů jedním ze stěžejních druhových konceptů, není u dermatofytů a jiných mikroskopických hub příliš uplatnitelný. Důvodem jsou situace, kdy v rámci druhu kmeny reprezentující jeden z párovacích typů úplně chybí, nebo je

problematické navození pohlavního stádia u některých druhů (neznáme optimální podmínky jeho navození), nebo řada dobře dokumentovaných případů mezidruhového křížení *in vitro*. Pro účely navození pohlavního stádia byla vytvořena řada kultivačních médií, které se pokouší simulovat přirozené podmínky křížení. Předpokládá se, že ke křížení dermatofytů dochází v norách a peleších zvířat nebo v půdě, vždy za přítomnosti keratinu. Proto se obvykle do médií přidává zdroj keratinu ve formě koňských oháněk a dětských vlasů (Dawson et al 1964, Gentles et al 1964). Nejjednodušší média tvoří jen půda. Přítomnost jiných mikroorganismů v půdě může být pro indukci teleomorfy stimulačním faktorem (Benedek 1964), stejně jako přítomnost solí (Takashio 1972) a dalších látek (Davidsson & Unestam 1974). Nejlépe se ale osvědčila přírodní média, např. ovesný nebo agar s přidavkem různých semen (De Vroey 1964, Weitzman & Silva-Hutner 1967).

V minulosti byly křížící pokusy na druhu *A. benhamiae* hojně prováděny (Hejtmanek & Hejtmankova 1988, Kawasaki et al 2010, Padhye & Carmichael 1969, Symoens et al 2013). Křížení s referenčním kmenem bylo před molekulární érou jedinou možností, jak od sebe odlišit všechny teleomorfy druhu *T. mentagrophytes* (*A. simii*, *A. benhamiae*, *A. vanbreuseghemii*). Referenčními kmeny byly pro druh *A. benhamiae* severoamerické kmeny (RV 26678 pro *MAT1-1* a RV 26678 pro *MAT1-2* idiomorfu). V některých případech bylo ale pohlavní stádium navozeno i při křížení s jiným druhem, a tak docházelo k chybnému zaměňování izolátů za *A. benhamiae*, přestože se jednalo o jiný druh (zjištěno recentně sekvenováním) (Padhye & Carmichael 1969). Mezidruhová kříženci taxonomicky dobře prověřených kmenů byly v několika studiích popsány mezi *A. benhamiae* a druhy *A. vanbreuseghemii*, *A. simii* a *T. erinacei* (Kawasaki et al 2008a, Kawasaki et al 2010).

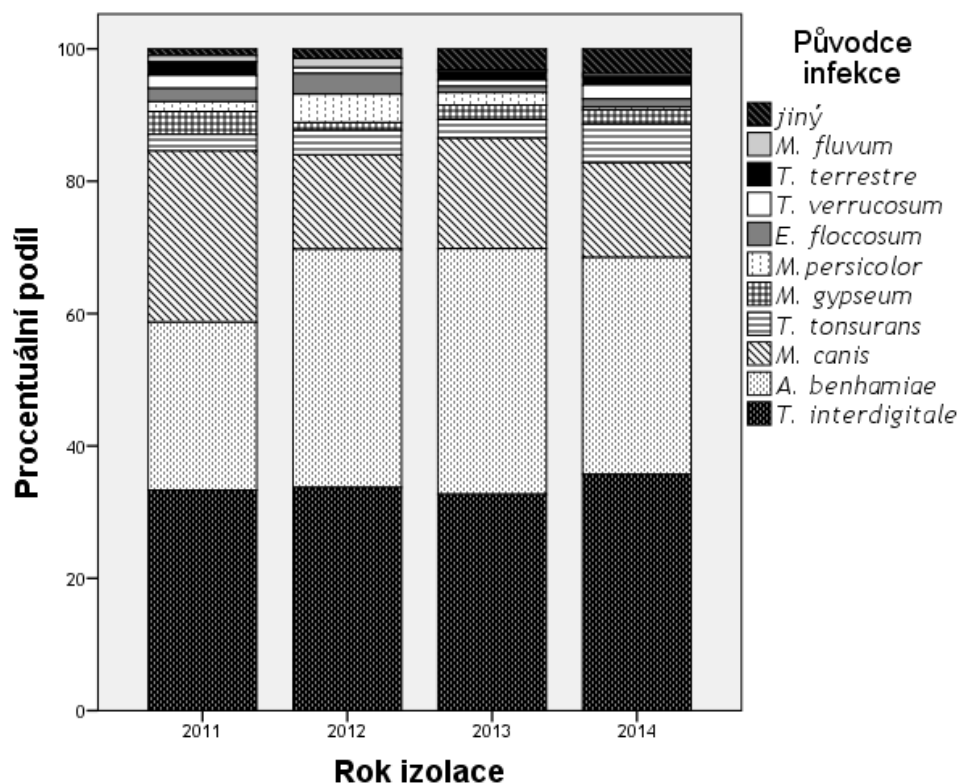
1.7 Vnitrodruhová variabilita

K odhalení vnitrodruhové variability dermatofytů byla dosud použita více či méně úspěšně celé řada metod od sekvenování určitých oblastí DNA (Heidemann et al 2010, Kano et al 2008, Probst et al 2002), přes PCR fingerprintingové metody (Baeza et al 2006, de Assis Santos et al 2007, Jackson et al 2006, Kac et al 1999, Spesso et al 2013, Yu et al 2004), PCR-RFLP (Abdel-Rahman et al 2010, Brilhante et al 2006, Mochizuki et al 2007), až po analýzu mikrosatelitů (Graser et al 2007, Ohst et al 2004, Sharma et al 2007, Sharma et al 2008). Studie provedené těmito metodami se zabývaly korelací mezi genotypem konkrétního kmene s jeho fenotypem (Brilhante et al 2006), citlivostí na antimykotika (de Assis Santos et al 2007) nebo klinickou manifestací onemocnění (Baeza et al 2006, Kaszubiak et al 2004, Yazdanparast et al 2003). Další podobné studie se zabývaly epidemiologií infekcí, např. zkoumáním kmenů pocházejících z ohnisek lokálních epidemií (Abdel-Rahman et al 2010, Kaszubiak et al 2004, Shroba et al 2009, Sugita et al 2006, Yu et al 2004). Pouze některé studie používaly dostatečně variabilní markery (mikrosatelity, PCR-RFLP) a analyzovaly dostatečně velké množství vzorků, aby odhalily populační strukturu a geografickou distribuci jednotlivých genotypů zkoumaných druhů (Abdel-Rahman et al 2010, Graser et al 2007, Ohst et al 2004). Ačkoli se jedná o významnou skupinu mikroskopických hub, typizační schémata byla zatím vytvořena jen pro zlomek klinicky významných druhů. Pomocí metody PCR-RFLP byly typizovány izoláty druhu *T. tonsurans*, metodou analýzy mikrosatelitů izoláty *T. rubrum* (Graser et al 2007, Ohst et al 2004), *M. canis* (Pasquetti et al 2013, Sharma et al 2007) a *M. persicolor* (Sharma et al 2008).

Dřívější studie již našly jistou míru vnitrodruhové variability druhu *A. benhamiae* (Kano et al 2008). První studie popsaly na základě křížících pokusů dvě skupiny izolátů popisované jako „rasy“ *A. benhamiae*, a sice americko-evropskou, izolovanou z králíků a morčat a africkou, izolovanou v centrální Africe z ježků bělobříchých (*Atelerix albiventris*) (Takashio 1977). Později byly tyto dvě rasy odlišeny na základě sekvenčních dat a podle dnešních poznatků reprezentují samostatné druhy

A. benhamiae a africká rasa *A. benhamiae* (zatím bezejmenný druh) (Gregory & English 1975, Kano et al 2008, Takahashi et al 2003).

Variabilita uvnitř americko-evropské rasy (pravá *A. benhamiae*) na základě ITS oblasti rDNA (nejpoužívanější marker v identifikaci dermatofyt) je menší než 1 % a tedy zcela nedostatečná k populačním studiím (Kano et al 2008). Pomocí tohoto markeru ale byly objeveny v rámci celosvětové populace *A. benhamiae* tři genotypy: první evropský s charakteristickými bílými koloniemi (viz morfologie) na SAB agaru, druhý evropský s žlutými koloniemi, do kterého patří i izoláty z USA a třetí japonský, do kterého patří i některé evropské izoláty (Hiruma et al 2015, Symoens et al 2013). Restrikční analýzou (PCR-RFLP) ITS regionu rDNA byly odhaleny ještě další dvě skupiny uvnitř druhu *A. benhamiae* - první izolovaná z lišek a norků a druhá izolovaná z činčily, avšak malá sekvenční podobnost s jinými kmeny *A. benhamiae* napovídá, že zřejmě v tomto případě vůbec nešlo o druh *A. benhamiae* (Ziółkowska et al 2015). Jediné dvě studie, které odhalily více genotypů v rámci druhu *A. benhamiae* užívaly metodu PCR-RFLP aplikovanou na oblast NTS (nontranscribed spacer) rDNA (Mochizuki et al 2001, Takeda et al 2012). V první studii se podařilo nalézt pět odlišných genotypů *A. benhamiae* v Japonsku, izolovaných z klinického materiálu, a jeden zcela odlišný kmen v Belgii, izolovaný z divoce žijících zvířat. Tato studie však byla omezena jen na osm izolátů a jejím velkým nedostatkem je absence určení izolátů na základě sekvenčních dat, nebo křížících experimentů (Kawasaki et al 2000). Výsledky druhé studie, ve které se podařilo nashromáždit už větší počet izolátů a která odhalila 11 genotypů, jsou těžko interpretovatelné, protože odporují sekvenčním datům i fenotypu kultur (Takeda et al 2012).



Obrázek 4: Procentuální podíl jednotlivých druhů dermatofytů (vynechán *T. rubrum*) izolovaných na lékařských pracovištích v ČR (n=1107). Graf byl vytvořený pro jednotlivé roky 2011 (n=201); 2012 (n=350); 2013 (n=318); 2014 (n=238).

1.8 Epidemiologie *A. benhamiae* v ČR

Během období červen 2011 až září 2014 proběhla na několika mikrobiologických pracovištích v ČR (viz kapitola 2.1, seznam spolupracujících pracovišť) souborná epidemiologická studie identifikující původce dermatofytóz v ČR. Byly získány a molekulárními metodami (PCR fingerprinting, sekvence ITS rDNA) určeny všechny kmeny dermatofytů (n=1107) (Obr. 4) zachycené na těchto pracovištích kromě druhu *T. rubrum* (n=4340), který byl učen pouze morfologicky. Obrázek zobrazující zastoupení druhů dermatofyt včetně druhu *T. rubrum* je součástí přílohy (Obr. P1).

Během studovaného období byla infekce druhem *A. benhamiae* zachycena v ČR ve 373 případech, tj. ve 6,8 % ze všech dermatofytóz (n=5447). Druh *A. benhamiae* se tak stal společně s druhem *T. interdigitale* v těchto letech v ČR druhým (respektive třetím) nejčastěji izolovaným dermatofytem vůbec. Pro potřeby této diplomové práce bylo z těchto 373 izolátů vybráno a použito 195 izolátů druhu *A. benhamiae*, šlo především o kmeny získané během let 2011-2013 (viz Tabulka, příloha k práci).

2. METODY

2.1 Studované kmeny druhu *Arthroderma benhamiae*

Kmeny (Tabulka, příloha k práci) získané z případů lidských dermatofytóz (viz kapitola 1.8) byly izolovány ze vzorků kůže, nehtů a vlasů a poskytnuty následujícími pracovišti v ČR:

- 1) Zdravotní ústav se sídlem v Ostravě (RNDr. Stanislava Dobiášová; Mgr. Radim Dobiáš)
- 2) Dermatovenerologická klinika 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Všeobecné fakultní nemocnice v Praze (Doc. MUDr. Magdalena Skořepová, CSc.)
- 3) Pardubická krajská nemocnice, a. s. (MUDr. Karel Mencl, CSc.)
- 4) Centrální laboratoře Nemocnice České Budějovice, a. s. (MUDr. Naďa Mallátová)
- 5) Zdravotní ústav se sídlem v Ústí nad Labem (RNDr. Pavlína Lysková)
- 6) Fakultní nemocnice Plzeň-Lochotín (MUDr. Jana Hanzlíková; MUDr. Helena Janouškovcová)

Pracoviště byla vybrána tak, aby svými spádovými oblastmi co nejlépe pokrývala území ČR. Analyzovány byly všechny kmeny druhu *A. benhamiae*, které byly zachyceny na daných pracovištích v období červen 2011 až srpen 2013. Pacienti, u kterých došlo k odebrání vzorku, byli požádáni o vyplnění dotazníku, v němž byly zjišťovány údaje jako věk, pohlaví pacienta dále také lokalizace infekce, možnost zvýšeného kontaktu se zvířaty, či půdou. Tyto parametry byly testovány v závislosti na genotypu ve statistickém jazyce R (Venables et al 2011) pomocí balíku vcd (Meyer et al 2012). Mezi analyzovanými vzorky byly i dvojice izolátů, které pocházely z případů dermatofytózy u osob z jedné domácnosti nebo od chovatele a jeho zvířete. U těchto izolátů se předpokládalo, že zůstanou nerozlišeny. Zvířecí izoláty (zejména z morčat) pocházely především ze zvířat chovaných na území Prahy a byly poskytnuty výše zmíněnými pracovišti, nebo Veterinární klinikou Labvet (Jitka Koubková).

Zahraniční kmeny (Tabulka, příloha k práci) byly poskytnuty následujícími pracovišti, nebo sbírkami kultur hub:

- 1) Nihon University School of Veterinary Medicine, Japonsko (Dr. Rui Kano)
- 2) Scientific Institute of Public Health, Belgie (Dr. Dirk Stubbe) - BCCM/IHEM sbírka kultur hub
- 4) University of Illinois at Urbana-Champaign, USA (Dr. Lois L. Hoyer)
- 5) Labor für medizinische Mikrobiologie, Mölbis, Německo (Dr. Pietro Nenoff, Dr. Silke Uhrlaß)
- 6) Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Torino, Itálie (Dr. Andrea Peano)

2.2 Studium fenotypu

Hrubé rozdělení kultur *A. benhamiae* podle fenotypu bylo provedeno podle vzhledu kolonií na agaru se sladinovým extraktem (Oxoid, Londýn, Velká Británie) (MEA) (Atlas 2010). Makromorfologie čtyř vybraných kmenů od každého fenotypu byla dále zkoumána a dokumentována na setu agarových medií, který zahrnoval Sabouraudův glukózový agar (SAB) (Atlas 2010) a bramborovo dextrózový agar (PDA) (Himedia, Bombaj, Indie). Petriho misky (90 mm) s agarovým médiem (bez utěsnění Parafilmem®) byly inokulovány třibodově a kultivovány při teplotě 25, 30 a 37 °C ve tmě v triplikátech. Rychlost růstu byla měřena po 7 a 14 dnech kultivace. Barva kolonií byla charakterizována pomocí vzorníku ISCC-NBS (Kelly 1964). Binolupa Olympus SZ61 (s fotoaparátem Olympus Camedia C-5050 Zoom camera) nebo fotoaparát Canon EOS 500D byly použity pro dokumentaci makromorfologie kolonií. Vybraných deset kmenů od každého zjištěného fenotypu *A. benhamiae*, pět kmenů *T. interdigitale*, čtyři *T. erinacei* a dva kmeny tzv. „africké rasy *A. benhamiae*“

byly podrobeny mikromorfologické analýze. Kultivace před měřením probíhala na MEA ve tmě při 25 °C. Ze sporulujících kultur byl odebrán vzorek, který byl přenesen do laktofenolu s přidavkem bavlnové modři a zkoumán pomocí světelného mikroskopu Olympus BX-51. Obraz byl snímán digitální kamerou Olympus DP72. Měření probíhalo v programu Quick Photo®. Od každého vzorku byla naměřena délka i šířka konidie (vždy 20 měření). Vyřazeno bylo 5% nejodlehlejších hodnot. Statistická analýza metodou ANOVA proběhla a grafy byly vytvořeny v programu SPSS (SPSS 2011). Kromě velikosti mikrokonidií byl sledován také jejich počet, přítomnost a velikost makrokonidií a výskyt spirálních hyf.

2.3 Extrakce DNA

DNA byla extrahována ze 14 dní starých kultur rostoucích na MEA za použití komerčního kitu ArchivePure DNA yeast and Gram2+ kitu (5 PRIME Inc., Gaithersburg, Maryland). Postup izolace se řídil pokyny výrobce. Extrahovaná DNA byla použita pro sekvenční i mikrosatelitní analýzu. Kvalita získané DNA byla kontrolována na spektrofotometru Nanodrop ND-1000.

2.4. Amplifikace cílových genů

Amplifikace oblasti ITS rDNA (z anglického „internal transcribed spacer“, neboli vnitřní přepisovaný mezerník ribozomální DNA), která zahrnuje podoblasti ITS1, 5,8S a ITS2, probíhala za použití primerů uvedených v Tabulce 1. Primery pro amplifikaci genů kódujících proteiny glyceralddehyd-3-fosfát dehydrogenázu (*gpdh*), β -tubulin (*tub2*) a geny MAT lokusu (geny pro párovací typy) jsou také uvedeny v Tabulce 1.

PCR reakční směs o objemu 20 μ l obsahovala 1 μ l genomické DNA, 0,3 μ l každého z dvojice primerů (25 pmol/ μ l), 0,2 μ l MyTaq DNA polymerázy (Bioline, Londýn, UK) a 4 μ l pufru (MyTaq Bioline 5x, obsahující nukleotidy a $MgCl_2$), objem byl doplněn deionizovanou vodou. PCR podmínky všech reakcí byly nastaveny následovně:

1. Iniciální denaturace: 60 s při 95 °C
2. Elongace (35 cyklů): 20 s při 94 °C, 30 s při 55 °C a 60 s při 72 °C
3. Finální elongace: 10 minut při 72 °C

PCR produkty byly zobrazeny na elektroforetogramu (1 % agarózový gel obsahující 0,5 μ g ethidium bromidu; oboje HiMedia, Bombaj, Indie). Přečištění PCR produktů bylo provedeno přesrážením produktů v acetátu sodném (NaOAc) a etanolu podle následujícího postupu:

1. K 18 μ l produktu byly přidány 2 μ l 3M NaOAc a 50 μ l 96 % etanolu
2. Směs byla promíchána a inkubována 10-15 minut při laboratorní teplotě
3. Poté byla směs centrifugována 30 minut při 13 200 rpm a teplotě 22 °C
4. Supernatant byl vylit a k precipitátu bylo přidáno 250 μ l 70 % etanolu
5. Směs byla promíchána a centrifugována při 13 200 rpm, supernatant byl vylit
6. Precipitát byl vysušen inkubací 5-10 minut v termobloku při 65 °C

PCR fragmenty byly sekvenovány oběma koncovými primery použitými pro amplifikaci. Sekvenční analýza byla provedena servisně v Laboratoři sekvenace DNA, biologické sekce PŘF UK, na kapilárním sekvenátoru ABI 3100 Avant Genetic Analyzer.

Sekvence byly upraveny v programu Bioedit v. 7.0.0. Pozice indelů byly transformovány do matice v programu Saqstate (Muller 2006) metodou „modified complex coding“. Z datové matice po překódování indelů byla vytvořena haplotypová síť metodou TCS (Clement et al 2002) v programu Popart (Bandelt et al 1999). Kladogram byl vytvořen Bayesovskou analýzou v programu MrBayes

3.2.2 (Ronquist et al 2012) pomocí Markov Chain Monte Carlo (MCMC) algoritmu, který běžel 1×10^6 generací se dvěma paralelními řetězci. Strom byl vizualizován v programu iTOL (Letunic & Bork 2007).

2.5. Určení pohlavního ladění izolátů

Fragment *MAT1-1* genu, který kóduje alfa box doménu MAT lokusu, byl amplifikován dvojicí primerů MF1 a MF5 (Tab. 1). Amplifikace *MAT1-2* genu, který kóduje HMG (high mobility group) doménu, bylo provedeno pomocí několika různých dvojic primerů (Tab. 1.). PCR reakční směs o objemu 10 μ l obsahovala 0,5 μ l genomické DNA, 0,15 μ l každého z dvojice primerů (25 pmol/ μ l), 0,15 μ l MyTaq DNA polymerázy (Bioline, Londýn, UK) se 4 μ l pufru (MyTaq™ Bioline 5x, obsahujícího nukleotidy a MgCl₂), objem byl doplněn deionizovanou vodou. PCR podmínky všech reakcí byly nastaveny, jak uvedeno výše. PCR produkt byl vizualizován elektroforézou na 1% agarózovém gelu s 0.5 μ g ethidium bromidu (oboje HiMedia, Bombaj, Indie).

2.6 Indukce tvorby pohlavního stádia - křížící pokusy

Od každého unikátního genotypu *A. benhamiae* (kombinace lokusů ITS rDNA a *gpdh*) byly vybrány dva kmeny rozdílného párovacího typu (případně dva kmeny pouze jednoho párovacího typu, pokud nebyl k dispozici opačně laděný izolát daného genotypu). Všechny opačně laděné kmeny byly mezi sebou kříženy ve všech možných kombinacích. Opačně pohlavně laděné izoláty byly ve dvojicích naočkovány na Petriho misky (90 mm) s ovesným agarem (OA) (Difco Laboratories, Detroit, USA) s přidavkem sterilizovaných dětských blondátých vlasů (zdroj keratinu) a zároveň také na GA medium (De Vroey 1964) připravené smícháním agaru (2% w/v) a semen *Guizotia abyssinica* (3% w/v). Přítomnost plodnic byla zjišťována po 3 týdnech kultivace při teplotě 20C a následně každé tři dny pod binokulární lupou. Morfologie pohlavního stádia byla zkoumána a dokumentována jak uvedeno výše.

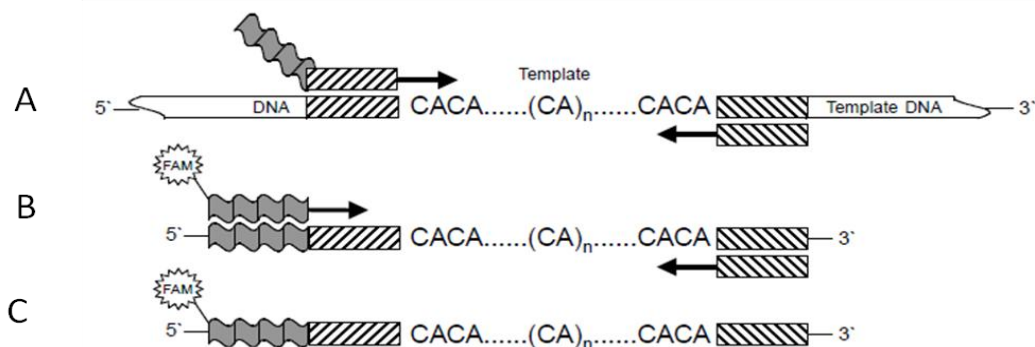
Tabulka 1: Primery použité k amplifikaci fragmentů studovaných genů.

Oblast amplikonu	Forward primer	Sekvence (5'–3')	Reverse primer	Sekvence (5'–3')	Velikost amplikonu (bp)	Zdroj
ITS rDNA	SR6R	AAGTAAAAGTCGTAACAAGG	LR1	GGTTGGTTTCTTTTCCT	677-678	(Gräser et al 1999b)
<i>gpdh</i>	GPD_F	CAGGTTGTGCTGTCAACGAC	GPD_R	GATGTTCTGGGCAGCGGTAC	579	(Kawasaki et al 2008b)
<i>tub2</i>	Bt2a	GGTAACCAAAATCGGTGCTGCTTTC	Bt2b	ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC	480	(O'Donnell & Cigelnik 1997)
<i>MAT-1-1</i>	MF1_ABHMGF	ATGGCCACTACTTCTGGGACC	MF5_ABHMGR	TCATCAAGGAAGTATTTCTGTCG	1115	(Symoens et al 2013)
<i>MAT-1-2</i>	TmHMG3S	CAGATGGTTTTCTGGGAGCA	TmHMG3R	AACACCTGAGACGAAAGCAC	100	(Kano et al 2011)
<i>MAT-1-2</i>	MF3_ABALFAF	AAAATGTCTGGCACCAGAGTCTC	MF6_ABALFAR	TCACATGTCAACGTAGTCATTAA	1207	(Symoens et al 2013)
<i>MAT-1-2</i>	Ab_HMG_for	AGGGAAACTTCAATTCCATCA	Ab_HMG_rev	GACAGCGTGAACAGAGTCTATC	313	Y. Graser (nepublikováno)

2.7 Analýza mikrosatelitních lokusů

Mikrosatelitní lokusy byly vyhledány ve volně dostupné genomové sekvenci druhu *A. benhamiae* (http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/dermatophyte_comparative/MultiDownloads.html) pomocí programu WebSat (Web Static Analyzer Tool) (Martins et al 2009), který zároveň navrhl primery ohraničující lokusy. Při vybírání markerů bylo přihlíženo ke struktuře regionu, který mikrosatelitní lokus obklopoval. Vyřazeny byly lokusy které obsahovaly v přilehlých regiorech více mikrosatelitních motivů (především jednonukleotidová opakování).

Vybrané mikrosatelitní lokusy byly testovány na přítomnost délkového polymorfismu na pilotním setu osmi kmenů *A. benhamiae*. Výběr kmenů probíhal na základě znalosti populační struktury získané dříve analýzou sekvencí *gpdh* genu (každý genotyp byl zastoupen 2 kmeny). Byla zvolena finančně výhodná metoda využívající v PCR reakci kromě dvou primerů, ohraničujících požadovaný úsek, také třetí, univerzální, fluorescenčně značený primer M13 (FAM-TGTAAAACGACGGCCAGT). Tento značený M13 primer během PCR reakce nasedá na komplementární sekvenci produktu, vytvořeného v předchozím kroku pomocí forward primeru, jenž byl modifikován přidáním sekvence M13 primeru ke své vlastní sekvenci (5'-TGTAACGACGGCCAGT.....-3') (Obr. 5). Tímto krokem a následnou syntézou vznikne fluorescenčně značený produkt (jehož součástí je značený M13 primer) a není proto nutné syntetizovat značené sady primerů zvlášť pro každý lokus (Schuelke 2000).



Obrázek 5: Schéma amplifikace značeného produktu pomocí značeného, univerzálního primeru M13. PCR reakce s nasednutím modifikovaného forward primeru (s přidanou M13 sekvencí) a reverz primeru (A). V následných cyklech PCR nasedá univerzální M13 značený primer a reverz primer na produkty předchozí reakce (B). Výsledkem je vznik značeného PCR produktu (C). Převzato ze (Schuelke 2000).

PCR reakční směs o objemu 20 μ l byla vytvořena smícháním 1 μ l izolované genomické DNA, 0,5 μ l (25 pmol) reverse primeru a 25 pmol značeného M13 primeru, 0,13 μ l 25 pmol forward primeru, 4 μ l 5x MyTaq™ Reaction Buffer Red a 0,2 μ l MyTaq DNA polymerázy a do celkového objemu byla doplněna neionizovaná voda. PCR podmínky všech reakcí byly nastaveny následovně:

1. Iničiální denaturace: 1 min při 95°C
2. Elongace 1 (27 cyklů): 30 s při 95 °C, 30 s při 55 °C a 45 s při 72°C
3. Elongace 2 (8 cyklů): 30 s při 95 °C, 30 s při 53 °C a 45 s při 72°C
3. Finální elongace: 10 minut při 72°C

Produkty byly vizualizovány elektroforézou na 1,8 % agarózovém TBE gelu (Tris-borát-EDTA) s 0,5 μ g ethidium bromidu (oboje HiMedia, Bombaj, Indie).

Na fragmentační analýzu byly vzorky připraveny smícháním 1 µl PCR produktu s 0,2 µl fluorescenčně značeného velikostního standardu GeneScan LIZ 600 (Applied Biosystems). Směs byla denaturována přidáním 10 µl deionizovaného formamidu a inkubována 7 minut při 95 °C. Amplifikované fragmenty byly vizualizovány na automatickém sekvenátoru ABI 3100 Avant Genetic Analyzer v Laboratoři sekvenace DNA biologické sekce PŘF UK.

Pro všechny testované páry primerů byly vždy dva nejodlišnější kmeny (na základě délkového polymorfismu PCR fragmentů) osekvenovány (metodika viz výše), aby byl zjištěn polymorfismus oblastí přiléhajících k mikrosatelitnímu lokusu. Pokud produkt neobsahoval požadovanou délkovou repetici, nebo byl délkový polymorfismus způsoben variabilitou v přilehlém regionu, lokusy byly vyřazeny. Důraz byl také kladen na přibližně rovnoměrné rozmístění lokusů napříč genomem. Vybrané lokusy, které vykazovaly nejvyšší míru délkového polymorfismu, byly sestaveny do multiplexu (viz Tab. 2) a servisně syntetizovány byly příslušné fluorescenčně značené primery. Vhodnost použití kombinace primerů v multiplex uspořádání byla ověřena v programu Multiple Primer Analyzer (<https://www.lifetechnologies.com/cz/en/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/thermo-scientific-web-tools/multiple-primer-analyzer.html>).

Pro amplifikaci fragmentů všech mikrosatelitních lokusů v jedné reakci (multiplex) byla vytvořena PCR směs obsahující 1 µl genomické DNA, 0,5 µl směsi všech primerů (podle Tab. 2) a 2,5 µl Multiplex PCR Master Mixu (QIAGEN). Produkty PCR reakce byly vizualizovány elektroforézou na 1,8% agarózovém TBE gelu s ethidium bromidem. PCR produkty (ředěné 1:50 deionizovanou vodou) byly připraveny na fragmentační analýzu, jak bylo uvedeno výše, a následně vizualizovány v programu GeneMarker (Softgenetics LLC, State College, PA, USA).

Tabulka 2: Primery použité k amplifikaci mikrosatelitních lokusů. Název forward primeru zároveň označuje název daného lokusu.

Foward primer	Sekvence (5'–3')	Barva značení	Reverse primer	Sekvence (5'–3')	Koncentrace primerů v PCR reakci	Velikost fragmentu (bp)
(CT) ₂₁	GTGATGTATGTATGTCCCCGTG	NED	(CT) ₂₁ _R	AAGAGAGAGCGAGAGTGGAAGA	0,1	228 -258
(TAG) ₁₆	TGTTTGGATGCTGATGTTAAGG	VIC	(TAG) ₁₆ _R	TTCTTCGTCTTCTCCTGTTTCC	0,1	206-299
(TC) _{17b}	CAATCAGGCGTTTATCCTCTCT	VIC	(TC) _{17b} _R	GGATCACACTAAAGCTGGCAAT	0,1	346-36
(TCA) ₁₆	AAACGACTTCTTCGATACCCA	PET	(TCA) ₁₆ _R	CTTCTTGCTTCTTCGGGTTAAG	0,1	250-316
(TC) _{17a}	GGTAGACACTCGACAACACACG	FAM	(TC) _{17a} _R	GAGGATAGCACGGAACAAAGAC	0,1	260-286
(AG) ₁₈	GCGTTAATTCTCACCGTTACC	FAM	(AG) ₁₈ _R	CGTCGTCTCTTGTGTTTGAC	0,25	347-377
(CT) _{21b}	CTTCTTGTTGCTGCTCTTGTTG	NED	(CT) _{21b} _R	GACGTATCCTAGACATCCTCCG	0,1	271-291
(TC) ₁₉	GCCCCTTATTGAGTCAGTC	FAM	(TC) ₁₉ _R	ACCTGACTCTCGCCATCTGT	0,1	227-241
(TC) ₂₀	TCTTTTCGTCTCCTTCTCCTG	PET	(TC) ₂₀ _R	TCTGTGTTCTTTTCTGACGCTG	0,1	173-197
(AG) ₂₁	CTGAGCCCATATCCAAATTCTC	PET	(AG) ₂₁ _R	CTGAGTTAAGGAGGCAATTCCA	0,25	325-361

2.7.1 Statistická analýza mikrosatelitových dat

Datové matice vytvořené v programu GeneMarker (Softgenetics LLC, State College, Pennsylvanie, USA), byly zbaveny klonů (jedinců se všemi shodnými alelami). Výpočty byly u všech analýz prováděny, jak s maticí zbavenou klonů, tak s maticí původní a výsledky byly porovnány. K vizualizaci struktury mikrosatelitních dat byly použity dva přístupy.

První přístup byl založený na maticích vzdáleností vzniklých na základě párové genetické vzdálenosti mezi jedinci, které byly vypočítány pomocí Jacardova koeficientu (J) pro binární matici v programu FAMD (Schlueter & Harris 2006). Z těchto matic (vždy zbavených klonů) byl ve stejném programu vytvořen metodou Neighbour-joining nezakořeněný fylogenetický strom, upravený v programu FigTree 1.4.2 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>), vizualizovaný v programu iTOL (Letunic & Bork 2007). Program FAMD byl použit i pro mnohorozměrnou analýzu dat metodou PCoA (principal coordinate analysis) zobrazující shluky geneticky podobných jedinců, vizualizované v programu SPSS (SPSS 2011) a také pro tvorbu distanční sítě (Neighbour-network) vykreslené v programu SplitsTree (Huson & Bryant 2006).

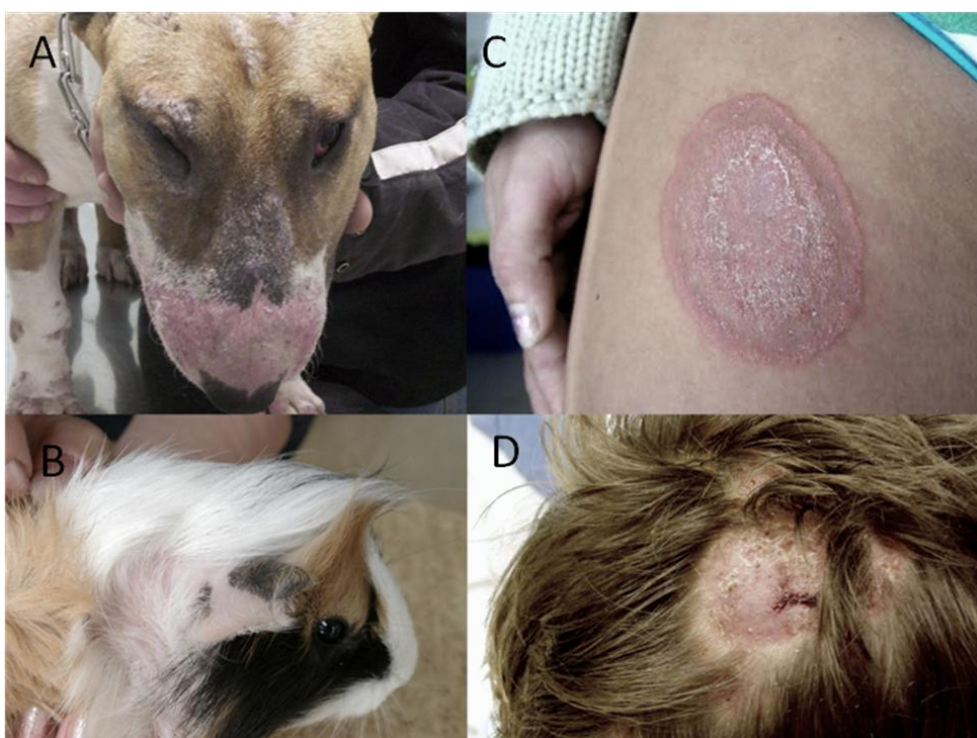
Druhým přístupem byla analýza v programu Structure (Falush et al 2007) pomocí Markov Chain Monte Carlo (MCMC) algoritmu, který pro délkovou matici běžel 1×10^6 generací s deseti paralelními řetězci a rozdělením do 1-10 skupin. Výpočty byly prováděny na serveru BIOPORTAL (<http://www.biportal.uio.no/>). Výstupy z programu byly dále analyzovány v prostředí jazyka R (Venables et al 2011) pomocí skriptu Structure-sum-2011.R (Ehrich 2006) pro zjištění pravděpodobného počtu subpopulací, který reflektuje skutečnou povahu dat. Po zjištění genetické struktury metapopulace byla testována míra genového toku mezi jednotlivými subpopulacemi.

Genetická variabilita v rámci jednotlivých subpopulací a mezi subpopulacemi byla testována pro binární matici metodou AMOVA (analýza molekulární variance) v programu Arlequin (Excoffier & Heckel 2006). Ve stejném programu byl zjišťován i párový fixační index F_{ST} (Weir & Cockerham 1984), kterým udává proporci sdílených alel mezi jednotlivými subpopulacemi. Míra klonality, respektive rekombinace, byla testována nejen pro všechny subpopulace současně, ale i odděleně pro konkrétní dvojice subpopulací stanovením asociačního indexu I_A v programu START (Jolley et al 2001). Tento index stanovuje vazbovou nerovnováhu (nulová hypotéza) mezi vzorky jedné populace. Předpokládá, že klonálním šířením se alely dostanou do vazby, která je rekombinací rozbita. Dalšími veličinami, kterými byla zjišťována míra klonality populací byl efektivní počet genotypů (GE) a genotypová diverzita (G). Spočítáním GE můžeme zjistit, jak relativně dlouho (oproti ostatním subpopulacím) už ke klonálnímu křížení dochází. Při dlouhodobé klonalitě dochází ke snižování efektivního počtu genotypů. Také genotypová diverzita se následkem klonality snižuje. Obě veličiny byly počítány pro binární matici v prostředí jazyka R (Venables et al 2011) pomocí skriptu AFLPdat (Ehrich 2006), kde byl také vytvořen histogram znázorňující rozdělení počtu párových rozdílů mezi jedinci. Grafy znázorňující délkový rozsah jednotlivých mikrosatelitů byly vytvořeny v programu SPSS (SPSS 2011).

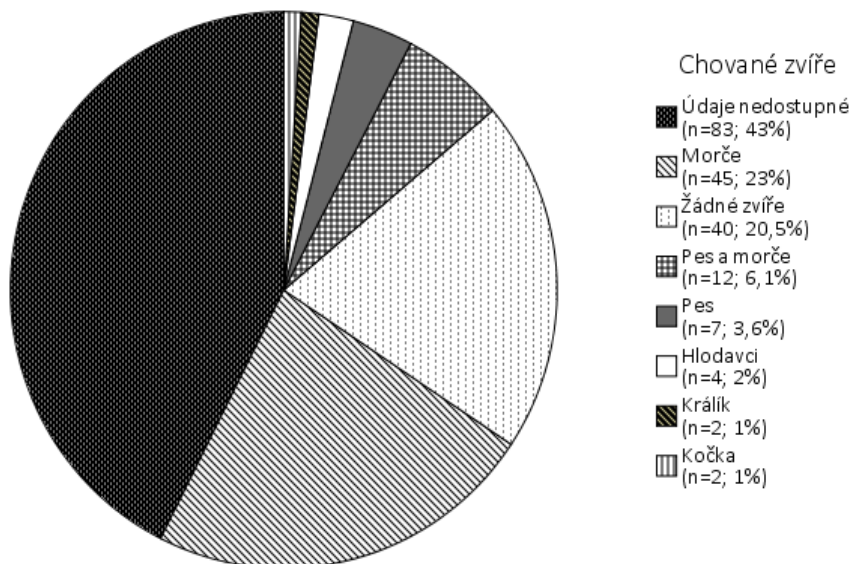
3. VÝSLEDKY

3.1 Epidemiologie

Analýzou získaných anamnestických údajů u vybraných kmenů z ČR (n=195) bylo zjištěno, že většina infekcí (Obr. 6) byla lokalizovaná v oblasti trupu (29,7 % infekcí) a na obličeji (22 %) pacientů, dále byly často postiženy končetiny, jak horní (19 %), tak dolní (19,5 %). Méně často potom byly infekce nalézány v oblasti krku (7 %), na nehtech (7 %) a vlasech (5 %). Častěji byly postiženy ženy (72,3 %) než muži. Věkový medián pacientů byl 11 let. Morče v domácnosti chovali postižení pacienti ve 23 % (n=45) případů, psa ve 4 % (n=7), psa a morče v 6 % (n=12) a jiné zvíře (králíka, jiného hlodavce, kočku) chovali ve 4 % (n=8) případů. Žádné zvíře v domácnosti neudává 21 % pacientů a údaje o zvířeti v domácnosti chyběly ve 42,5 % (viz Obr. 7).



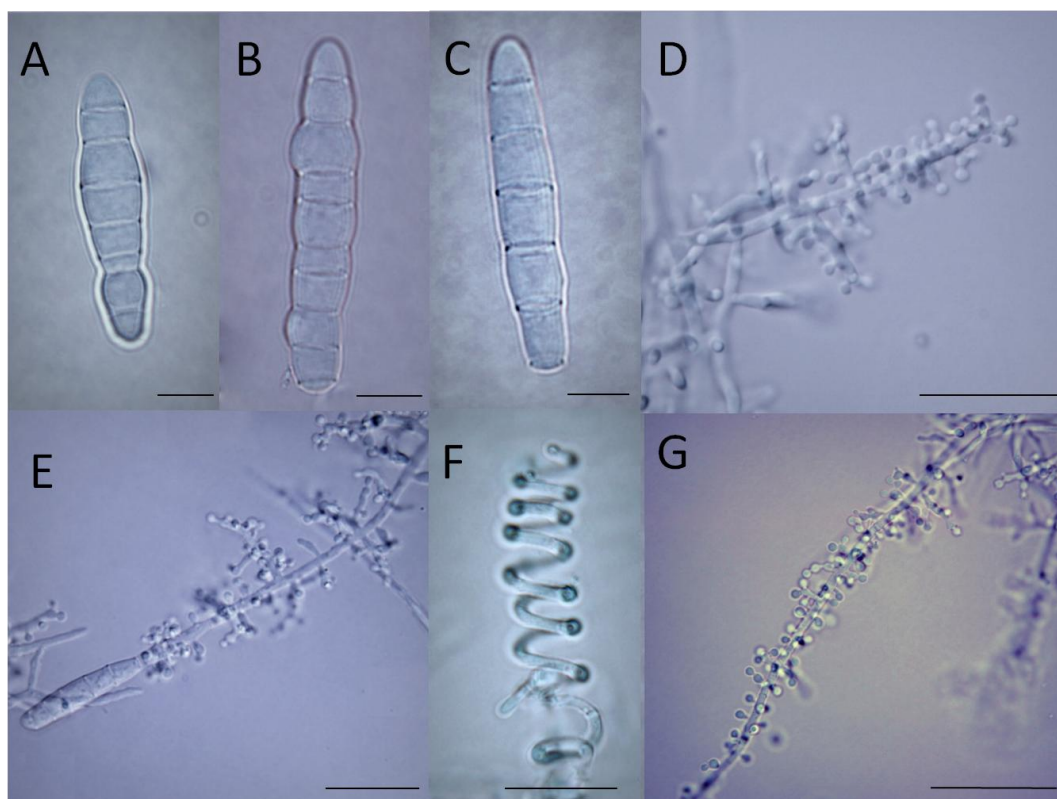
Obrázek 6. Povrchová mykóza vyvolaná druhem *Arthroderma benhamiae* u psa (A - foto Dr. Andrea Peano), morčete (B - foto Jitka Koubková) a člověka (C, D – foto MUDr. Naďa Mallátová).



Obrázek 7: Zvířata chovaná v domácnostech pacientů léčených pro dermatofytózu způsobenou druhem *Arthroderma benhamiae*.

3.2 Studium fenotypu

Studované kmeny (n=268) byly rozděleny na základě fenotypu do čtyř skupin (F1-4) a podskupi. Pro zařazení kmenů do jedné skupiny hrál roli především vzhledu kolonií (barva, textura), rychlost růstu na mediích, přítomnost a četnost makrokonidií (Obr. 8). Spirální vlákna byla vždy přítomná, u všech skupin převažovaly mikrokonidie hruškovitého tvaru (Obr. 8; 9).



Obrázek 8: Mikromorfologie druhu *Arthroderma benhamiae* na MEA agaru po sedmi (respektive 21 – F1 fenotyp) dnech kultivace při 25 °C. Makrokonidie (A; B; C); konidiofor s postraním větvením ve starší kultuře (D) a s nově vznikající makrokonidií (E); spirální hyfa (F); spoře větvený konidiofor vzniklý v mladé kultuře (G). Měřítka: 20 μ m (E,G,B), 5 μ m (A,D, C,F).

F1: nejběžnější skupinu (n=188; 70 %) tvořily kmeny původem z Evropy a kmen (JPN8) z Japonska. Makromorfologie byla zkoumána na kmenech: SK 388; SK 578; SK 26; ME 335; ME 1591; PL 767; DMF 670; DMF 823; SK 823; DMF 909; DMF 1072. Kolonie na SAB po sedmi dnech při 25 °C 16–19 mm (Ø=17 mm), bílé (#F2F3F4), ploché, granulární, difúzní okraj, reverz žlutý (#F3C300) (Obr. 10; A). Kolonie na PDA po sedmi dnech při 25 °C 11–13 mm (Ø=12 mm), světle žluté (#F0EAD6), umbonátní - tzn. s centrálním vyvýšením, radiálně rýhované, okraj jemně pilovitý, reverz žlutý (#F3C300) (Obr. 11; A). Kolonie na MEA po sedmi dnech při 25 °C 13–15 mm (Ø=14 mm), světle žluté (#FAE799), zpočátku hladké, radiálně uspořádané, po 21 dnech střed hrubě granulární, difúzní okraj; reverz žlutý (#F3C300) (Obr. 12; A).

Mikrokonidie 2,5–4,5 (Me=3,2) × 1,7–3,4 (Me=2,4) µm, v hojném počtu vytvářeny až po 21 dnech růstu; makrokonidie nebyly pozorovány.

F2: druhou nejběžnější skupinu (n=43; 16 %) tvořily kmeny výhradně původem z Evropy. Makromorfologie byla zkoumaná na kmenech: ME 1187; ME 962; SK 820; SK 855; DMF 2009; ME 192; ME 67; PL 1281; SK 699. Kolonie na SAB po sedmi dnech při 25 °C až 24–28 mm (Ø=26 mm), bílé (#F2F3F4), ploché, celokrajné, reverz žlutý (#F3C300) (Obr. 10; B). Kolonie na PDA při 25°C po sedmi dnech 19–22 mm (Ø=21 mm), světle žluté (#F0EAD6) až bílé (#F2F3F4), umbonátní, ve středu vatovité, radiálně rýhované, okraj péřitý, reverz žlutý (#F3C300), střed sytě oranžový (#F38400) (Obr. 11; B). Kolonie na MEA po sedmi dnech při 25 °C 26–28 mm (Ø=27 mm), bílé (#F2F3F4), granulární, submerzně narostlý okraj, reverz sytě oranžovočervený (#E25822) a střed žlutý (#F3C300) (Obr. 12, B). U dvou zkoumaných MAT1-1 izolátů (ME 67; DMF 2905) byla nalezena odlišná makromorfologie kultur, které byly na všech mediích podobné F3a fenotypu (viz dole) s výjimkou hnědooranžového (#AE6938) pigmentu vytvářeného na středu reverzu kolonií (Obr. P2; příloha).

Mikrokonidie 1,5–2,8 (Me=2,1) × 2,5–5,2 (Me=3,2), hojné; makrokonidie 3,1–10,6 (Me=5) × 4,6–68,1 (Me=51,2) µm, se 2–7 (Me=4) přepážkami, často s tvarovými deformacemi, v kultuře sporadicky.

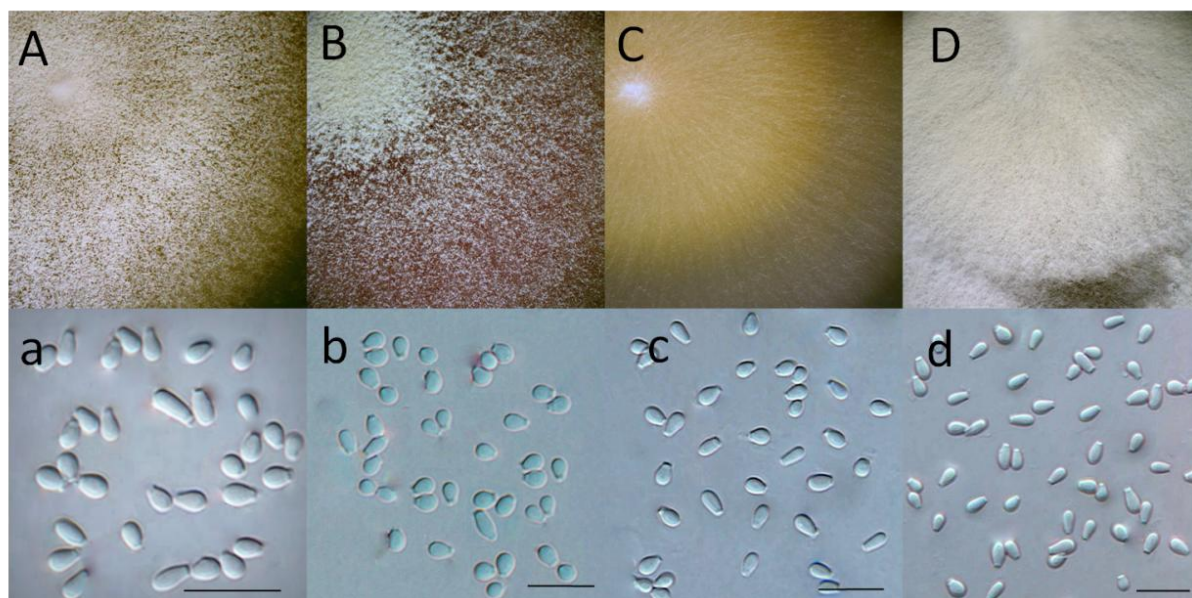
F3: třetí nejběžnější skupinu (n=21; 7,8 %) tvořily kmeny získané z Evropy a Japonska. Makromorfologie byla zkoumaná na kmenech: DMF 2994; D 35; PL 1773; IHEM 25063; JPN10 (JPN_R) a JPN1; JPN2; JPN3; JPN4; JPN6 (JPN_Y). Kmeny byly rozděleny na dvě podskupiny F3a typická pro japonské izoláty, F3b typická pro evropské izoláty. Kolonie na SAB mediu po sedmi dnech při 25 °C 28–30 mm (Ø=30 mm). Kolonie F3a bílé (#F2F3F4), vločkovité, celokrajné, reverz žlutý (#FADA5E) (Obr. 10; E). Kolonie podskupiny F3b světlerůžové (#F9CCCA), výrazně granulární s chmýřitými sektory, okraj difúzní, reverz žlutooranžový (#FFC14F), střed tmavě hnědožlutý (#AA381E) (Obr. 10; F). Kolonie na PDA při 25°C po sedmi dnech při 25 °C 24–27 mm (Ø=25 mm). Kolonie F3a bílé (#F2F3F4), umbonátní, celokrajný, reverz žlutý (#FADA5E) (Obr. 11; E). Kolonie F3b světlerůžové (#F9CCCA), umbonátní, granulární s vatovitým středem, hladký okraj, reverz výrazně červený (#BE0032) (Obr. 11; F). Kolonie MEA po sedmi dnech při 25 °C 28–30 mm (Ø=39 mm). Kolonie podskupiny F3a bílé (#F2F3F4), jemně granulární, celokrajné, reverz světle žlutý (#F8DE7E) (Obr. 12; E). Kolonie podskupiny F3b světlerůžové (#F9CCCA), granulární (koncentricky uspořádané), celokrajné, reverz červený (#BE0032) (Obr. 12; F). Přechod mezi žlutou a červenou formou můžeme pozorovat u kmene IHEM 4030, který si uchovává schopnost produkovat červený pigment, přesto je texturou a barvou povrchu kolonií podobný F3a podskupině (Obr.P3; příloha).

Mikrokonidie 1,7–3,7 (Me=2,3) × 2,5–5,1 (Me= 3,2) µm, ojedinělé (F3a) až hojné (F3b); makrokonidie 5,2–11,2 (Me=5,8) × 11–78,6 (Me=55,2) µm, se 3–8 (–12) přepážkami (Me= 5); hojné v kultuře.

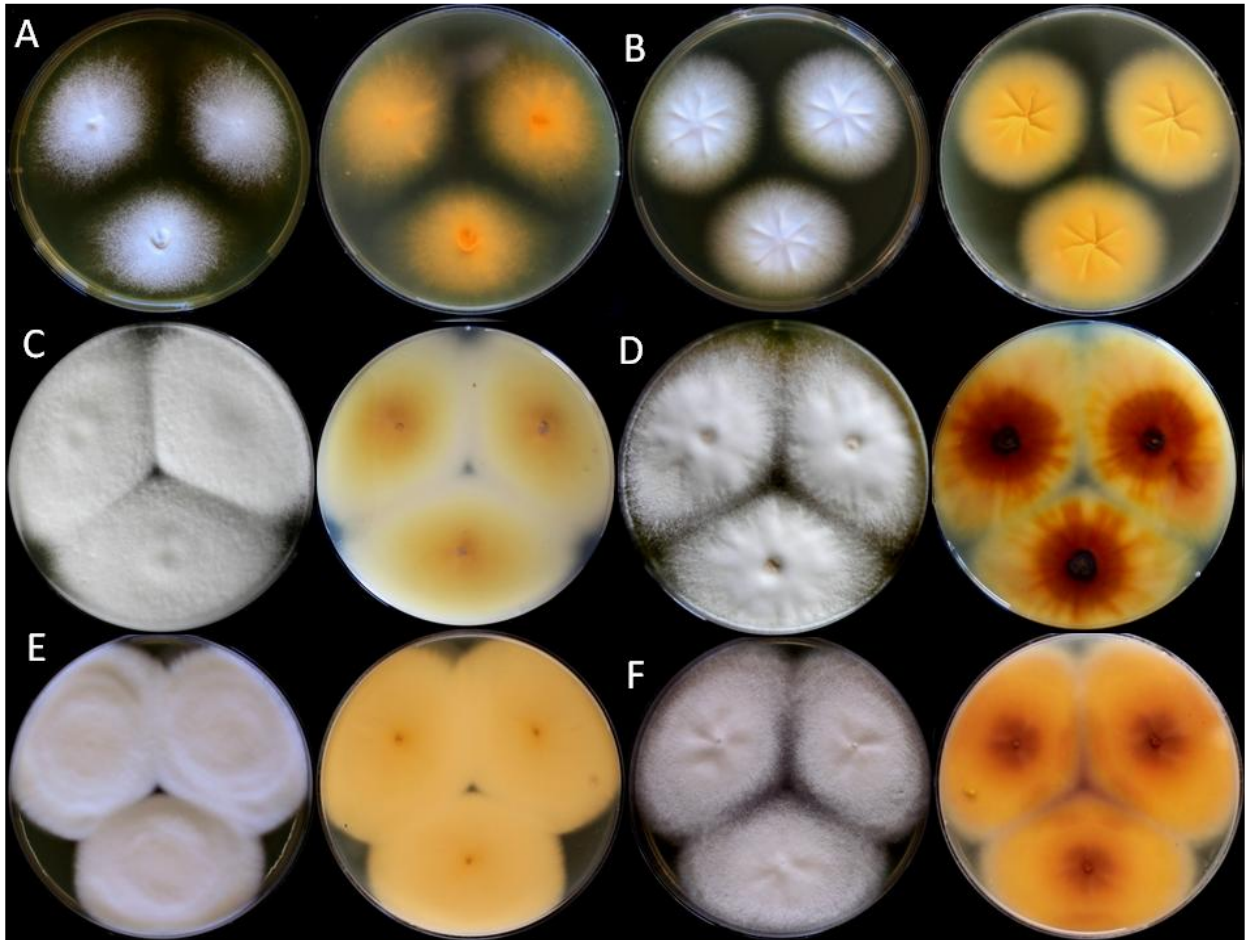
F4: Skupinu s nejmenším počtem izolátů (n=16; 6 %) tvořily kmeny výhradně z USA. Makromorfologie byla zkoumaná na kmenech: USA 3216; USA 3350; USA 3355; USA 3360; USA 3371 (F4a); USA 3208; USA 3209; USA 3220; USA 3229; USA 3356 (F4b). Kmeny byly rozděleny na podskupiny F4a a F4b. Kolonie na SAB po sedmi dnech při 25 °C 31–34 mm (Ø=33 mm). Kolonie podskupiny F4a světle žlutošedé (#C7ADA3), vatovité, celokrajné, revers bílý (#F2F3F4) střed oranžovožlutý (#FBC97F) (Obr. 10; C). Kolonie F4b bílé (#F2F3F4), vločkovité, difúzní okraj, umbonátní s několika radiálními rýhami, revers žlutý (#F3C300), střed tmavě oranžovočervený (#AA381E) (Obr. 10; D). Kolonie na PDA po sedmi dnech při 25 °C 30–32 mm (Ø=31 mm). Kolonie F4a světle žluté (#FAD6A5), umbonátní, vatovité, celokrajné, revers růžovožlutý (#ECD5C5) (Obr. 11; C). Kolonie F4b bílá (#F2F3F4), vločkovité až granulární s vatovitými sektory, difúzní okraj, revers žlutý (#F8DE7E) s paprskovitou tvorbou červeného pigmentu (#BE0032) (Obr. 11; D). Kolonie na MEA po sedmi dnech při 25 °C 33–35 mm (Ø=35 mm). Kolonie podskupiny F4a světle žlutošedé (#C7ADA3), vatovité, difúzní okraj, revers oranžovožlutý (#FAD6A5) (Obr. 12; C). Kolonie podskupiny F4b světle žluté (#FAD6A5), granulární, difúzní okraj, revers žlutý (#F8DE7E) s občasnou tvorbou červeného pigmentu (#BE0032) (Obr. 12; D).

Mikrokonidie 1,7–3,5 (Me=2,6) × 2,7–6,1 (Me=3,8) µm, hojně; makrokonidie 4,3–7,7 (Me=6,1) × 23–82 (Me=59,2) µm, se 4–7 (Me= 5) přepážkami, sporadicky přítomné.

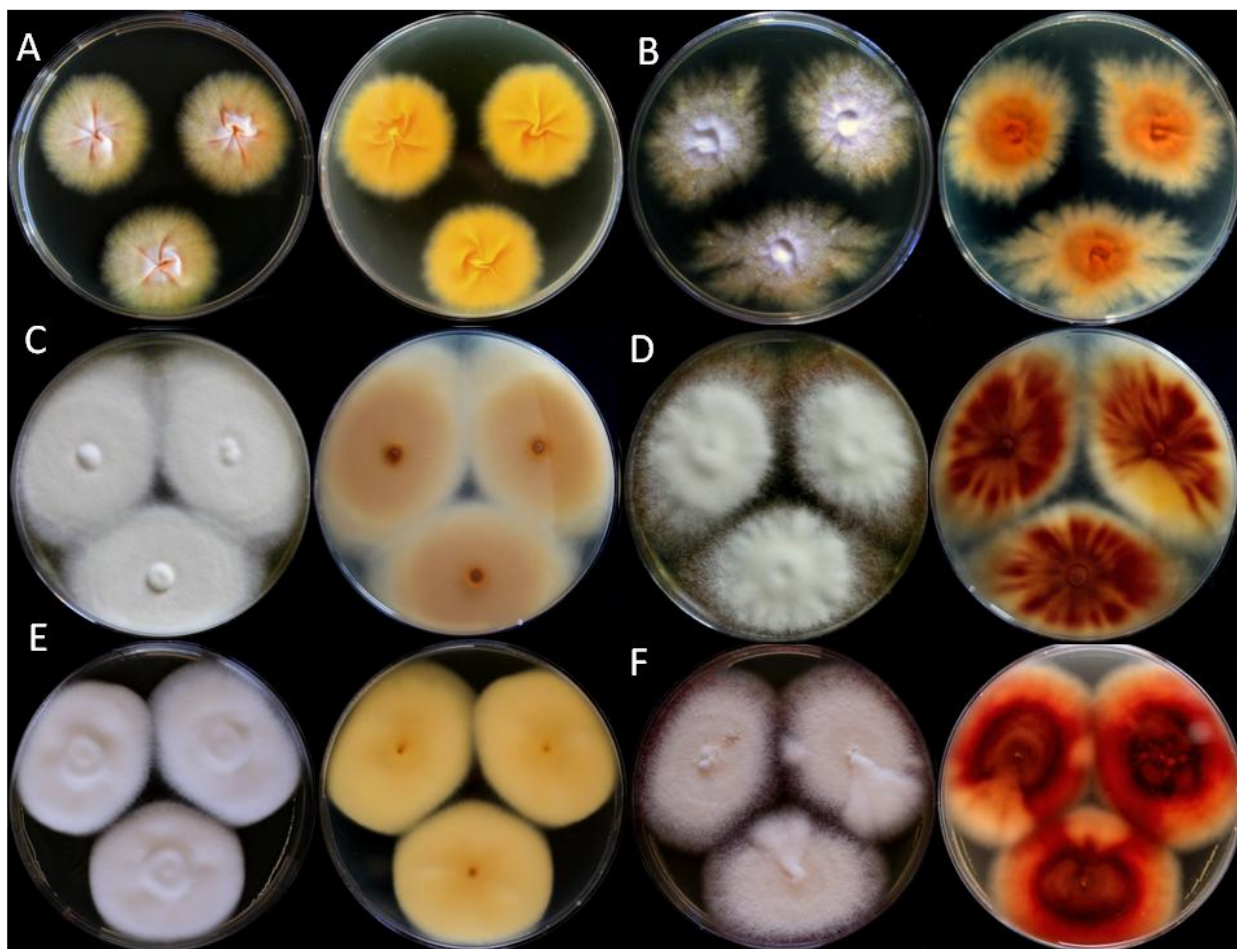
Mezi jednotlivými fenotypovými skupinami druhu *A. benhamiae* byly nalezeny metodou analýzy rozptylu (po zprůměrování hodnot pro každý kmen) statisticky významné (p<0,005) rozdíly v délce i šířce mikrokonidií, kromě F1 a F3 skupiny (Obr. 13). Testovaná data měla normální rozdělení podle Shapiro-Wilkova testu normality po odstranění odlehlých hodnot. Fenotypové skupiny se od sebe statisticky významně (p<0,005) odlišovaly v rychlosti růstu na různých mediích (SAB, PDA, MEA) při 25 °C. Při teplotách 30 °C a 37 °C nebyly tyto rozdíly statisticky významné pro všechny skupiny (Obr. 14).



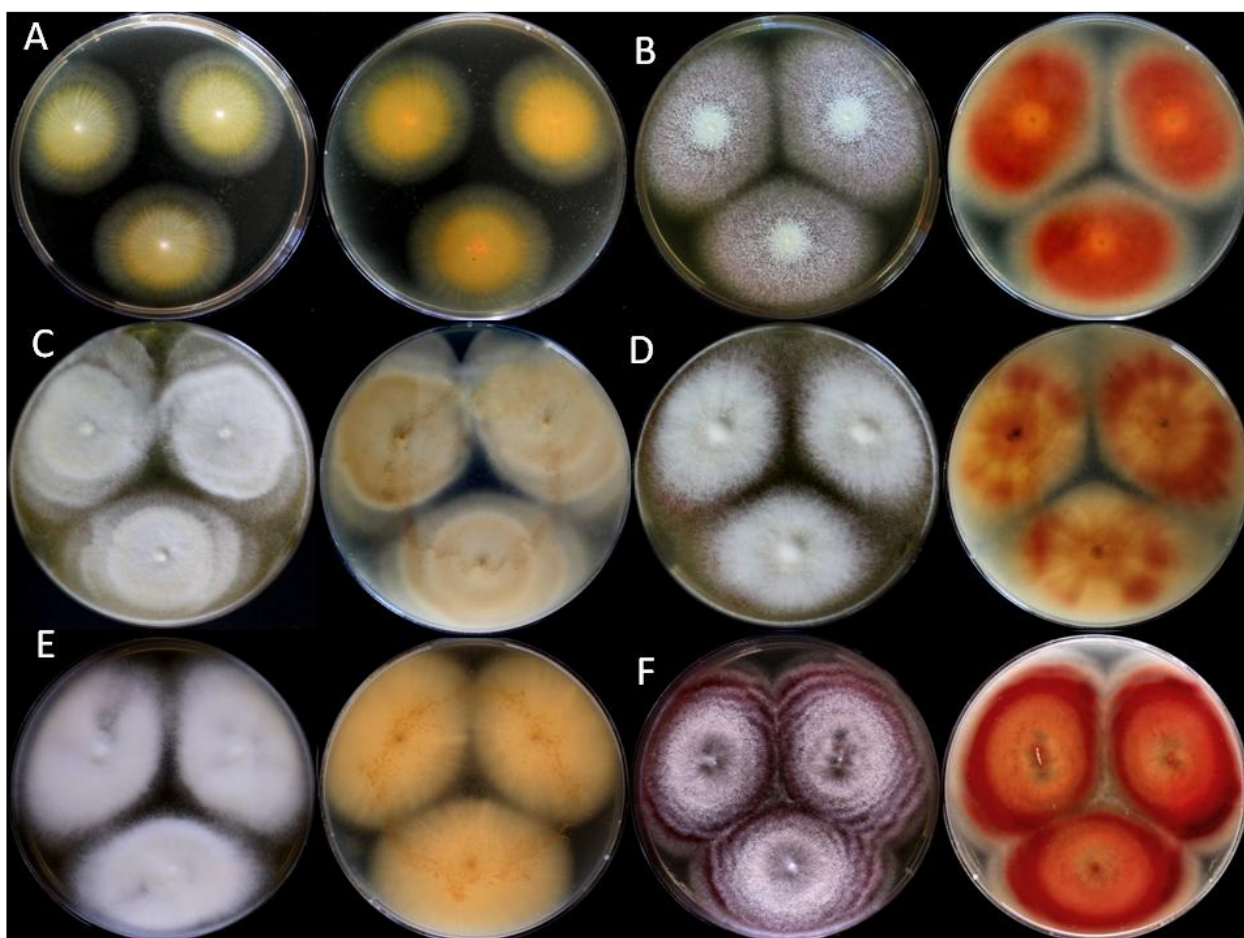
Obrázek 9: Textura kolonií a tvar konidií F4 (A; a), F2 (B; b), F1 (C; c) a F3 (D; d) skupiny druhu *Arthroderma benhamiae* po 14 dnech kultivace při 25 °C na MEA. Povrch kultur jednotlivých fenotypů se pohyboval od výrazně granulární, přes jemně granulární, hladký až sametový. Různé tvary konidií byly nacházeny napříč všemi skupinami, nejčastěji se objevoval hruškovitý tvar. Měřítka 10 µm.



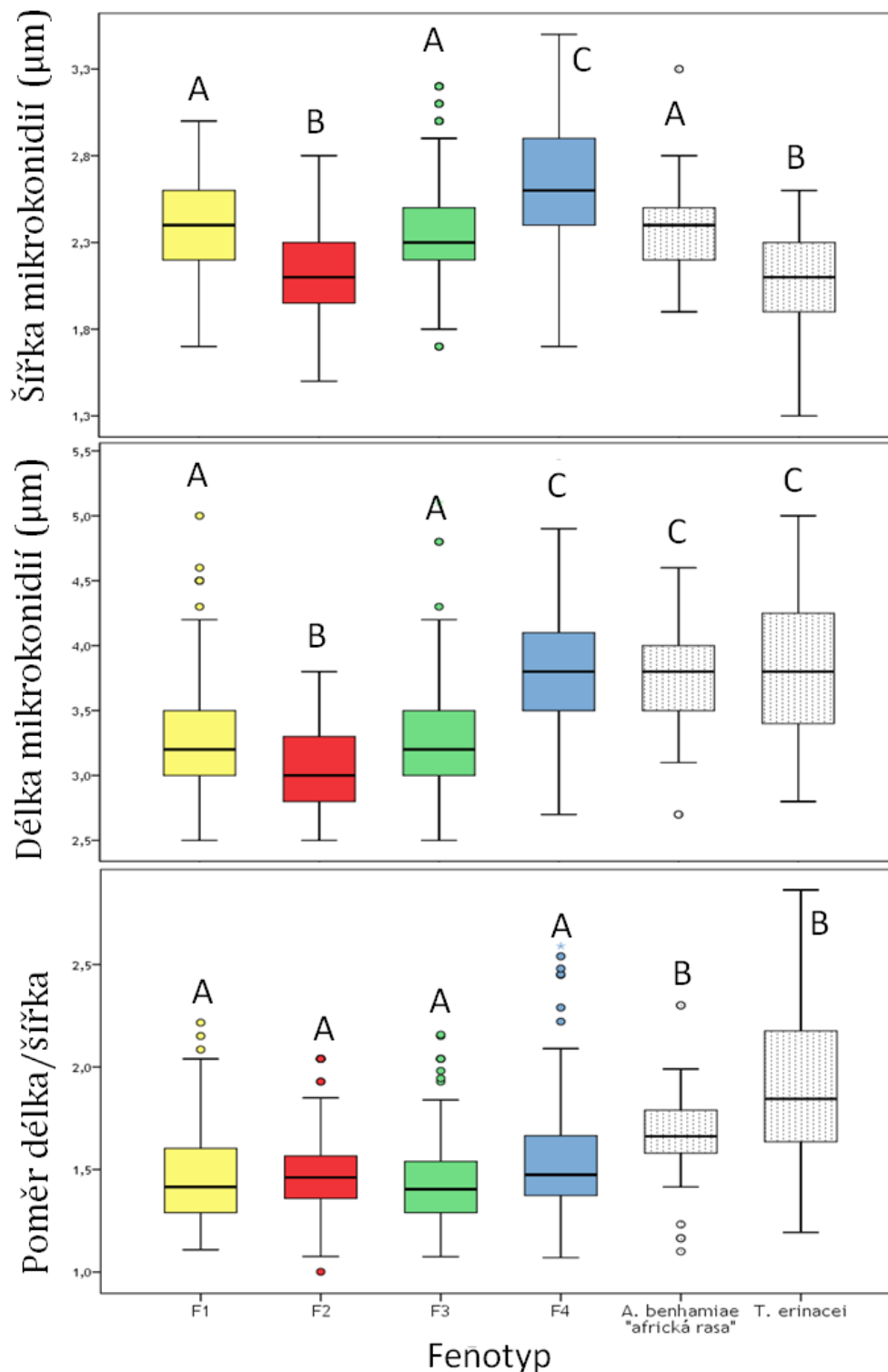
Obrázek 10: Makromorfologie kmenů druhu *Arthroderma benhamiae* kultivovaných na SAB mediu po 14 dnech při 25 °C. Kolonie a reverz kolonií skupiny: F1 (kmen DMF 813) (A); F2 (SK 699) (B); F4a podskupina (USA 3360) (C); F4b podskupina (USA 3356) (D); F3a podskupina (JPN2) (E); F3b podskupina (JPN 10) (F).



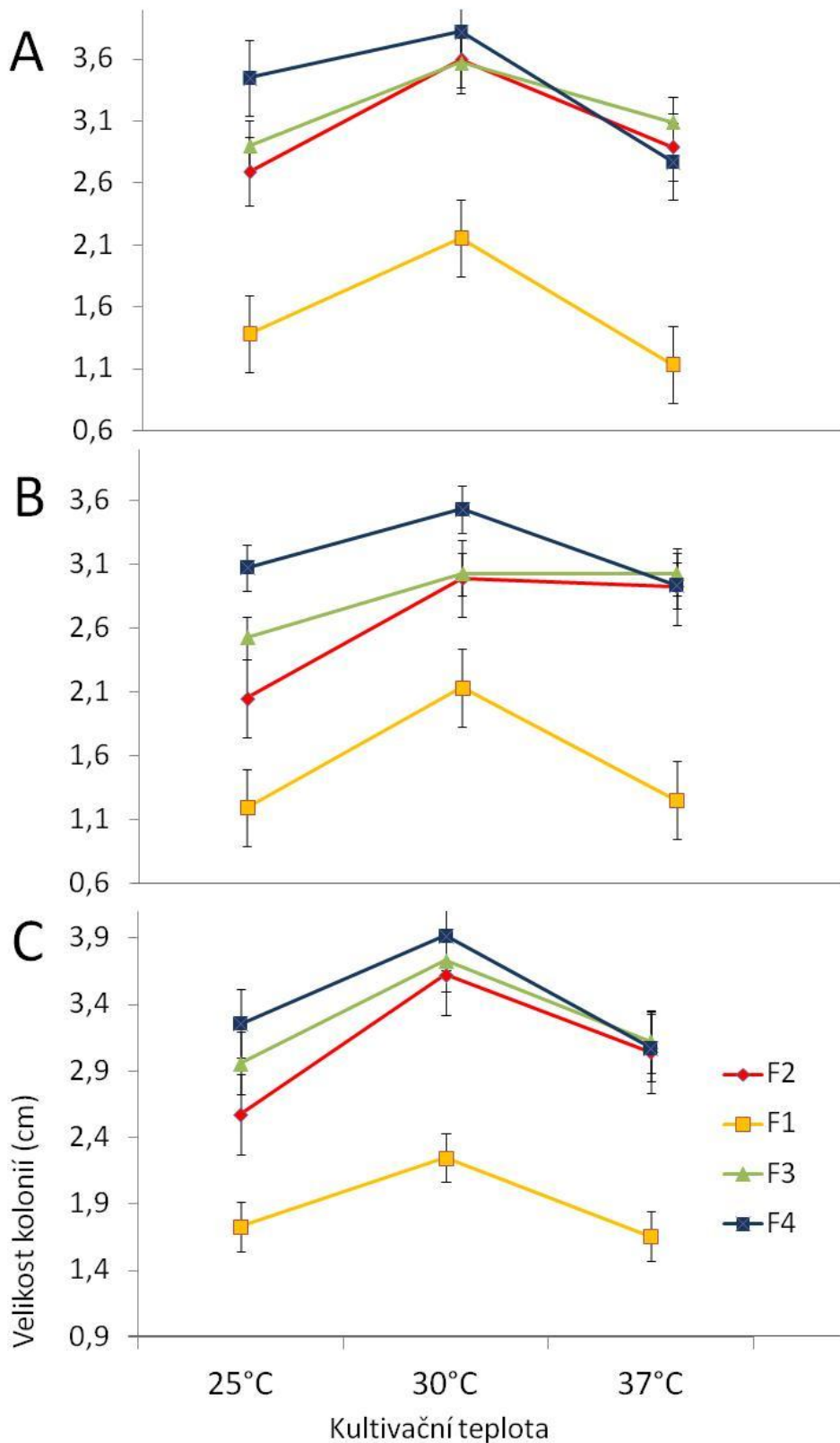
Obrázek 11: Makromorfologie kmenů druhu *Arthroderma benhamiae* kultivovaných na PDA agaru po 14 dnech při 25 °C. Kolonie a reverz kolonií skupiny: F1 (kmen DMF 813) (A); F2 (SK 699) (B); F4a podskupina (USA 3360) (C); F4b podskupina (USA 3356) (D); F3a podskupina (JPN2) (E); F3b podskupina (JPN 10) (F).



Obrázek 12: Makromorfologie kmenů *Arthroderma benhamiae* kultivovaných po 14 dnech při 25 °C na MEA mediu. Kolonie a reverz kolonií skupiny: F1 (kmen DMF 813) A); F2 (SK 699) (B); F4a podskupina (USA 3360) (C); F4b podskupina (USA 3356) (D); F3a podskupina (JPN2) (E); F3b podskupina (JPN 10) (F).



Obrázek 13: Porovnání rozměrů mikrokonidií mezi hlavními fenotypovými skupinami *Arthroderma benhamiae* a příbuznými druhy. Šířka (A), délka (B) a poměr délky/šířky mikrokonidií (C) u testovaného setu vzorků kultivovaného při 25 °C sedm dní (respektive 14 dní – F1 fenotyp) na MEA agaru. Jednotlivé kmeny *A. benhamiae* byly rozděleny podle morfologie na F1, F2, F3 a F4 skupinu (v každé skupině bylo zkoumáno 10 kmenů). Zahrnuty byly také fylogeneticky blízké příbuzné druhy (v obrázku odlišeny šrafováním): „africká rasa *A. benhamiae*“ (n=2), *Trichophyton erinacei* (n=4). Rozdílná písmena znázorňují významné rozdíly mezi skupinami zjištěné analýzou ANOVA (p<0,005). Střední horizontální linie značí medián, horizontální linie nad a pod mediánem vymezují interkvartilové rozpětí, vnitřní a vnější hradby jsou definované jako 1,5 interkvartilového rozpětí. Kolečka označují odlehlé hodnoty; hvězdičky extrémně odlehlé hodnoty.



Obrázek 14: Průměrná velikost 7-denních kolonií v závislosti na kultivační teplotě (25, 30, 37 °C) a kultivaci na odlišných médiích: SAB (A), PDA (B), MEA (C), vynesena pro jednotlivé fenotypové skupiny (F1, F2, F3, F4). Pro každou fenotypovou skupinu byly měřeny čtyři kmeny, vždy 3 hodnoty pro každý kmen. Svislé úsečky značí intervaly spolehlivosti směrodatné odchylky.

3.3 Sekvenční analýza a analýza MAT genů

Sekvenční analýzou tří lokusů bylo mezi kmeny druhu *A. benhamiae* (n=268) odhaleno šest genotypů (Obr. 15), které do značné míry respektují rozdělení do fenotypových skupin. Šest alel bylo nalezeno analýzou ITS oblasti rDNA a čtyři alely analýzou genu pro glycerinaldehyd-3-fosfát dehydrogenázu (*gpdh*) (GenBank: LN874019 - LN874030). Sekvenční analýzou genu pro β -tubulin (*tub2*) u reprezentativní části kmenů (u zástupců všech genotypů zjištěných předchozí sekvenční analýzou; n=98), nebyla nalezena žádná variabilita, a proto bylo od amplifikace genu u všech izolátů upuštěno. Problematická byla amplifikace *MAT1-2* idiomorfy. Některé primery amplifikovaly HMG doménu pouze u některých kmenů (dvojice primerů MF3/MF6), jiné slabě amplifikovali HMG doménu i u části *MAT1-1* kmenů (dvojice primerů TmHMG3S/3R), proto se pro kontrolu použilo více párů primerů uvedených v tabulce 1.

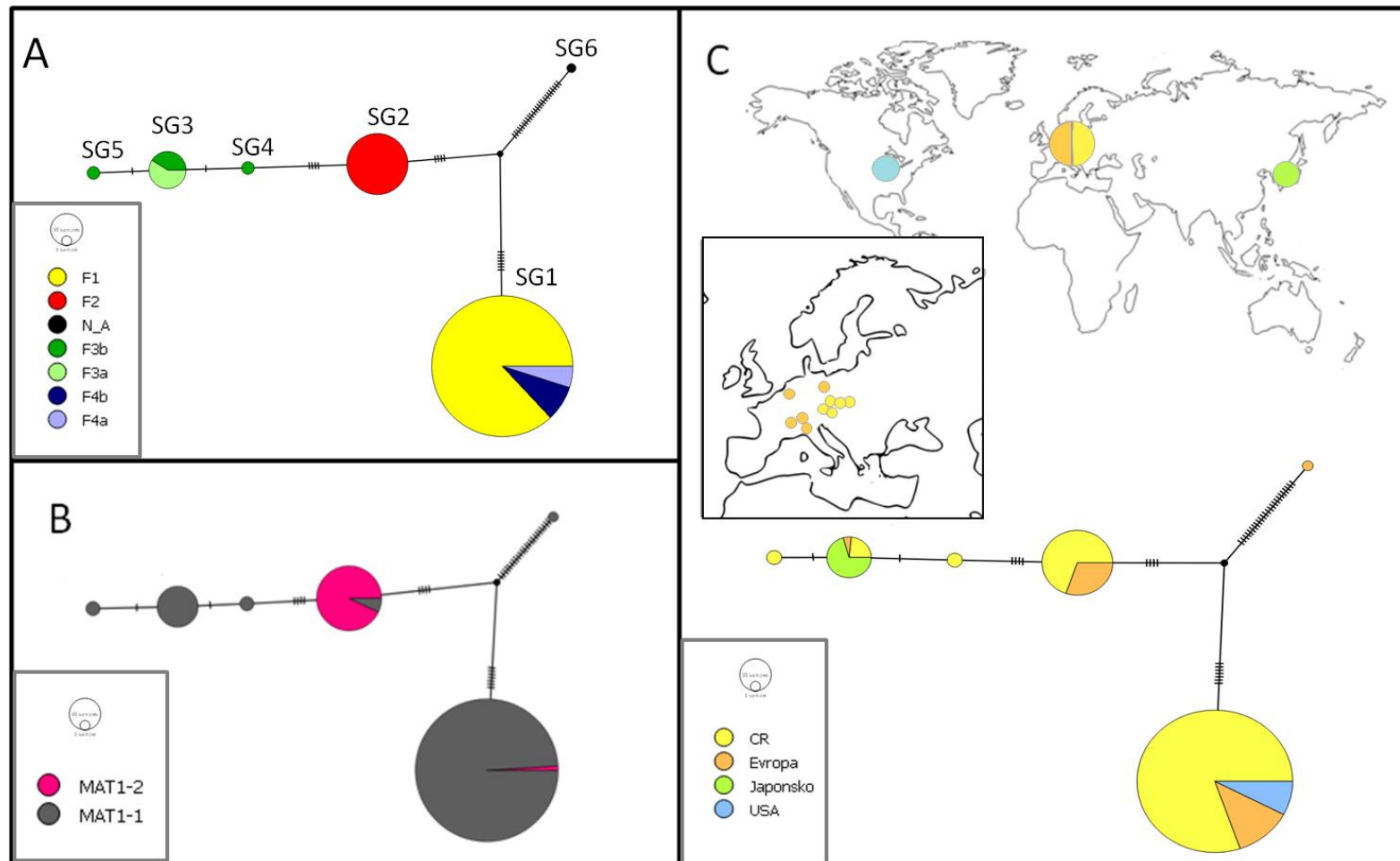
Genotyp SG1: Nejběžnější genotyp byl reprezentován 75,8 % (n=204) všech vzorků. Do tohoto genotypu kromě velké části evropských kmenů a jednoho kmenu z Japonska (JPN8) tvořící F1 morfologickou skupinu spadaly také všechny kmeny z USA, tvořící F4 morfologickou skupinu. Evropské kmeny a jeden japonský byly charakteristické přítomností pouze *MAT1-1* párovacího typu. Naopak u amerických kmenů byla nalezena *MAT1-1* (n=14) i *MAT1-2* (n=2) idiomorfa (Obr. 15). SG1 genotyp byl od následujícího SG2 a SG3 výrazně vzdálen: o 5 (respektive 7) substitucí v ITS1 a ITS2 oblasti a jednou delecí v oblasti ITS2, a 5 (respektive 8) substitucemi v nekódující oblasti genu pro *gpdh*.

Genotyp SG2: Druhý nejčastější genotyp 15,9 % (n=43) byl reprezentován pouze evropskými kmeny s fenotypem F2. Představovaly jej jak kmeny s *MAT1-1* (n=39), tak kmeny s *MAT1-2* (n=4) idiomorfou.

Genotyp SG3: Třetí nejčastější genotyp 6,3 % (n=17) reprezentovala část evropských a všechny japonské kmeny (mimo JPN8) vykazující fenotyp F3. U všech kmenů byla zjištěna pouze *MAT1-1* idiomorfa.

Genotypy SG4; SG5: Tyto genotypy byly blízké příbuzné genotypu SG3 a byly zastoupeny v obou případech pouze dvěma izoláty původem z ČR. U kmenů byla přítomná pouze *MAT1-1* idiomorfa a patřily k fenotypu F3a.

Genotyp SG6: Poslední genotyp reprezentoval pouze jediný kmen IHEM 19628 s unikátním fenotypem, izolovaný v Belgii v roce 1997. Kmeny byl geneticky velmi vzdálený od všech ostatních genotypů (8 substitucí v ITS, 7 v *gpdh* od nejbližšího genotypu SG2).

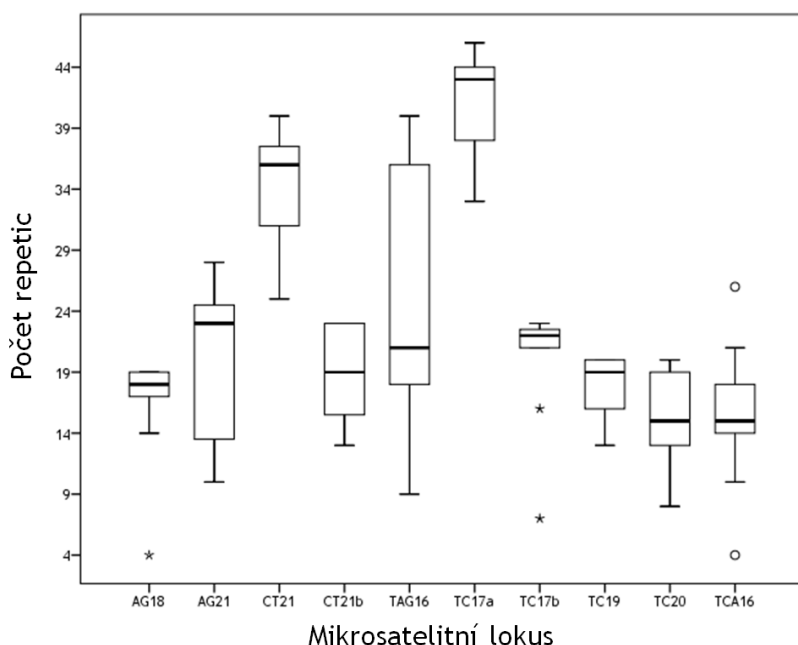


Obrázek 15: Haplotypová síť znázorňující vnitrodruhovou variabilitu druhu *Arthroderma benhamiae* založená na kombinaci sekvencí oblasti ITS rDNA a genu *gpdh*, vytvořená metodou TCS [Templeton, Crandall a Singh] v programu Popart (Leigh et al 2013). Velikost koláčových diagramů odpovídá počtu analyzovaných kmenů. První haplotypová síť znázorňuje příslušnost kmenů k jedné ze čtyř morfologických skupin (F1,F2,F3,F4) a podskupin v rámci fenotypů F3a F3b a F4a F4b (A); druhá síť znázorňuje příslušnost kmenů k jedné ze dvou idiomorfů MAT genu (*MAT1-1* nebo *MAT1-2*) (B); třetí haplotypová síť znázorňuje příslušnost kmenů k jednotlivým lokalitám: Česká Republika, Evropa, Japonsko a USA. Jednotlivé lokality jsou znázorněny na mapě Světa (respektive Evropy).

3.4 Analýza mikrosatelitních dat

Z genomu druhu *A. benhamiae* (kmen CBS 112371) bylo vybráno 160 mikrosatelitních markerů s di- nebo trinukleotidovým motivem a délkou repetice větší než jedenáct opakování. U 83 takto nalezených lokusů se podařilo amplifikovat produkt, který pouze ve 24 případech obsahoval požadovanou repetici, byl délkově polymorfní a nebyl polymorfní v přilehlé oblasti k lokusu. Z těchto 24 lokusů bylo vybráno deset variabilních (viz Tab. 2), přibližně rovnoměrně rozmístěných v genomu *A. benhamiae*.

Vybraných deset variabilních lokusů bylo následně použito pro analýzu vnitrodruhové struktury kmenů *A. benhamiae* (n=268). Při kombinaci všech 10 lokusů bylo odhaleno 32 unikátních haplotypů (viz Tab. P1, příloha). Pro každý lokus a pro všechny lokusy dohromady byl spočítán Shannonův index diverzity (Tab. P1, příloha). Nejvíce alel bylo nalezeno u lokusu TAG₁₆ (n=13), dále u lokusu CT₂₁ (n=9), TCA₁₆ (n=9) a TC_{17a} (n=7). Naopak nejméně alel bylo nalezeno u lokusu TC_{17b} (n=5). U ostatních lokusů bylo nalezeno shodně 6 alel (Tab. P4; příloha). Amplifikovat produkt se podařilo u všech kmenů a všech lokusů (nebyly zjištěny nulové alely). Počet repetic alel (respektive délka fragmentu) jednotlivých lokusů je graficky znázorněna obrázkem 16. Až na výjimky byly od sebe vzorky svým délkovým polymorfismem v rámci jednotlivých lokusů rovnoměrně vzdálené na délku maximálně čtyř repetic (Tab. P4, příloha). U některých lokusů se vyskytl i výrazně větší rozdíl, a sice u lokusu TC_{17b} (rozdíl v délce 9 repetic; 328 bp a 345 bp); AG₂₁ (7 repetic; 325 a 339 bp) a TCA₁₆ (6 repetic; 250 a 268 bp). Takto odlehlý byl ve většině případů pouze kmen IHEM 19628 podobně jako při analýze DNA sekvencí. Nově navržené molekulární markery byly použity také u druhu *T. erinacei* a tzv. „africké rasy“ *A. benhamiae*, u kterých se podařily amplifikovat všechny lokusy (mimo lokus TAG₁₆).



Obrázek 16: Délkový rozsah jednotlivých mikrosatelitních lokusů udaný v počtech repetic. Dataset byl zbaven klonů. Střední horizontální linie značí medián, horizontální linie nad a pod mediánem vymezují interkvartilové rozpětí, vnitřní a vnější hradby jsou definované jako 1,5 interkvartilového rozpětí. Kolečka označují odlehlé hodnoty; hvězdičky extrémně odlehlé hodnoty.

3.4.1 Molekulárně genetická struktura populace *A. benhamiae*

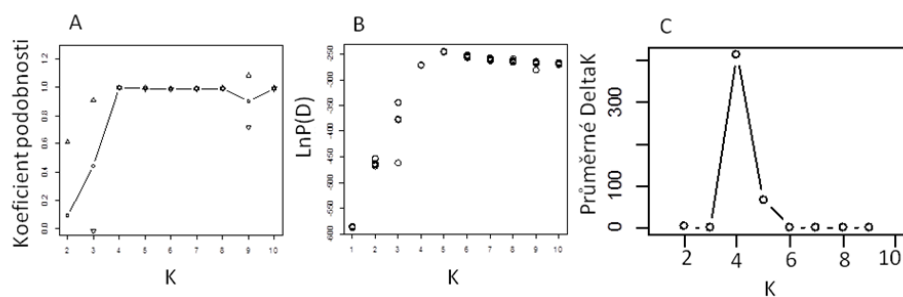
Jako nejvhodnější výstup z programu Structure bylo zjištěno rozdělení populace do čtyř subpopulací (Obr. 17; 18). Kromě toho byla genetická struktura populace zkoumána i určením párové genetické vzdálenosti mezi jedinci (viz Obr. 19, 20, 21), vždy však došlo k hrubému rozdělení kmenů do čtyř subpopulací (MG1-4). Výsledky, které nejvíce reflektují skutečnou povahu dat, byly dosaženy při použití matice zbavené klonů (pro srovnání: výstup z programu Structure při použití původní matice - Obr. P4; P5; příloha).

MG1: I přes vysoký počet izolátů této subpopulace ($n=188$, 64,3 %), který odpovídá fenotypu F1, byl mezi izoláty odhalen jen velmi nízký polymorfismus (7 genotypů). Výrazné bylo zejména rozdělení skupiny do dvou genotypů podle lokusu TAG₁₆ s alelou 281 ($n=100$) a 284 ($n=21$). Mezi těmito genotypy ale nebyly nalezeny žádné rozdíly, ať už v morfologii nebo v anamnestických údajích pacientů (na 5 % hladině významnosti byla korelace velmi slabá, Cramerův koeficient vyšel 0,123 pro lokalizace infekce; 0,024 pro pohlaví; Kendallův tau koeficient vyšel 0,445 pro věk) (viz Obr. P7, P8 příloha). Velmi vzdálenými izoláty v rámci této subpopulace od genotypu zastoupeného největším počtem kmenů ($n=149$) byly kmeny: IHEM 25074 a JPN8. Kmen JPN8 byl jako jediný izolovaný z případu dematofytózy osmáka degu (*Octodon degus*) a jde také o jediného zástupce MG1 genotypu izolovaného na jiné lokalitě než v Evropě.

MG2: subpopulace MG2 odpovídající fenotypu F2 ($n=43$) byla naopak velmi polymorfní oproti MG1. Celkem byla rozdělena do 10 genotypů. Od subpopulace byl výrazně oddělen kmen IHEM 25139 izolovaný v roce 1963 ve Francii.

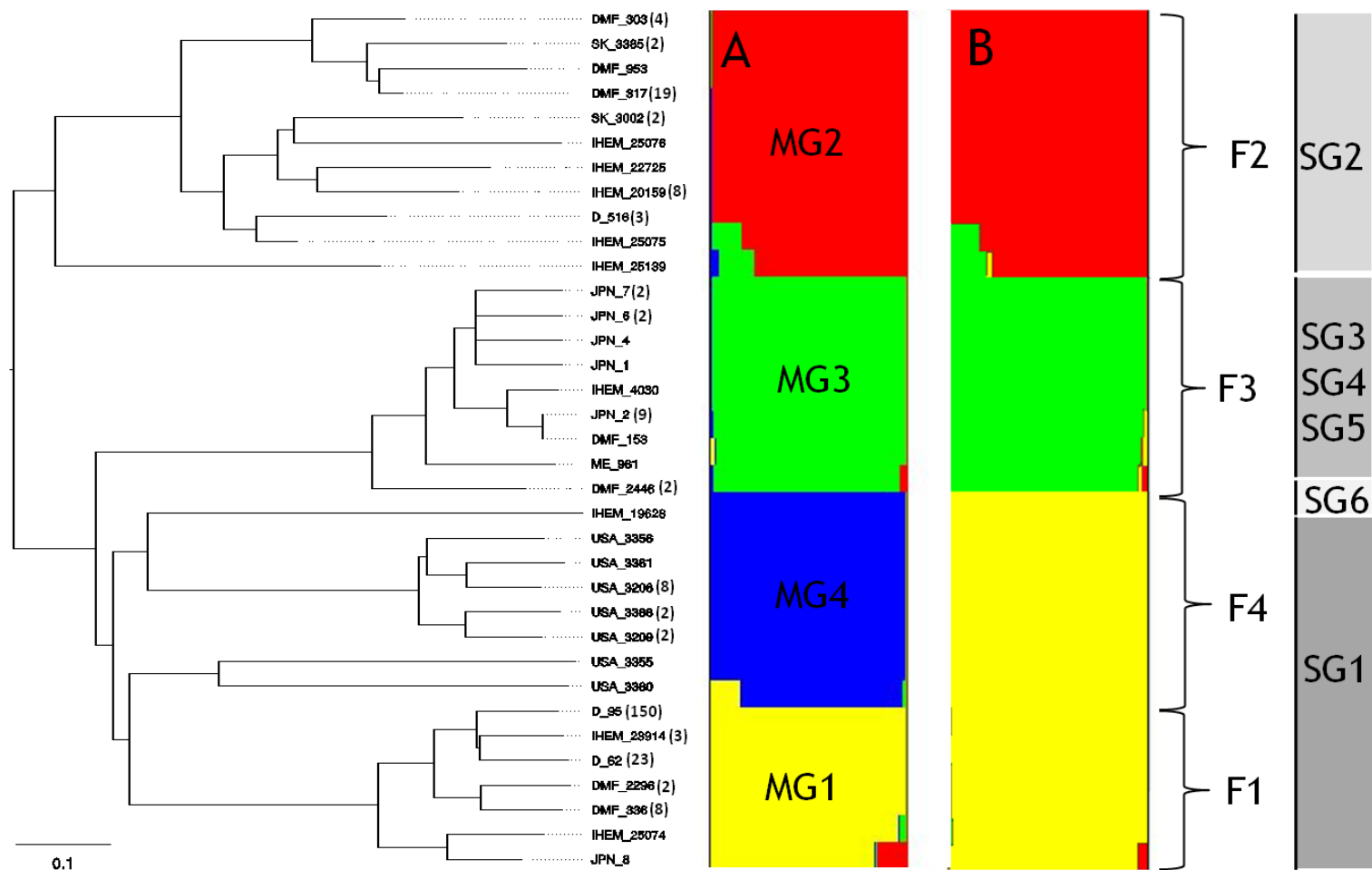
MG3: subpopulace MG3 odpovídající fenotypu F3 ($n=21$) zahrnovala velké množství genotypů ($n=9$), polymorní však byla především v jednom markeru (TAG₁₆). Výrazně od ostatních kmenů byl oddělen pouze český kmen DMF 2446, který fenotypem, datem izolace, ani s ním souvisejícími anamnestickými daty nevybočoval oproti ostatním kmenům subpopulace MG3.

MG4: subpopulace MG4 odpovídající fenotypu F4 ($n=16$) zahrnovala 7 genotypů. Na rozdíl od sekvenčních dat mikrosatelitní data tuto subpopulaci oddělila od genotypu MG1 (subpopulace MG1 a MG4 zůstaly v sekvenčních datech nerozlišeny jako genotyp SG1). Navíc se z této skupiny oddělily kmeny USA 3355 a USA 3360, které jsou jako jediné z amerických kmenů párovacího typu MAT1-2. Tyto kmeny mají některé alely společné se subpopulací MG1. V blízkosti této skupiny se nacházel také kmen IHEM 19628, který je však stále velmi vzdálený od ostatních kmenů.

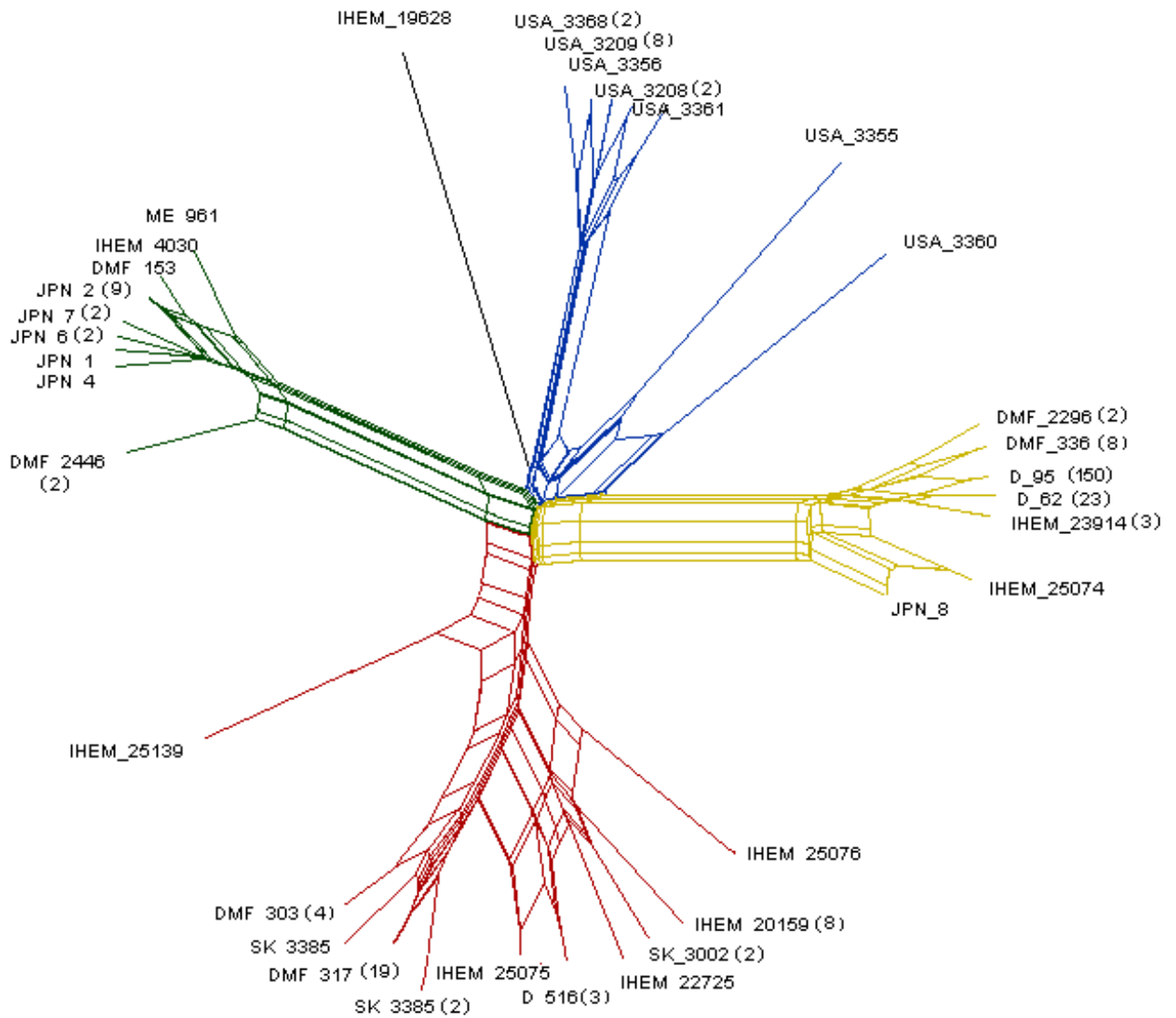


Obrázek 17: Charakteristiky jednotlivých běhů programu Structure ukazující na rozdělení datasetu do optimálního počtu skupin (K). Koefficient podobnosti (A) a logaritmus pravděpodobnosti (LnP) (B) mezi jednotlivými běhy

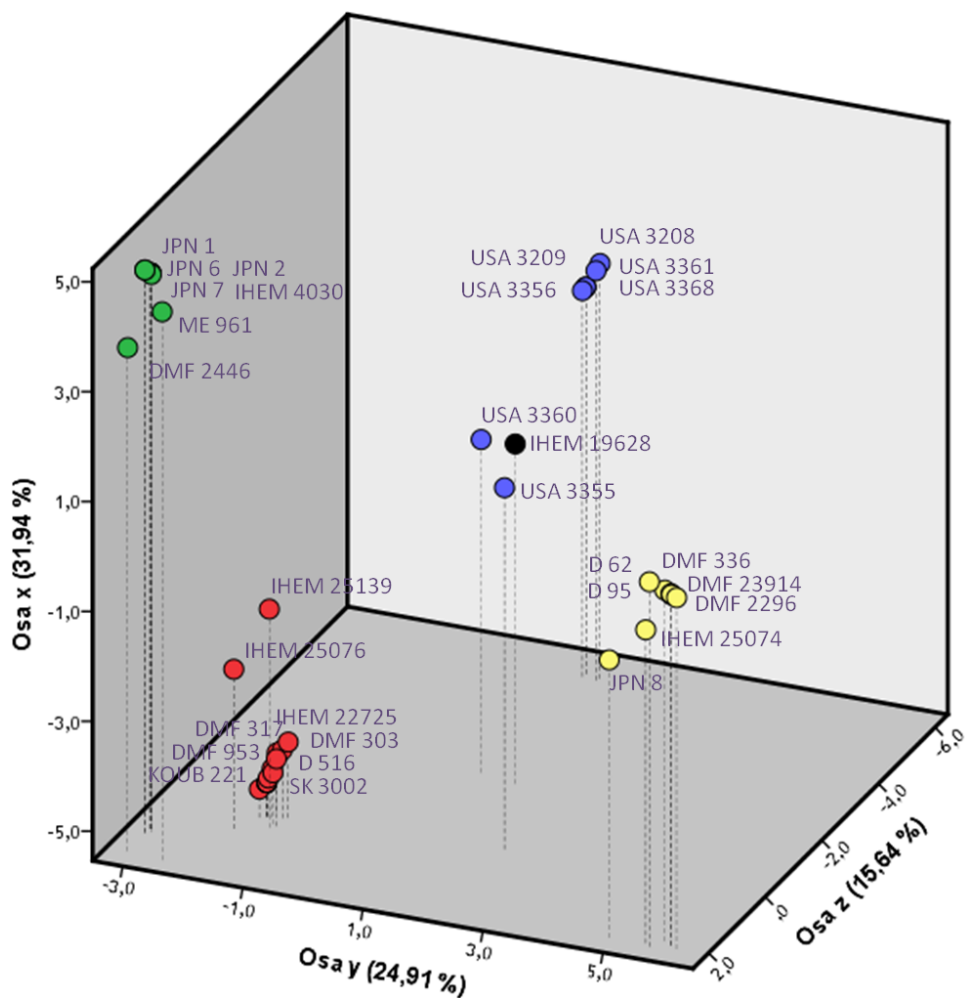
programu pro jednotlivé K; průměrné ΔK počítané jako průměr absolutních hodnot míry změny mezi dvěma páry běhu programu Structure (C). Charakteristiky byly vypočítané pomocí skriptu Structure-sum-2011.R (Ehrich et al 2007) pro rozdělení do deseti skupin ($K=10$) a 10krát proběhlý algoritmus v programu STRUCTURE, vypočítaný pro datovou matici zbavenou klonů.



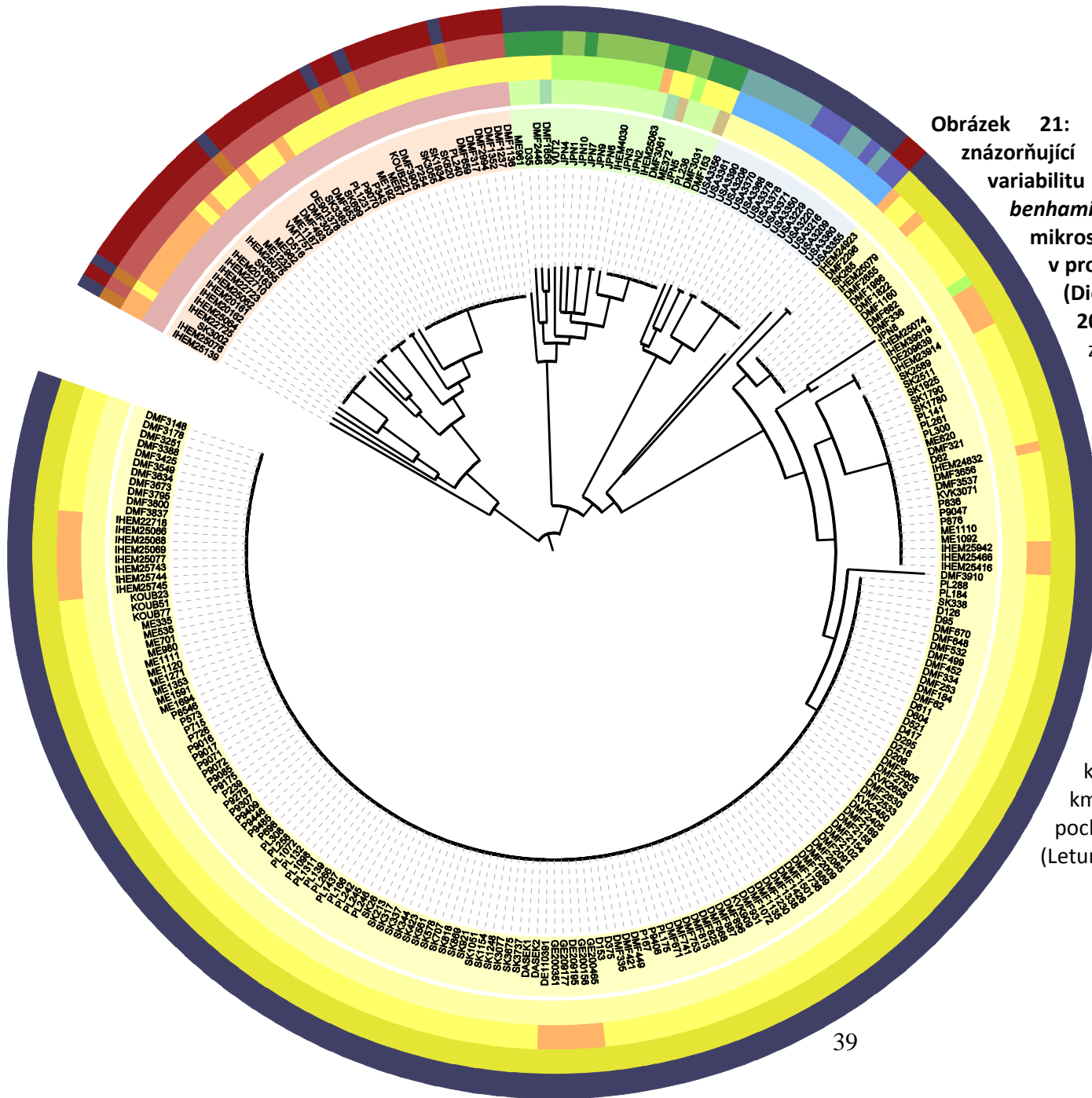
Obrázek 18: Odhad rozdělení vnitrodruhové struktury kmenů druhu *Arthroderma benhamiae* (n=269) na základě genetické podobnosti mezi jedinci v programu STRUCTURE pro čtyři (K=4) (A) a pro tři (K=3) (B) subpopulace (MG1-4). Fylogenetický strom byl vytvořený metodou Neighbour-joining na základě párové genetické vzdálenosti vypočítané pomocí Jacardova koeficientu (J) v programu FAMD (ve středu) při použití 10 mikrosatelitních lokusů. Příslušnost k fenotypovým (F1-F4) a genotypovým skupinám - sekvenční analýza ITS rDNA a gen *gpdh* (G1-6) je znázorněna napravo. Dataset byl zbaven klonů, v závorce za jednotlivými kmeny je uvedeno kolik dalších kmenů náleží danému genotypu.



Obrázek 19: Haplotypová síť (neighbour-network) vytvořená na základě distančních matic vypočítaných pomocí Jacardova koeficientu (J) v programu FAMD (Dieringer & Schlötterer 2003), vykreslená v programu Splitstree (Huson & Bryant 2006). Větve byly zabarveny podle příslušnosti k jednotlivým subpopulacím MG1 (žlutá), MG2 (červená), MG3 (zelená), MG4 (modrá). Dataset byl zbaven klonů, v závorce za jednotlivými kmeny je uvedeno kolik dalších kmenů náleží danému genotypu. Delta score: 0,1545, Q-residual score: 0,00517



Obrázek 20: Analýza hlavních koordinát (PCoA) vytvořená na základě mikrosatelitních dat na datasetu vzorků druhu *Arthroderma benhamiae* (zbaveného klonů) v programu FAMD (Dieringer & Schlötterer 2003). Matice byly vypočteny pomocí Jacardova koeficientu (J) a vykreslená v programu SPSS (SPSS 2011). U jednotlivých os je v závorce uvedeno, kolik příslušná osa vysvětluje variability. Jednotlivé mikrosatelitní subpopulace byly vyznačeny barvami: MG1 (žlutá), MG2 (červená), MG3 (zelená), MG4 (modrá).



Obrázek 21: **Fylogenetický strom znázorňující vnitrodruhovou variabilitu druhu *Arthroderma benhamiae* na základě mikrosatelitních dat v programu FAMD (Dieringer & Schlötterer 2003).** Kmeny jsou zvýrazněny podle příslušnosti k jednotlivým subpopulacím (MG1-MG4). Barevné kódy: vnitřní kruh - příslušnost kmenů ke genotypu zjištěného sekvenční analýzou ITS rDNA a genu pro *gpdh*; druhý kruh - geografický původ kmenů; třetí kruh - fenotyp kmenů; vnější kruh - pohlavní ladění kmenů. Grafický výstup pochází z programu iTOL (Letunic & Bork 2007).

Barevné kódy (kruhy):

4) Párovací typ

- MAT1-1
- MAT2-2

3) Fenotyp

- F1
- F2
- F3a / F3b
- F4a / F4b

2) Původ

- Česká Republika
- Evropa
- Japonsko
- USA

1) Genotyp (sekvenční analýza)

- G1
- G2
- G3
- G4
- G5

Barevné značení:

Subpopulace

- MG1
- MG4
- MG3
- MG2

3.4.2 Populační struktura

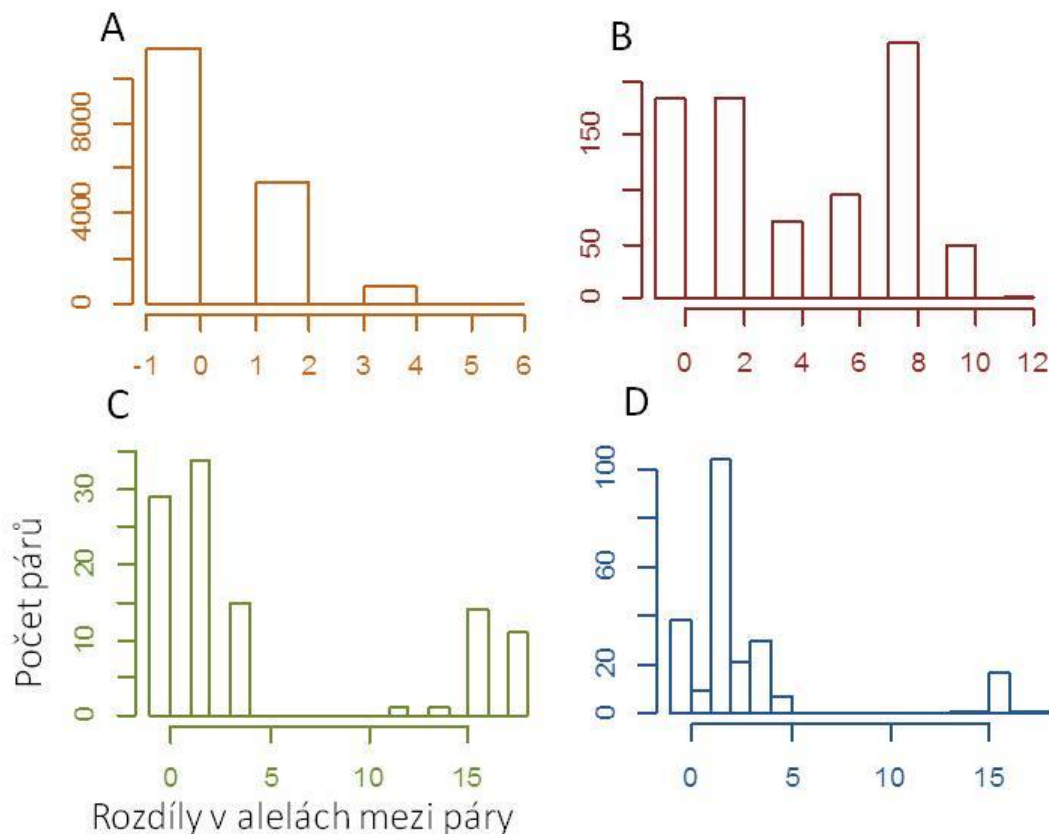
Pravděpodobnost výměny genetického materiálu mezi čtyřmi hlavními subpopulacemi *A. benhamiae* definovanými mikrosatelitními daty (pouze unikátních genotypy pro každou skupinu): MG1 - evropská subpopulace (n=7), MG1 (n=7), MG2 (n=10), MG3 – japonská a evropská subpopulace (n=9). Míra genetické izolace jednotlivých subpopulací byla zjišťována Analýzou molekulární variance (AMOVA) (Tab. 3). Výsledky ukázaly, že 68,1 % genetické variability lze vysvětlit rozdíly mezi subpopulacemi, kdežto variabilita uvnitř subpopulací přispívá k celkové variabilitě 31,9 %, což ukazuje na malou míru výměny genetické informace mezi subpopulacemi ($p < 0,0001$). Fixační index F_{ST} vyjadřující stupeň genetické divergence mezi subpopulacemi vyšel vysoký (0,681), což naznačuje fixaci alel pro jednotlivé subpopulace. Stejně charakteristiky byly počítány také zvlášť pro každé dvě subpopulace (Tab. 3). Variabilita mezi subpopulacemi při porovnávání jednotlivých skupin zvlášť byla vždy výrazně větší než variabilita uvnitř subpopulací, což ukazuje výrazné genetické oddělení všech subpopulací od sebe navzájem.

Tabulka 3: Analýza molekulární variance počítaná pro a mezi jednotlivými subpopulacemi definovanými mikrosatelitními daty (MG1, MG2, MG3, MG4) v programu Arlequin (Excoffier et al 1992, Weir & Cockerham 1984). Dataset byl zbaven klonů. $P < 0,001$.

Subpopulace	Variabilita	Stupně volnosti	Suma čtverců	Variabilita komponent	Procento variability
Celá populace	mezi subpopulacemi:	3	149,8	6,496	68,1
	uvnitř subpopulací: $F_{ST} = 0,681$	26	79	3,04	31,9
MG3 / MG2	mezi subpopulacemi:	1	67,3	6,96	71,04
	uvnitř subpopulací: $F_{ST}: 0,71$	17	48,2	2,84	26,96
MG1 / MG4	mezi subpopulacemi:	1	58,67	6,76	69,33
	uvnitř subpopulací: $F_{ST}: 0,69$	15	44,86	2,9	30,67
MG2 / MG1	mezi subpopulacemi:	1	39,3	7,4	81,76
	uvnitř subpopulací: $F_{ST}: 0,82$	9	14,86	1,65	18,24

3.4.3 Klonalita subpopulací

V každé subpopulaci (MG1, MG2, MG3, MG4) zjištěné mikrosatelitní analýzou byly identifikovány klony (lišící se o nula alel). Silně pozitivně zešikmený histogram znázorňující rozdělení počtu párových rozdílů mezi jedinci (Obr. 22) ukazuje na velmi výrazný podíl klonů uvnitř jednotlivých subpopulací. Asociační index pro všechny subpopulace (zbavených klonů) kromě MG2, vyšel výrazně vychýlený od nuly (očekávaná a pozorovaná odchylka se lišila), což znamená, že musela být zamítnuta hypotéza o rekombinaci mezi jedinci v rámci těchto subpopulací (viz Tab. 4). Nejvýraznější odchylku vykazovala MG1 skupina, což může ukazovat na silně klonální populaci. Naopak MG2 skupina nevykazuje výraznou odchylku, což může ukazovat na možnou rekombinaci mezi jedinci, což potvrzuje také graf závislosti počtu lokusů na genotypové diverzitě na kterém je patrné, že mikrosatelitní analýzou nebyla celá genotypová diverzita této subpopulace odhalena, oproti ostatním subpopulacím (Obr. 22). Pro klonalitu subpopulace MG1 svědčí také zjištěný nízký efektivní počet genotypů, ten byl ale zjištěn i u MG2 subpopulace (viz Tab. 5). Ostatní subpopulace vykazovaly vyšší efektivní počet genotypů, což může ukazovat na relativně nedávný vznik klonality (nebo na nedostatek dat). Pro zajímavost byla MG3 subpopulace rozdělena na kmeny původem z ČR a kmeny z Japonska, toto rozdělení bylo zvoleno i v případě asociačního indexu. Výsledky evropských a japonských kmenů se však v obou případech výrazně nelišily (Tab. 5; Asociační index = 3,253; 3,79).



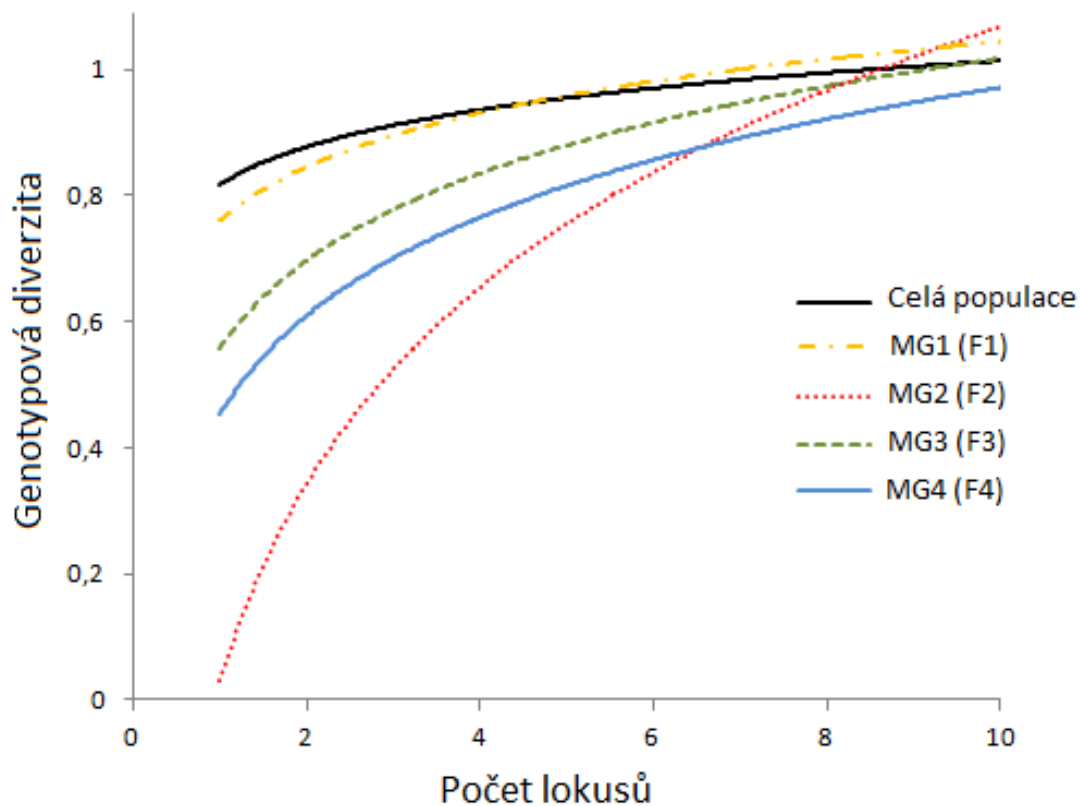
Obrázek 22: Znázornění počtu párů lišících se v přítomnosti jednotlivých mikrosatelitních alel. Histogram byl vytvořen v programu AFLPdat pro subpopulaci MG2 (A); MG2 (B); MG3 (C); MG4 (D).

Tabulka 4: Asociační index (Brown et al 1980) vypočítaný pro jednotlivé skupiny v programu START po odstranění klonů.

Subpopulace	Pozorovaná odchylna	Očekávaná odchylna	Asociační index
MG1	14,829	1,986	6,465
MG2	1,913	1,684	0,136
MG3	7,686	1,727	3,451
MG4	11,948	1,968	5,07

Tabulka 5: Efektivní počet alel a genotypů pro jednotlivé subpopulace kmenů druhu *A. benhamiae*.

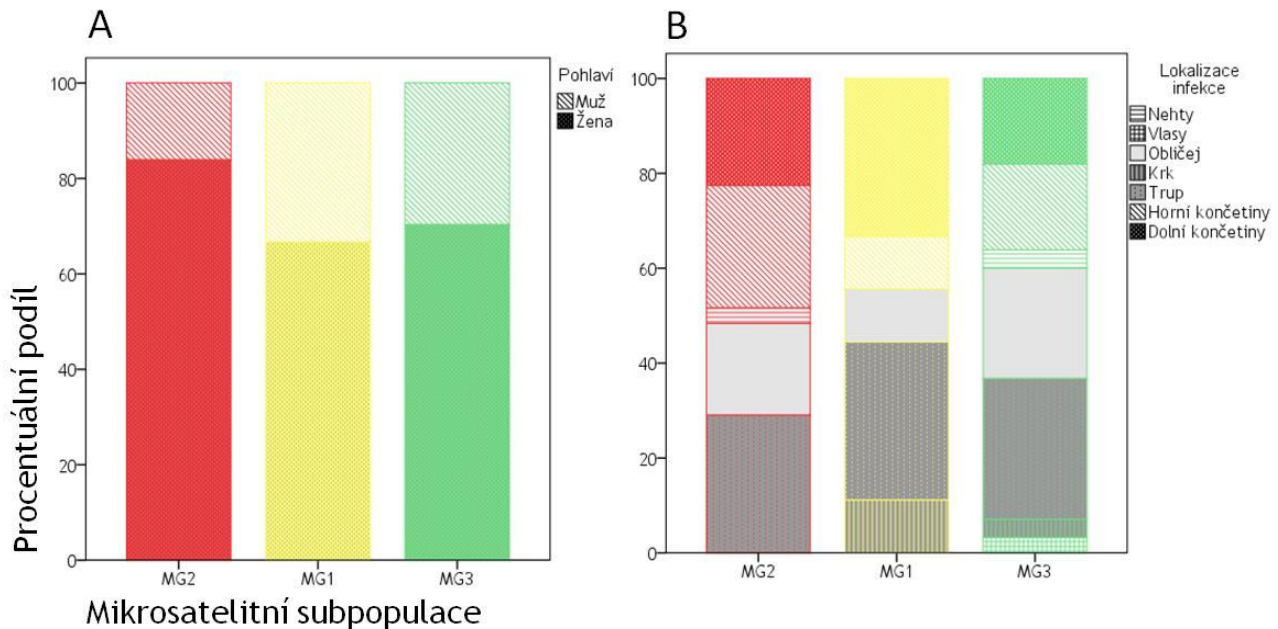
Subpopulace	n	Počet genotypů	Genotypová diverzita	Efektivní počet genotypů
MG1	187	10	0,350	1,53
MG2	42	11	0,765	3,96
MG3_evropská	16	4	0,750	3,37
MG3_japonská	10	4	0,889	4,00
MG4	13	4	0,808	3,93



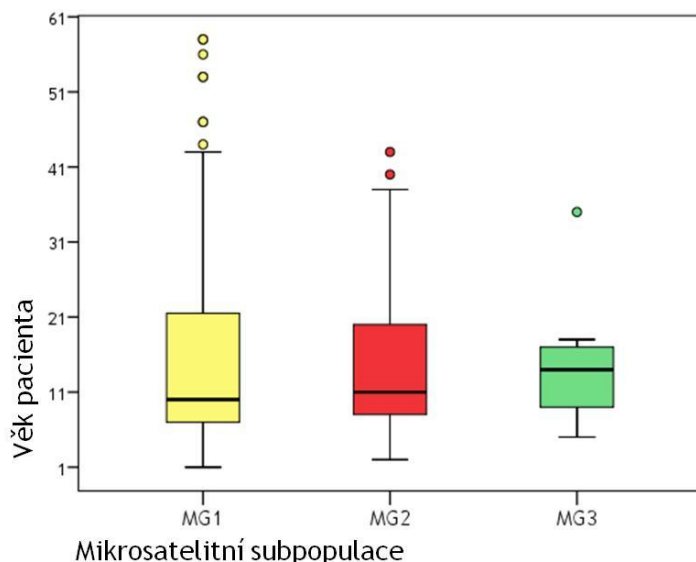
Obrazek 23: Závislost genotypové diverzity na počtu lokusů vynesená pro jednotlivé subpopulace (MG1- MG4) a pro celou populaci druhu *Arthroderma benhamiae*.

3.4.5 Manifestace onemocnění v závislosti na příslušnosti k mikrosatelitní subpopulaci

Souvislost mezi příslušností k subpopulaci (MG1, MG2, MG3) a pohlavím pacienta, lokalizací infekce (Obr. 24, A; B) nebo věkem pacienta (Obr. 25) u vzorků původem pouze z ČR (n=195) nebyla průkazná. Na 5 % hladině alfa byla korelace velmi slabá (Cramerův koeficient vyšel 0,137 pro lokalizaci infekce; 0,114 pro pohlaví pacientů; Kendallův tau koeficient vyšel pro věk pacientů 0,034).



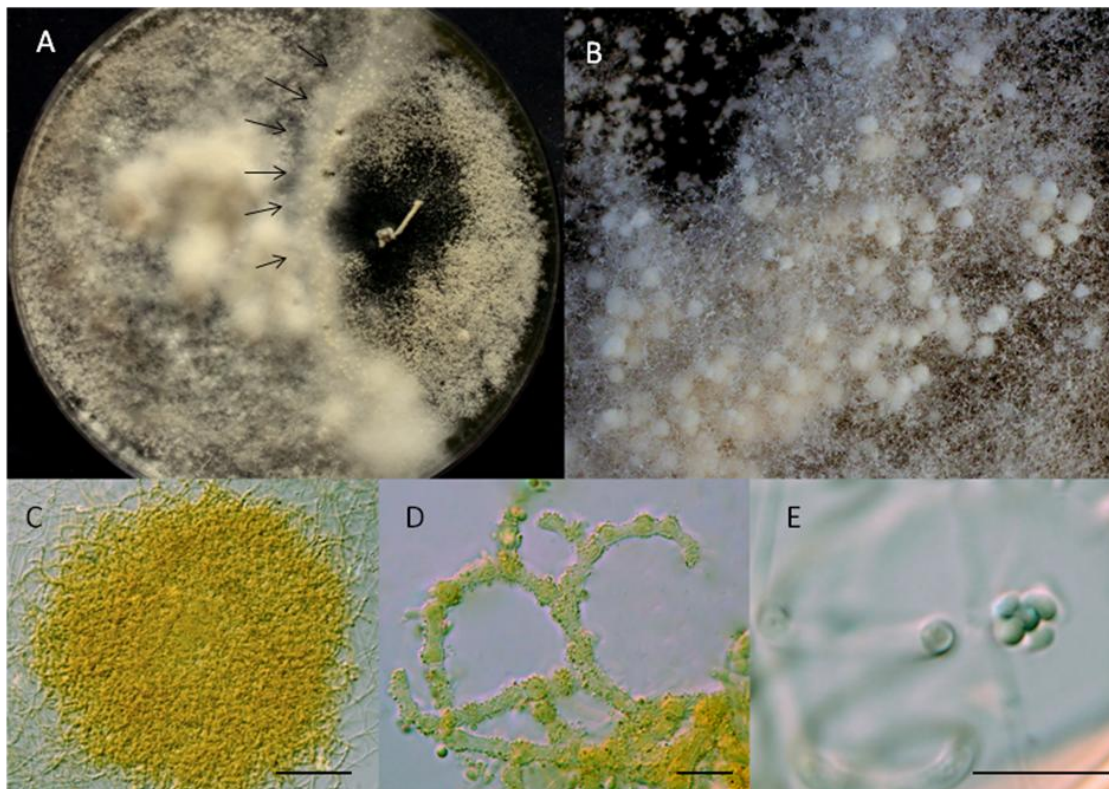
Obrázek 24: Souvislost mezi pohlavím pacienta (A); lokalizací infekce (B) a příslušností izolátů k subpopulaci druhu *Arthroderma benhamiae*. Testované kmeny pocházely z případů lidských dermatofytóz v ČR. Počty případů v jednotlivých skupinách (n=39 pro MS2; n=155 MS1; n=9 pro MS3) byly převedeny na procentuální podíl.



Obrázek 25: Souvislost mezi věkem pacienta příslušností izolátů k subpopulaci MG1 (n=155), MG2 (n=39) a MG3 (n=9) druhu *Arthroderma benhamiae*. Testované kmeny pocházely z případů dermatofytóz v ČR. Střední horizontální linie značí medián, horizontální linie nad a pod mediánem vymezují interkvartilové rozpětí, vnitřní a vnější hradby jsou definované jako 1,5 interkvartilového rozpětí. Kolečka označují odlehlé hodnoty; hvězdičky extrémně odlehlé hodnoty.

3.4.6. Křížící pokusy

Mezi kmeny patřících do rozdílných fenotypových (genotypových subpopulací): F1 (MG1); F2 (MG2); F3 (MG3); F4 (MG4), ani mezi jedinci uvnitř jedné subpopulace, kromě jedinců F4 skupiny, se nepodařilo navodit pohlavní stádium (viz Tab. 6). V rámci F4 skupiny byl pohlavní proces zaznamenán mezi kmeny USA 3360 (MAT1-2) a USA 3376 (MAT1-1) a kmeny USA 3355 (MAT1-2) a USA 3356 (MAT1-1) (Obr. 27), prohozením kmenů mezi sebou nebylo pohlavní stádium navozeno. Infertilní pseudoaskomata byla získána křížením kmenů F2 skupiny ME 67 (MAT1-1) a DMF 935 (MAT1-2). Pseudoaskomata byla obklopena jen nepatrným množstvím peridiálních hyf, které byly světlejší než u pravých askomat, vrůstka nebyla pozorována. Pseudoaskomata se však od typických klubíček, které samovolně tvoří F2 skupina v kultuře, odlišovala kompaktnějším tvarem a tvorbou peridiálních hyf. Mezi použitými agarovými médii OA a GA nebyl nalezen rozdíl ve schopnosti navodit pohlavní stádium. Mikromorfologie fertálních askomat byla popisována na agaru s přidavkem semen *Guizotia abyssinica* po 6 týdnech kultivace při 20°C ve tmě. Askomata se v kultuře objevila po 4-5 týdnech kultivace, byla výrazně žlutá, globózní nebo subglobózní, 150 – (500) 750 µm v průměru, peridiální hyfy hojně větvené, přehrádkované, zakončené buď tupě, nebo tenkostěnnými, spirálovitými přívěsky, buňky peridiálních hyf byly činkovité, asymetrické, hrubě bradavčité, 5,7–13,9 × 2,8–5,7 µm, vrůstka kulovitá, osmisporová, 5,2–6,4 µm v průměru, askospory oploštěné, s kruhovým průmětem při pohledu shora, 1,5-2 × 2,0-3,2 µm (viz Obr. 27).



Obrázek 27: Pohlavní stádium *Arthroderma benhamiae* navozené křížením kmenů USA 3355 (MAT1-1) a USA 3356 (MAT1-2); křížení probíhalo ve tmě při 20°C, na vodním agaru (agar= 2 % w/v) s přidavkem semen *Guizotia abyssinica* (3 % w/v), šipkami jsou označená místa s přítomnými plodnicemi (A), detail světle žlutých plodnic (B), plodnice (gymnothécium) kryté peridiálními hyfami (C), větvená peridiální hyfa (D), vrůstka s askosporami (E). Měřítka: 50 µm (C), 20 µm (D), 10 µm (E).

Tabulka 6: Úspěšné křížící pokusy s vyznačením kmenů druhu *Arthroderma benhamiae* kde byla vytvořena pravá askomata (tmavě šedě) a kde se vytvořila pouze pseudoaskomata (světle šedá). U kmenů, které byly použity při křížení, byl určen párovací typ (MAT1-1, MAT1-2) a byly zařazeny do jednotlivých morfologických skupin: F1, F2, F3 a F4. Kromě druhu *A. benhamiae* byl křížen i druh *Trichophyton erinacei*.

		MAT1-2						
kmeny	morfologie	DMF	DMF	DMF	IHEM	USA	USA	
		935	699	1934	16921	3360	3355	
		F2	F2	F2	<i>T. erinacei</i>	F4a	F4a	
MAT1-1	SK 813	F1						
	DMF 921	F1						
	SK 578	F1						
	ME 67	F2	PA					
	D 516	F2						
	JPN2	F3a						
	JPN3	F3a						
	JPN 10	F3b						
	USA 3375	F4a						
	USA 3376	F4a					A	
	USA 3356	F4b						A
	P 837	<i>T. erinacei</i>				PA		

4. DISKUZE

Pro druh *A. benhamiae*, nového původce epidemie dermatofytóz v Evropě, bylo vytvořeno deset variabilních mikrosatelitních markerů, které byly spolu se sekvenční analýzou genu *gpdh* a oblastí ITS rDNA následně testovány na setu 269 kmenů z případů dermatofytóz lidí a zvířat z Evropy, USA a Japonska. Kmeny byly podrobeny také fenotypové analýze a křížícím pokusům.

K porovnání diskriminační schopnosti jednotlivých markerů použitých v této studii byl pro testované kmeny spočítán Simpsonův index (Hunter & Gaston 1988), který měl pro mikrosatelitní markery hodnotu $D=0,68$, která byla vyšší než při použití obou sekvenčních markerů ($D=0,4$) (Tab. P1, příloha). Ve studiích používajících mikrosatelitní markery u hub obvykle vychází hodnoty Simpsona indexu vyšší (kolem $D=0,9$). Takové hodnoty svědčí o vysoké schopnosti markerů odhalovat variabilitu uvnitř populace zkoumaného druhu (Leo et al 2015, Leyronas et al 2015, Matute et al 2006). V této studii však byly v testovaném datasetu zastoupeny některé vysoce klonální subpopulace, což výrazně snižuje hodnotu vypočteného indexu (Leo et al 2015). Proto i tato poměrně nízká hodnota může být dostatečná k odhalení vnitrodruhové variability *A. benhamiae*. Z některých lokalit bylo zkoumáno poměrně málo vzorků, přesto počet markerů dostačoval k odhalení velké části vnitrodruhové variability a dalším přidáváním markerů nebo izolátů by se pravděpodobně genotypová diverzita zvyšovala jen velmi nepatrně, jak naznačuje graf (Obr. 23) (neplatí pro MG2 subpopulaci).

4.1 Struktura populace druhu *A. benhamiae*

Mikrosatelitní analýza odhalila v populaci *A. benhamiae* 32 odlišných genotypů a jasně rozdělila celý dataset do čtyř subpopulací (MG1-MG4), které se shodují jak s morfoloickou (F1-F4), tak do jisté míry se sekvenční analýzou (SG1-SG3). Mikrosatelitní analýza navíc oproti sekvenční analýze oddělila subpopulaci severoamerických kmenů od evropských v rámci sekvenčního genotypu SG1 (mikrosatelitní subpopulace MG1 a MG4).

V rámci druhu *A. benhamiae* byly dosud různými autory rozlišovány pouze dvě fenotypové skupiny s nejasnou molekulárně genetickou podporou, tzv. žlutý (v této práci F1) a bílý fenotyp (F2) (Symoens et al 2013). Tato práce vyčlenila další fenotypové skupiny F3 a F4 na základě rozdílné fyziologie a vzhledu kultur, jejichž odlišení od předchozích dvou má i molekulárně genetickou podporu. V rámci těchto čtyř genotypově i fenotypově podpořených skupin se kromě vzhledu kolonií (barva a textura kolonií) ukázala být specifická i rychlost růstu kolonií na různých mediích při různých teplotách. Naopak v literatuře dříve popisovaná produkce červeného (ve stáří hnědého) pigmentu, která má být typická pro bílý fenotyp (F2 v této práci, subpopulace MG2), byla nalezena i u fenotypů F3 (MG3) a F4 (MG4). Produkce červeného pigmentu (zkoumáno pravděpodobně u subpopulace MG4) je dědičný znak – monogenní bi-alelický systém (Ghani et al 1974), který nevykazoval genotypově specifickou distribuci vzhledem ke všem markerům (rovnoměrně rozmístěných po genomu) použitým v této studii (mimo genotypy subpopulace MG2, které se všechny vyznačovaly produkcí červeného pigmentu).

Sekvenční analýzou ITS regionu rDNA a genu *gpdh* bylo zjištěno šest genotypů druhu *A. benhamiae*. Tři z nich, SG1 (tzv. American–European race), SG2 a SG3, již byly odhaleny v jiných pracích (Hiruma et al 2015, Symoens et al 2013). Genotypy SG4 a SG5, oba zastoupené pouze dvěma izoláty, přiřadila sekvenční analýza do blízkosti genotypu SG3, od kterého se morfologií a fyziologií neliší. Kmen IHEM 19628 (genotyp SG6), izolovaný v roce 1997, byl geneticky nejvzdálenější od všech

ostatních izolátů *A. benhamiae* za použití všech analýz a lze spekulovat, jestli se nejedná o odlišný druh (přestože druh *A. benhamiae* je nejpříbuznějším druhem v rámci *A. benhamiae* komplexu). Taxonomické pozici tohoto druhu v rámci komplexu bude věnována pozornost v budoucnu.

4.1.1 Druhový koncept

V populaci druhu *A. benhamiae* tedy v souhrnu existují minimálně tři velké podskupiny (SG1-SG3), které byly podpořeny všemi metodami použitými v této práci. Čtvrtá subpopulace MG4 nebyla podpořena sekvenční analýzou (součást genotypu SG1).

Podpora druhů na úrovni sekvencí DNA je v současné době jednou ze stěžejních podmínek i vzhledem ke stále širšímu používání sekvenování pro rutinní identifikaci lidských patogenů, včetně dermatofytů. V tomto ohledu jsou zde rozpoznány skupiny od sebe natolik sekvenčně vzdálené, že by mohly být klasifikovány jako dva (popřípadě tři) odlišné druhy. Stabilní fenotyp u těchto skupin, unikátní růstové charakteristiky a ekologie tento koncept také podporují.

Při takovém scénáři by druhové jméno *A. benhamiae* bylo ponecháno skupině odpovídající sekvenčnímu genotypu SG1, protože zahrnuje ex-typový kmen druhu CBS 623.66 (přístupové číslo k ITS sekvenci v databázi GenBank: JX122281). Sekvenční rozdíl mezi touto skupinou (SG1) a skupinou odpovídající genotypu SG2 byl v ITS rDNA pět substitucí a jeden indel, analýzou genu *gpdh* potom pět substitucí. Podobně byl nalezen sekvenční rozdíl i mezi genotypy SG1 a SG3 sedm substitucí a jedna delece v ITS oblasti a osm substitucí v *gpdh* genu. Sekvenční rozdíl mezi genotypem SG2 a SG3 byl dvě substituce v ITS rDNA oblasti a tři v *gpdh* genu.

Ačkoli v této studii nebylo křížení mezi jednotlivými všemi genotypy SG1-3 zaznamenáno, v jiných studiích se navodit pohlavní stádium podařilo (Kawasaki et al 2008a, Symoens et al 2013, Symoens et al 2011). U antropofilních a zoofilních dermatofytů nejsou ale reprodukční bariéry zcela vytvořené a často se daří křížit mezi sebou i velmi vzdálené druhy (Anzawa et al 2010, Kawasaki et al 2009, Kawasaki et al 2010). Ke křížení odlišných druhů ale v přirozených podmínkách pravděpodobně nedochází vzhledem k odlišným hostitelům a klonální povaze populací těchto druhů (Graser et al 2006, Graser et al 2007, Sharma et al 2007). Důležitá je také životaschopnost takto vzniklého potomstva. Je možné, že i přes úspěšné *in vitro* křížení, není potomstvo dostatečně životaschopné a nemůže dát vzniknout dalším generacím potomků. To může být případ i populací odpovídajícím genotypům SG1-3.

Živým (rostoucím) potomkům 1. generace dávalo vzniknout křížení mezi genotypem G1 a G3 (Kawasaki et al 2008a). Schopnost 1. generace potomků se dále křížit a dát vzniknout dalším generacím, ale nebyla nikdy zkoumána. Snížená fitness potomstva se přitom může projevit až neschopností kříženců pohlavního procesu. Předpokládá se, že tyto tzv. postzygotické bariéry mezi druhy mohou hrát u dermatofytů zásadní roli.

Popis případných nových druhů nebyl cílem této práce a bude předmětem dalších diskuzí.

4.1.2 Klonalita vs. rekombinace

Křížení mezi jedinci druhu *A. benhamiae* bylo sice v laboratorních podmínkách zaznamenáno (Symoens et al 2013), v přirozených podmínkách však nikdy pozorováno nebylo, podobně jako u většiny primárně patogenních dermatofytů. K pohlavnímu rozmnožování dochází pouze během nepatogenní části životního cyklu, protože šíření infekce mezi hostiteli je omezeno pouze na nepohlavní proces - pomocí arthrokonídií v odloučených keratinizovaných tkáních (Saito et al 2001). Místem, kde u dermatofytů probíhá sexuální část životního cyklu je půda, nebo např. nory hostitelů.

O pohlavním rozmnožování můžeme tedy uvažovat pouze při rozšíření patogena mezi volně žijícími hostiteli. V podmínkách, kde je podestýlka domácích zvířat stále měněna popř. ve vysoce hygienických podmínkách lidských domácností, je tento proces prakticky znemožněn (Summerbell 2002). Pokud patogen ztratí možnost uplatňovat saprofytickou část životního cyklu včetně sexuálního procesu, jak se tomu stalo u řady patogenních dermatofytů, pak tento typ životní strategie nutně vede k selekci klonů, které se mohou v populaci hostitele úspěšně horizontálně šířit. Postupem času mohou tyto klony naprosto převládnout a zcela se geneticky izolovat od původní populace druhu.

Tato situace mohla nastat u druhu *A. benhamiae*, který se šíří především mezi domácími mazlíčky a jejich chovateli přímým kontaktem, kde je příležitost k uplatnění saprofytické část životního cyklu minimální. Proto není žádným překvapením, že bylo u všech subpopulací (MG1-4) zaznamenáno převážně klonální šíření a nepohlavní proces je u nich zřejmě jediným, nebo velmi silně dominujícím způsobem šíření (kromě subpopulace MG2). Rekombinace byla tří ze čtyř subpopulací (MG1, MG3, MG4) zamítnuta vypočítáním asociačního indexu a potvrdila jí také nízká genotypová diverzita (zejména u subpopulace MG1), která se přidáváním dalších markerů zvyšuje jen nepatrně (Obr. 23). Nejvíce klonální charakter šíření byl přítomen mezi jedinci subpopulace MG1. Klonální šíření podporuje i fakt, že v rámci všech subpopulací byl poměr párovacích typů výrazně vychýlen ve prospěch jednoho párovacího typu, nebo byl dokonce nalezen pouze jeden párovací typ (MG1, MG3).

Zatímco subpopulace MG1, MG3 a MG4 můžeme považovat za klonálně se šířící, mezi kmeny MG2 subpopulace zřejmě k pohlavnímu procesu dochází, nebo docházelo v minulosti. Pro tento fakt svědčí nejen to, že jsme nemohli zamítnout hypotézu rekombinace ($I_A=0,13$), ale také velké množství haplotypů, jejichž diverzita nebyla ani při použití 10 mikrosatelitních markerů vyčerpána (Obr. 23). Velký nepoměr párovacích typů (MAT1-2:MAT1-1 = 4:39) u této subpopulace by spíše napovídal její klonalitu, proto byly zde zjištěné známky přirozené rekombinace překvapivé, podobně jako např. u jedné ze subpopulací druhu *M. canis* (Sharma et al 2007). Jedním z vysvětlení může být výskyt této subpopulace (MG2) i mezi volně žijícími zvířaty, kde dochází k pohlavnímu procesu a generování genetické diverzity druhu. Zjištěný výskyt rekombinující populace u druhu *M. canis* byl také omezen zejména na zvířata (kočky, psi a koně), naopak vysokou klonalitu vykazovaly izoláty ze člověka (Sharma et al 2007). Také některé lokalizace infekcí způsobených *A. benhamiae* u domácích zvířat, např. v okolí čenichu u psa (možný následek norování), by naznačovaly přenos infekce z půdy nebo volně žijícího zvířete. Výskyt *A. benhamiae* mezi volně žijícími hlodavci v Evropě není možné potvrdit kvůli taxonomickým nejasnostem v komplexu *T. mentagrophytes* v minulosti a chybění recentních izolátů identifikovaných molekulárně genetickými metodami.

Znalost způsobu množení populace (klonalita vs. sexualita) může být důležitá z mnoha důvodů. Klonální populace negenerují v takové míře variabilitu ve srovnání s rekombinující populací, a proto by se neměly v klonálních populacích selektovat další více virulentní kmeny (Dighton et al 2005, Zeigler et al 1995), nebo kmeny rezistentní na antimykotika (Anderson 2005). Klonální populace mohou být výhodou i pro vývoj diagnostických testů pro klinickou praxi, protože mohou být díky nízké variabilitě těmito testy snadno podchyceny.

4.1.3 Zastoupení párovacích typů

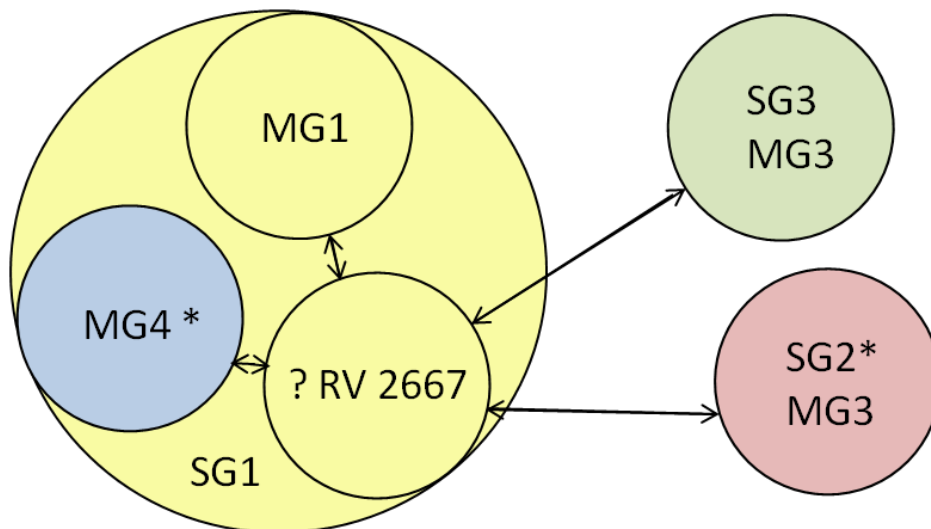
Jak bylo popsáno výše, vychýlení ve prospěch jednoho párovacího typu bylo zaznamenáno v rámci všech zjištěných subpopulací druhu *A. benhamiae*, u subpopulace MG2 ve prospěch MAT1-2 (mt+), u subpopulací MG1, MG3 a MGA ve prospěch MAT1-1 (mt-). U MG1 a MG3 nebyl opačný párovací typ MAT1-2 (mt+) vůbec zaznamenán. Podobné výsledky byly zaznamenány už dříve (Hiruma et al 2015, Summerbell et al 2002, Symoens et al 2013). Tento jev je v rámci patogenních dermatofytů poměrně

běžný (Graser et al 2006) a pravděpodobně jde pouze o logický důsledek klonality subpopulací (viz výše) (Summerbell 2002).

Může být jen výsledkem náhody, který ze dvou párovacích typů se v populaci jako klon prosadí. U některých patogenních hub ale byla zjištěna rozdílná virulence izolátů s rozdílnými párovacími typy (Cheema & Christians 2011, Kwon-Chung et al 1992, Nielsen et al 2005). U dermatofytů převládají u různých druhů různé párovací typy, např. párovací typ MAT1-2 je jediným párovacím typem známým u patogenních druhů *T. verrucosum* nebo *T. tonsurans*, naopak pouze MAT1-1 je známý u druhu *T. rubrum* a *T. violaceum* (Obr. 1) (Graser et al 2006). Odlišná virulence opačně laděných izolátů in vivo ale nebyla pozorována ani u druhu *A. benhamiae*, ani např. u druhu *M. gypseum* (Li et al 2010, Rippon & Garber 1969). Přesto byl u druhu *A. benhamiae* mezi párovacími typy objeven rozdíl ve spektru vylučovaných enzymů (Rippon & Garber 1969).

4.1.4 Křížení

Pohlavní stádium bylo v této studii navozeno pouze mezi izoláty genotypu SG1 původem ze Severní Ameriky (mikrosatelitová subpopulace MG4). Úspěšné křížení bylo pravděpodobně v rámci této subpopulace (12 kmenů původem z USA) již zaznamenáno v minulosti (Summerbell et al 2002), výsledky však nebyly potvrzeny sekvenční analýzou. Křížící pokusy však byly z celkového pohledu poměrně neúspěšné v kontextu dřívějších studií, které úspěšně navodily křížení i v rámci jiných genotypů (SG2) a dokonce i mezi různými genotypy druhu *A. benhamiae* navzájem (mezi SG1 a SG2, a SG1 a SG3) (Obr. 28) (Hejtmanek & Hejtmankova 1988, Kawasaki et al 2008a, Kawasaki et al 2002, Summerbell et al 2002, Symoens et al 2013). Ve většině případů však identifikace izolátů nebyla potvrzena sekvenční analýzou, proto se dá s jistotou potvrdit pouze křížení genotypů SG2 (přístupové číslo v GenBank: AY315661) (Symoens et al 2013) a SG3 (přístupové číslo v GenBank: AB573044) (Kawasaki et al 2008a) s SG1 genotypem (ex-typový kmen, původem z USA).



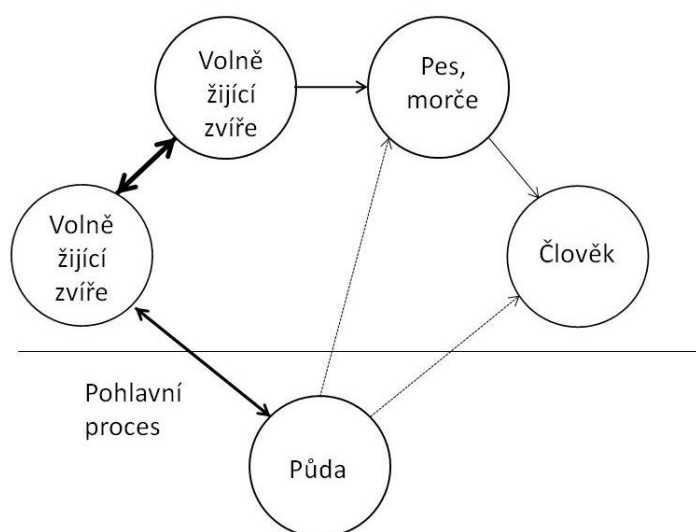
Obrázek 28: Shrnutí výsledků křížících experimentů (dříve publikované i provedené v této práci) mezi jednotlivými genotypy zjištěnými sekvenční analýzou ITS rDNA - SG1-3 (Kawasaki et al 2002, Symoens et al 2013) a mikrosatelitní analýzou - MG1-4. Křížení mezi skupinami je naznačeno šipkou, hvězdičkou jsou označeny skupiny, uvnitř kterých bylo pohlavní stádium indukováno.

Indukce pohlavního stádia u hub je komplikovaný proces, který vyžaduje nalezení vhodných podmínek pro křížení (médiu, teplota, světlo, aj.). Některé kultury navíc po určité době ztrácejí schopnost tvorby pohlavního stádia (Takashio 1979), což může být jedním z důvodů neúspěchu. Ve výše zmiňovaných studiích se pohlavní stádium mezi různými genotypy podařilo navodit křížením pouze s jedním kmenem IHEM 3287 = RV 26678 (monosporický izolát a kříženec ex-typového kmene s kmenem IHEM 24908), který v této studii nefiguroval. Tento kmen se údajně vyznačuje produkcí červeno-hnědého pigmentu na SAB agaru (Kawasaki et al 2008a) a podle sekvence ITS rDNA a *gpdh* sekvence (AB088677, AB573057) kmen patří ke genotypu SG1 a je jedním z potomků extypového kmene (CBS 623.66) pocházejícího z USA, proto bychom se mohli domnívat, že patří do severoamerické subpopulace MG4. Struktury podobné askomatům, nebo fertální askomata se podařilo navodit u všech testovaných kmenů při křížení s IHEM 3287 (Symoens et al 2013), což je neobvyklé a svědčí to o vysoké schopnosti tohoto kmene k indukci pohlavního stádia.

4.1.5 Rezervoár druhu *A. benhamiae*

Jako rezervoár infekcí jsou u druhu *A. benhamiae* udávána především morčata a další hlodavci, v některých oblastech také psi (Drouot et al 2009, Fumeaux et al 2004, Nenoff et al 2014, Saito et al 2001), což potvrdila i tato studie (Obr. 7). Chované morče v domácnosti udávalo v této práci 23 % pacientů s dermatofytózou způsobenou *A. benhamiae*. Morčata bývají v domácích chovech držena bez možnosti kontaktu s jinými zvířaty, či venkovním prostředím. K přenosu nákazy mezi morčaty proto musí probíhat již ve zverimexech nebo větších chovech, čemuž také nasvědčují lokální epidemie infekcí v obchodech se zvířaty (Cafarchia et al 2012, Shiraki et al 2006a, Šimaljaková 2010, van Avermaete 2014). Infekci je často bezpříznaková a projevuje se až při oslabení organismu zvířete, proto je nezhřídka nákaza morčete identifikována zpětně až při manifestaci u chovatele. Často bývá v jedné domácnosti nakaženo i větší množství osob, které přišly do kontaktu s morčetem. Téměř 21 % pacientů neudává kontakt s morčetem, ani jiným zvířetem v domácnosti (popř. také u svých přátel, či příbuzných) To je zřejmě ve většině případů způsobeno neúplným odebráním anamnézy od pacientů, v některých případech snad může roli hrát i zde neidentifikovaný zdroj infekce.

V minulosti byl již dokumentován případ přenosu mezi chovatelem a jeho králíkem (Saito et al 2001), v této práci jsme použily stejné izoláty (JPN4, JPN9) a mohlo tak být potvrzeno, že králík i majitel byli nakaženi stejným genotypem druhu *A. benhamiae*.



Obrázek 28: Pravděpodobný model životního cyklu *A. benhamiae* (saprofytická část životního cyklu v půdě se pravděpodobně týká zejména izolátů subpopulace MG2).

4.1.6 Pohlavní dimorfismus

Pohlavní dimorfismus je zatím nepopsaný jev u dermatofytů, a byl pozorovaným pouze u nepříbuzných hub, jako např. *Neurospora tetrasperma*, kde se projevil rozdílnou barvou mycelia, konidií a rozdílech v protoperitheciích (Samils et al 2013a, Samils et al 2013b). Rozdíly v makromorfologii, zejména barvě reverzu kolonií, byly zaznamenány mezi MAT1-1 izoláty a MAT1-2 izoláty MG2 subpopulace. Izoláty s MAT1-1 párovacím typem byly ale reprezentovány pouze třemi kmeny (čtvrtý kmen byl staršího data, což ovlivnilo jeho morfologii), u všech ale byla pozorována charakteristická morfologie, která se byla velmi podobná F3a fenotypu, ale oproti této skupině se odlišovala tvorbou hnědého pigmentu ve středu kolonií (Obr. P2).

4.2. Epidemie způsobená druhem *A. benhamiae* v Evropě

Ačkoli stále častěji přichází zprávy o zvýšeném zachytu *A. benhamiae* v Evropě (Fumeaux et al 2004, Nenoff et al 2014, Uhrlass et al 2013), nemusí to nutně znamenat tak výrazný nárůst incidence případů oproti minulosti, jak by se mohlo na první pohled zdát. I když o incidenci jednotlivých druhů dermatofytů máme mnoho dokladů z minulosti (Havlickova et al 2008, Seebacher et al 2008) rozsáhlé taxonomické změny na přelomu tisíciletí (Gräser et al 1999a, Gräser et al 1999b) a diagnostika založená na morfologických znacích znesnadňují srovnání těchto studií s výsledky současných studií. Existují nesporné důkazy, že genotyp G2 (podle ITS rDNA) byl v Evropě přítomný ještě před začátkem epidemie datované k roku 2002 (Fumeaux et al 2004). Jde zejména o několik v nedávné době sekvenovaných kmenů, které byly izolovány v minulosti po celé Evropě: RV14387 (v této studii pod názvem - IHEM 25139, rok 1972, Francie, GenBank: AB458215); kmen RV14988 (rok 1973, Španělsko, GenBank: AB458213) (Takashio 1974); CBS 934.73 (rok 1973, Německo, GenBank: AB458214); CBS 280.83 (rok 1982, Nizozemí, GenBank: Z98016) a několik dalších kmenů izolovaných v období 1977-1979 ve Finsku (Aho 1980, Takeda et al 2012). Důvodem proč nebyl tento druh v epidemiologických studiích zmiňován, byla jeho taxonomická klasifikace jako *T. mentagrophytes*. Ani fenotyp tohoto druhu nám příliš nenapoví, protože F2 fenotyp je ve své makromorfologii podobný dalším druhům *T. mentagrophytes* komplexu (Gräser et al 1999b, Nenoff et al 2007). Nemůžeme tedy přesně určit, jak moc (nebo jestli) se incidence případů infekcí způsobených tímto genotypem oproti minulosti změnila.

Naopak nebyl zjištěn žádný kmen genotypu G1 přítomný v Evropě před začátkem epidemie, první kmen tohoto genotypu byl pravděpodobně zachycen ve Švýcarsku v roce 2003 (kmenu IHEM 20159, tato studie), další případy jsou lokalizované v Německu, Belgii a v neposlední řadě také v České republice (Hubka et al 2014b, Nenoff et al 2014, Uhrlass et al 2013). Záměna tohoto druhu s *T. mentagrophytes* v tomto případě není kvůli odlišné morfologii pravděpodobná. Naneštěstí je ale problematické jeho odlišení od *M. canis* na základě makromorfologie (Obr. P9, příloha). Mikromorfologie, další laboratorní testy a také anamnestické údaje oba druhy snadno odliší (Skořepová et al. 2014). Incidence infekcí způsobených *M. canis* se v české populaci drží na přibližně stejné úrovni nebo se mírně zvyšuje (Hubka et al 2014b, Kuklova & Kučerová 2001). Kdyby v minulosti opravdu docházelo k zaměňování druhů *M. canis* a *A. benhamiae*, muselo by se po molekulárními metodami ověřené identifikaci druhů ukázat snižující se zastoupení druhu *M. canis* v populaci, k tomu však nedochází (Hubka et al 2014b, Hubka et al 2012, Uhrlass et al 2014). Proti záměně těchto dvou druhů svědčí také rozdílné hostitelské spektrum obou druhů. Infekce způsobené druhem *M. canis* jsou na člověka přenášeny hlavně z koček, psů a koní, naopak rezervoárem *A. benhamiae* jsou v našich podmínkách především morčata.

4.2.1 Genetická charakteristika a původ kmenů působících epidemii v Evropě

Jako původce epidemie způsobené druhem je možné označit subpopulaci MG1 a to z několika důvodů.

1. Subpopulace MG1 je zodpovědná za 64 % infekcí zachycených touto studií a 79 % všech evropských infekcí. To svědčí o větší schopnosti přenosu na člověka (virulenci) kmenů této subpopulace než je tomu u kmenů ostatních subpopulací.

2. Izoláty této subpopulace vykazovaly vysokou míru klonality a tedy malou genetickou diverzitu. Také fenotyp kmenů byl velmi uniformní.

Budeme-li vycházet z předpokladu, že evropská epidemie infekcí způsobená *A. benhamiae* je způsobena subpopulací MG1, která v Evropě do vypuknutí epidemie nebyla přítomná, musíme se ptát, kde je její původ. Odštěpení subpopulace MG1 od subpopulace MG2 a MG3 přítomných v Evropě je pro kvůli vysoké sekvenční rozdílnosti nepravděpodobné. Jako pravděpodobnější místo původu subpopulace MG1 se jeví odštěpení od subpopulace MG4, která zahrnuje pouze americké kmeny a to z několika důvodů:

1. Všechny analýzy přiřadily subpopulaci MG1 do blízkosti MG4, sekvenční markery dokonce tyto dvě subpopulace od sebe nedokázaly oddělit.

2. Zatímco v americké subpopulaci MG4 byly kromě izolátů s párovacím typem MAT1-1 přítomné i izoláty MAT1-2, žádné MAT1-2 izoláty nebyly nalezeny v subpopulaci evropských kmenů MG1 (n=188).

3. Díky chybějícímu pohlavního procesu se kmeny subpopulace MG1 šíří striktně klonálně. U subpopulace MG4 bylo sice také zjištěno klonální šíření, oproti subpopulaci MG1 však měla vysokou genotypovou diverzitu a křížení mezi izoláty této subpopulace bylo zaznamenáno, což může znamenat přítomnost pohlavního procesu v nedávné minulosti.

4. Druh *A. benhamiae* byl původně popsán z případů dermatofytózy v Americe (Ajello & Cheng 1967), což svědčí o jeho přítomnosti v tomto regionu v minulosti. Typový kmen z tohoto regionu spadá podle sekvence ITS rDNA (GenBank: JX122281) do subpopulace MG1/MG4.

V souhrnu se dá říci, že americká subpopulace *A. benhamiae* (MG4) je geneticky mnohem rozmanitější než evropská (MG1), která je pravděpodobně z velké části klonem odvozeným od virulentního kmenu s možným původem v Americe (centrum genetické diverzity druhu). Možná tento kmen ani nemusel být více virulentní, ale v evropské prostředí se dokázal prosadit, díky lokálním odlišnostem. Otázka je, v čem je severoamerické prostředí jiné než evropské, a proč k epidemii dochází pouze v Evropě? Jedním z důvodů může být, že se chov morčat a králíků v USA (1,9 % domácností podle (AVMA 2012), údaj z roku 2012) nedrží v takové oblibě jako v Evropě (Německo: 6,4 %, podle http://www.lgl.bayern.de/tiergesundheit/tierschutz/tierhaltung_heimtiere/index.htm, údaj z roku 2009; Velká Británie 3,6 % domácností podle <http://www.pfma.org.uk/pet-population/>, údaj z roku 2013). Naopak chov psů v USA (36,5 % domácností) je oblíbenější než v Evropě (Německo: 13,3 %, Velká Británie 25 % domácností), neplatí to ale pro Českou republiku, kde psa chová až 43 % domácností. Podle výzkumů, do kterých se zapojilo více než 600 výrobců krmiv, je chov morčat nejoblíbenější v Belgii, dále v Nizozemí, Švýcarsku a Španělsku, naopak Česká republika patří podle této statistiky k drobným chovatelům morčat. Otázkou je, do jaké míry Češi tato krmiva nakupují (The European Pet Food Industry; ke stažení zde: <http://www.fediaf.org/facts-figures/>) (Obr. P10, příloha).

Americké prostředí je zřejmě příznivé pro pohlavní rozmnožování (nebo alespoň bylo), kdežto situace v Evropě naopak nahrává klonálnímu šíření. Rozdíly mezi evropským a americkým prostředím mohou být především v přítomnosti přírodního rezervoáru druhu v Americe oproti Evropě.

Především v zalesněných oblastech Severní Ameriky žijí blízké příbuzní morčete domácího (*Cavia porcellus*) urzoni kanadští (*Erethizon dorsatum*). Infekce způsobená *A. benhamiae* (konkrétně genotypem SG1, GenBank: AB236405) byla u urzonů původem z USA a Kanady zjištěna po převezení do japonské ZOO (Takahashi et al 2008). Urzoni začali být chováni v evropských ZOO na přelomu milénia (Olšová 2012). Po padesátileté přestávce je také od roku 2003 začala chovat i ZOO Praha (<http://www.zoopraha.cz/zvirata-a-expozice/lexikon-zvirat?d=308-urz-on-kanadsky>). Dalším možným rezervoárem infekcí mohou být mývalové severní (*Procyon lotor*), u kterých už infekce některým z druhů *T. mentagrophytes* komplexu v USA zjištěna byla (mohlo jít i o *A. benhamiae*)(Al-Doory & Moore 1971). Mývalové severní tvoří volně žijící populace i Evropě, kde byli ve volné přírodě pozorováni už od 30. let 20. století (chov mývalů pro kožešinu je ještě staršího data)(Müller-Using 1959), ale k rozšíření došlo až na přelomu tisíciletí, a to zejména v Německu a Polsku, pozorováni ale byli i v Maďarsku či Španělsku (Fischer et al 2015, Heltai et al 2000, Hohmann et al 2000, Popiołek et al 2011). V České republice se pravděpodobně vyskytují až od roku 2000, populace mývala dosahuje v ČR odhadem několik stovek kusů (Matěju et al 2012, Musilová et al 2011) Jak urzoni, tak mývalové mohou být hostitelé kmenů MG1 subpopulace *A. benhamiae*, tuto subpopulaci kmenů tak mohli introdukovat do Evropy a Japonska.

Evropská a americká populace jsou od sebe již dlouhou dobu odděleny (alely jsou fixovány pro jednotlivé populace; $F_{st}=69$), což neodpovídá nedávnému vzniku evropské subpopulace, tato subpopulace ale mohla vzniknout v Americe (např. v populaci urzonů či mývalů) a až následně se přenést do Evropy. Americký původ evropské subpopulace MG1 by měl být ověřen testováním více kmenů amerického původu z odlišných hostitelů.

4.3. Epidemiologická situace v Japonsku

Arthroderma benhamiae nebyla před rokem 1997 nikdy v Japonsku zjištěná i přes rozsáhlé křížící pokusy (Hironaga & Watanabe 1980). Tento druh je zde považován za druh introdukovaný (Hiruma et al 2015). Japonské izoláty vykazují na základě sekvenční analýzy (SG3) jednotný genotyp a kromě jednoho izolátu (JPN 10) také jednotný fenotyp (F3a). Stejný genotyp je sdílený i s některými evropskými kmeny, ty ale mají odlišný fenotyp (stejný jako izolát JPN10 - F3b), ale analýzou mikrosatelitů bylo zjištěno, že netvoří jednotnou subpopulaci. Je tedy možné, bez ohledu na odlišný fenotyp, který může být i důsledkem stáří kultur, že tento genotyp byl zanesen do Japonska z Evropy.

Mezi 22 izoláty z Japonska byl nalezen pouze jeden kmen (JPN8 - NUBS1300, také zkoumaný v této práci) odlišného sekvenčního genotypu (Hiruma et al 2015, Mochizuki et al 2001, Takeda et al 2012), izolovaný z případu dermatofytózy u osmáka degu, který patřil k subpopulaci MG1 (evropská subpopulace). Tento genotyp však nemůžeme označit za původce japonské epidemie, protože byl odlišen mikrosatelitní analýzou od evropských izolátů, navíc jde pouze o jeden kmen.

Chov osmáků je poměrně novou záležitostí. V Japonsku a Evropě byli první osmáci chováni v domácnostech až na začátku 90. let a je proto možné, že jsou to právě osmáci dovezení z Ameriky (kde má jejich chov delší tradici), kteří zavlekli izolát JPN8 subpopulace MG1 (ale odlišného genotypu než mají izoláty jiných hostitelů MG1 v Evropě) do Japonska (případně do Evropy).

5. ZÁVĚR

K odhalení vnitrodruhové variability druhu *A. benhamiae* byly navrženy polymorfní mikrosatelitní markery, které vykazovaly lepší diskriminační schopnost než sekvenování ITS rDNA nebo genu *gpdh*. Mikrosatelitní markery, sekvenční a fenotypová analýza odhalily v populaci *A. benhamiae* tři velmi dobře definované skupiny (SG1-3), které by mohly být hodnoceny i jako samostatné druhy. Dohromady však byly objeveny subpopulace čtyři (MG1-4), protože skupina SG1 byla rozdělena mikrosatelitní a fenotypovou analýzou na dvě subpopulace - evropskou (MG1) a americkou (MG4). Všechny subpopulace měly výrazně vychýlený poměr párovacích typů ve prospěch MAT1-1 párovacího typu a byly hodnoceny jako klonální (kromě MG2). Subpopulace MG2 byla jediná vychýlená ve prospěch MAT1-2 párovacího typu a rekombinace mezi kmeny této subpopulace nebyla použitými testy zamítnuta. Vysvětlením možné přítomnosti pohlavního rozmnožování mezi kmeny této subpopulace může být její rozšíření mezi volně žijícími zvířaty, odkud se infekce přenáší na člověka. Zajímavým zjištěním byl také objev, pro houby velmi neobvyklého, pohlavního dimorfismu mezi kmeny této subpopulace.

Všechny analýzy provedené ve studii jasně identifikovaly jako původce epidemie infekcí v Evropě kmeny mikrosatelitní subpopulace MG1 (sekvenčního genotypu SG1), které byly hodnoceny jako více virulentní (více přenášené na člověka), vysoce klonální a v minulosti (před rokem 2003) se v Evropě nevyskytovaly. Jako pravděpodobný se ukázal původ těchto kmenů v Severní Americe a je možné, že tento přenos bude mít souvislost s chovem urzona kanadského (*Erethizon dorsatum*) nebo s v Evropě volně žijícími populacemi mývala severního (*Procyon lotor*). Tato hypotéza ale musí být dále testována např. izolací dermatofytů od těchto v Evropě introdukovaných druhů. Zastoupení kmenů jednotlivých subpopulací (MG1-3) v rámci Evropy nesouviselo s jejich geografickým původem, ani hostitelem (izoláty ze zvířat byly rovnoměrně distribuovány napříč všemi subpopulacemi).

Navržený systém typizace kmenů druhu *A. benhamiae* může být použit pro monitoring dalšího vývoje epidemie způsobené druhem *A. benhamiae* v Evropě. Mimo jiné může také pomoci objasnit dynamiku přenosu dermatofytů mezi zvířecími a lidskými hostiteli, umožní detekovat ohnisko infekcí (např. chovy hlodavců), které způsobují zvýšený záchyt infekce tímto druhem v rámci určité oblasti.

6. ZDROJE

- Abdel-Rahman SM, Sugita T, González GM, Ellis D, Arabatzis M, et al. 2010. Divergence among an international population of *Trichophyton tonsurans* isolates. *Mycopathologia* 169: 1-13
- Aho R. 1980. Studies on fungal flora in hair from domestic and laboratory animals suspected of dermatophytosis. 1. Dermatophytes. *Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica Section B Microbiology* 88: 79-83
- Ajello L, Cheng S-L. 1967. The perfect state of *Trichophyton mentagrophytes*. *Medical Mycology* 5: 230-34
- Al-Doory Y, Moore J. 1971. *Trichophyton mentagrophytes* infection in a raccoon. *Mycopathologia et Mycologia Applicata* 45: 189-92
- Ali-Shtayeh M, Yaish S, Jamous R, Arda H, Husein E. 2015. Updating the epidemiology of dermatophyte infections in Palestine with special reference to concomitant dermatophytosis. *Journal of Medical Mycology* 25: 116-22
- Alteras I. 1966. Human dermatophyte infections from laboratory animals. *Sabouraudia* 4: 143-45
- Alteras I, Cojocaru I. 1969. Human infection by *Trichophyton mentagrophytes* from rabbits. *Mycoses* 12: 543-44
- Aly R. 1994. Ecology and epidemiology of dermatophyte infections. *Journal of the American Academy of Dermatology* 31: S21-S25
- Anderson JB. 2005. Evolution of antifungal-drug resistance: mechanisms and pathogen fitness. *Nature Reviews Microbiology* 3: 547-56
- Antonovics J, O'Keefe K, Hood ME. 1998. Theoretical population genetics of mating-type linked haplo-lethal alleles. *International Journal of Plant Sciences* 159: 192-98
- Anzawa K, Kawasaki M, Mochizuki T, Ishizaki H. 2010. Successful mating of *Trichophyton rubrum* with *Arthroderma simii*. *Medical Mycology* 48: 629-34
- Atlas RM. 2010. *Handbook of microbiological media*. London: CRC Press.
- AVMA U. 2012. Pet Ownership & Demographics Sourcebook. Dostupné na: <https://ebusiness.avma.org/ProductCatalog/product.aspx?ID=454>. *American Veterinary Medical Association*
- Baeza LC, Matsumoto MT, Almeida AMF, Mendes-Giannini MJS. 2006. Strain differentiation of *Trichophyton rubrum* by randomly amplified polymorphic DNA and analysis of rDNA nontranscribed spacer. *Journal of medical microbiology* 55: 429-36
- Balsari A, Bianchi C, Cocilovo A, Dragoni I, Poli G, Ponti W. 1981. Dermatophytes in clinically healthy laboratory animals. *Laboratory animals* 15: 75-77
- Bandelt H-J, Forster P, Röhl A. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* 16: 37-48
- Becker K, Beer C, Freitag M, Kück U. 2015. Genome-wide identification of target genes of a mating-type α -domain transcription factor reveals functions beyond sexual development. *Molecular Microbiology* 96: 1002-22
- Beguín H, Goens K, Hendrickx M, Planard C, Stubbe D, Detandt M. 2013. Is *Trichophyton simii* endemic to the Indian subcontinent? *Medical Mycology* 51: 444-8
- Benedek T. 1964. Some remarks on cultures of dermatophytes on hair-on-soil medium. *Mycopathologia et Mycologia Applicata* 24: 331-34
- Benger S, Townsend P, Ashford RL, Lambert P. 2004. An in vitro study to determine the minimum inhibitory concentration of *Melaleuca alternifolia* against the dermatophyte *Trichophyton rubrum*. *The Foot* 14: 86-91
- Benkhali JA, Coppin E, Brun S, Peraza-Reyes L, Martin T, et al. 2013. A network of HMG-box transcription factors regulates sexual cycle in the fungus *Podospora anserina*. *PLoS Genetics* 9: e1003642
- Borman AM, Campbell CK, Fraser M, Johnson EM. 2007. Analysis of the dermatophyte species isolated in the British Isles between 1980 and 2005 and review of worldwide dermatophyte trends over the last three decades. *Medical Mycology* 45: 131-41
- Brasier C. 1988. Rapid changes in genetic structure of epidemic populations of *Ophiostoma ulmi*. *Nature* 332: 538-41

- Brilhante RS, Cordeiro RA, Gomes JM, Sidrim JJ, Rocha MF. 2006. Canine dermatophytosis caused by an anthropophilic species: molecular and phenotypical characterization of *Trichophyton tonsurans*. *Journal of medical microbiology* 55: 1583-86
- Brown A, Feldman M, Nevo E. 1980. Multilocus structure of natural populations of *Hordeum spontaneum*. *Genetics* 96: 523-36
- Buxton P, Milne L, Prescott R, Proudfoot M, Stuart F. 1996. The prevalence of dermatophyte infection in well-controlled diabetics and the response to *Trichophyton* antigen. *British Journal of Dermatology* 134: 900-03
- Cafarchia C, Weigl S, Figueredo LA, Otranto D. 2012. Molecular identification and phylogenesis of dermatophytes isolated from rabbit farms and rabbit farm workers. *Veterinary microbiology* 154: 395-402
- Cano J, Rezusta A, Solé M, Gil J, Rubio MC, et al. 2005. Inter-single-sequence-repeat-PCR typing as a new tool for identification of *Microsporum canis* strains. *Journal of dermatological science* 39: 17-21
- Clement M, Snell Q, Walker P, Posada D, Crandall K. *ipdps2002*: 0184. IEEE.
- Coppin E, Debuchy R, Arnaise S, Picard M. 1997. Mating types and sexual development in filamentous ascomycetes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 61: 411-28
- d'Ovidio D, Grable S, Ferrara M, Santoro D. 2014. Prevalence of dermatophytes and other superficial fungal organisms in asymptomatic guinea pigs in Southern Italy. *Journal of Small Animal Practice* 55: 355-58
- Davidsson M, Unestam T. 1974. Factors affecting the sexual reproduction of a dermatophyte, *Arthroderma benhamiae*, in synthetic media. *Physiologia Plantarum* 31: 237-44
- Dawson CO, Gentles J, Brown EM. 1964. Environmental conditions affecting sexual reproduction in species of *Arthroderma* and *Nannizzia*. *Sabouraudia* 3: 245-50
- de Assis Santos D, de Carvalho Araújo RA, Kohler LM, Machado-Pinto J, Hamdan JS, Cisalpino PS. 2007. Molecular typing and antifungal susceptibility of *Trichophyton rubrum* isolates from patients with onychomycosis pre-and post-treatment. *International journal of antimicrobial agents* 29: 563-69
- De Vroey C. 1964. Formes sexuées des dermatophytes. *Annales de la Societe Belge de Medecine Tropicale*: 44-54
- Dieringer D, Schlötterer C. 2003. Microsatellite analyser (MSA): a platform independent analysis tool for large microsatellite data sets. *Molecular Ecology Notes* 3: 167-69
- Dighton J, White Jr JF, White J, Oudemans P, eds. 2005. *The fungal community: its organization and role in the ecosystem*: CRC Press.
- Dolenc-Voljč M. 2015. Dermatophyte Infections in Humans ve: Medical Mycology: Current Trends and Future Prospects *CRC press, Florida, USA*: 3-27
- Donnelly TM, Rush EM, Lackner PA. 2000. Ringworm in small exotic pets. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine* 9: 82-93
- Drouot S, Mignon B, Fratti M, Roosje P, Monod M. 2009. Pets as the main source of two zoonotic species of the *Trichophyton mentagrophytes* complex in Switzerland, *Arthroderma vanbreuseghemii* and *Arthroderma benhamiae*. *Veterinary Dermatology* 20: 13-18
- Dvořák J, Otčenášek M. 1969. *Mycological diagnosis of animal dermatophytoses*. Praha: Academia.
- Efuntoye MO, Fashanu SO. 2002. Fungi isolated from skins and pens of healthy animals in Nigeria. *Mycopathologia* 153: 21-23
- Ehrich D. 2006. AFLPdat: a collection of R functions for convenient handling of AFLP data. *Molecular Ecology Notes* 6: 603-04
- Ehrich D, Gaudeul M, Assefa A, Koch MA, Mummenhoff K, et al. 2007. Genetic consequences of Pleistocene range shifts: contrast between the Arctic, the Alps and the East African mountains. *Molecular Ecology* 16: 2542-59
- Ergin Ş, Ergin C, Erdoğan B, Kaleli I, Evliyaoğlu D. 2006. An experience from an outbreak of tinea capitis gladiatorum due to *Trichophyton tonsurans*. *Clinical and Experimental Dermatology* 31: 212-14
- Excoffier L, Heckel G. 2006. Computer programs for population genetics data analysis: a survival guide. *Nature Reviews Genetics* 7: 745-58
- Excoffier L, Smouse PE, Quattro JM. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131: 479-91
- Falush D, Stephens M, Pritchard JK. 2007. Inference of population structure using multilocus genotype data: dominant markers and null alleles. *Molecular Ecology Notes* 7: 574-78
- Fari E, Gräser Y. 2000. An epidemic of tinea corporis caused by *Trichophyton tonsurans* among children (wrestlers) in Germany. *Mycoses* 43: 191-96

- Fehr M. 2015. Zoonotic potential of dermatophytosis in small mammals. *Journal of Exotic Pet Medicine*: Accepted
- Fischer ML, Hochkirch A, Heddergott M, Schulze C, Anheyer-Behmenburg HE, et al. 2015. Historical invasion records can be misleading: Genetic evidence for multiple introductions of invasive raccoons (*Procyon lotor*) in Germany. *PLoS ONE* 10: e0125441
- Fumeaux J, Mock M, Ninet B, atrice e, Jan I, et al. 2004. First report of *Arthroderma benhamiae* in Switzerland. *Dermatology* 208: 244-50
- Gentles J, Dawson CO, Brown EM. 1964. Sexual reproduction in the dermatophytes. *Annales de la Societe Belge de Medecine Tropicale* 44: 803-10
- Georg LK. 1960. Epidemiology of the dermatophytoses sources of infection, modes of transmission and epidemicsity. *Annals of the New York Academy of Sciences* 89: 69-77
- Ghani H, Lancaster J, Larsh H. 1974. Genetic analysis of pigmentation in *Arthroderma benhamiae*. *Journal of General Microbiology* 84: 205-08
- Goss WA, Actor P, Jambor WP, Pagano JF. 1963. The *Trichophyton mentagrophytes* and *Microsporum canis* infection of the guinea-pig. *Journal of Investigative Dermatology* 40: 299-304
- Graser Y, De Hoog S, Summerbell RC. 2006. Dermatophytes: recognizing species of clonal fungi. *Medical Mycology* 44: 199-209
- Gräser Y, El Fari M, Vilgalys R, Kuijpers A, De Hoog G, et al. 1999a. Phylogeny and taxonomy of the family Arthrodermataceae (dermatophytes) using sequence analysis of the ribosomal ITS region. *Medical Mycology* 37: 105-14
- Graser Y, Frohlich J, Presber W, de Hoog S. 2007. Microsatellite markers reveal geographic population differentiation in *Trichophyton rubrum*. *Journal of medical microbiology* 56: 1058-65
- Gräser Y, Kuijpers A, Presber W, De Hoog G. 1999b. Molecular taxonomy of *Trichophyton mentagrophytes* and *T. tonsurans*. *Medical mycology* 37: 315-30
- Gregory M, English MP. 1975. *Arthroderma benhamiae* infection in the central African hedgehog, *Erinaceus albiventris*, and a report of a human case. *Mycopathologia* 55: 143-47
- Hashimoto T. 1991. Infectious propagules of dermatophytes In *The fungal spore and disease initiation in plants and animals*, ed. G Cole, C Hoch, pp. 181-202. New York, USA: Plenum Press
- Havlickova B, Czaika VA, Friedrich M. 2008. Epidemiological trends in skin mycoses worldwide. *Mycoses* 51: 2-15
- Heidemann S, Monod M, Graser 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*. *British Journal of Dermatology* 162: 282-95
- Hejtmánek M, Hejtmánková N. 1988. Teleomorphs and mating types in *Trichophyton mentagrophytes* complex. *Acta Universitatis Palackianae Olomucensis Facultatis Medicae* 123: 11-33
- Hejtmánek M, Hejtmánková N. 1989. Hybridization and sexual stimulation in *Trichophyton mentagrophytes*. *Folia Microbiologica* 34: 77-79
- Heltai M, Szemethy L, Lanszki J, Csányi S. 2000. Returning and new mammal predators in Hungary: the status and distribution of the golden jackal (*Canis aureus*), raccoon dog (*Nyctereutes procyonoides*) and raccoon (*Procyon lotor*) in 1997–2000. *Beiträge zur Jagd-und Wildforschung* 26: 95-102
- Hemsworth S, Pizer B. 2006. Pet ownership in immunocompromised children—a review of the literature and survey of existing guidelines. *European Journal of Oncology Nursing* 10: 117-27
- Hironaga M, Watanabe S. 1980. Mating behavior of 334 Japanese isolates of *Trichophyton mentagrophytes* in relation to their ecological status. *Mycologia* 2: 1159-70
- Hiruma J, Kano R, Harada K, Monod M, Hiruma M, et al. 2015. Occurrence of *Arthroderma benhamiae* genotype in Japan. *Mycopathologia* 179: 219-23
- Hiruma J, Kano R, Kimura U, Takamori K, Suga Y, et al. 2014. Mating type gene for isolates of *Trichophyton mentagrophytes* from guinea pigs. *The Journal of dermatology* 41: 743-45
- Hohmann U, Gerhard R, Kasper M. 2000. Wissenschaftliche Kurzmitteilungen—Home range size of adult raccoons (*Procyon lotor*) in Germany. *Zeitschrift für Säugetierkunde* 65: 124-27
- Hubka V, Čmoková A, Skořepová M, Mallátová N, Dobiášová S, et al. 2014a. Současný vývoj v taxonomii dermatofyt a doporučení pro pojmenovávání klinicky významných druhů. *Čes-slov. Derm.* 89: 151-65
- Hubka V, Mallátová N, Hamal P, Větrovský T, Janouškovcová H, et al. 2014b. Molekulární epidemiologie dermatofytóz v České republice: výsledky dvouleté studie. *Čes-slov. Derm.* 89: 167-74
- Hubka V, Skořepova M, Kolarik M. *One year overview of non-T. rubrum dermatophytes isolated in Czech Republic and identified by molecular methods. 18th Congress of the International Society for Human and Animal Mycology, Berlin, Germany, 2012*, 55: 541. *Mycoses*.

- Huson DH, Bryant D. 2006. Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. *Molecular biology and evolution* 23: 254-67
- Chang Y, Wickes B, Miller G, Penoyer L, Kwon-Chung K. 2000. *Cryptococcus neoformans* STE12 α regulates virulence but is not essential for mating. *The Journal of Experimental Medicine* 191: 871-82
- Cheema MS, Christians JK. 2011. Virulence in an insect model differs between mating types in *Aspergillus fumigatus*. *Medical Mycology* 49: 202-07
- Chermette R, Ferreiro L, Guillot J. 2008. Dermatophytoses in animals. *Mycopathologia* 166: 385-405
- Jackson CJ, Mochizuki T, Barton RC. 2006. PCR fingerprinting of *Trichophyton mentagrophytes* var. *interdigitale* using polymorphic subrepeat loci in the rDNA nontranscribed spacer. *Journal of medical microbiology* 55: 1349-55
- Jolley KA, Feil E, Chan M-S, Maiden MCJ. 2001. Sequence type analysis and recombinational tests (START.2). Dostupné na: <http://pubmlst.org/software/analysis/start2/>. *Bioinformatics* 17: 1230-31
- Kac G, Bougnoux M, Feuillade De Chauvin M, Sene S, Derouin F. 1999. Genetic diversity among *Trichophyton mentagrophytes* isolates using random amplified polymorphic DNA method. *British Journal of Dermatology* 140: 839-44
- Kamihama T, Kimura T, Hosokawa J, Ueji M, Takase T, Tagami K. 1997. Tinea pedis outbreak in swimming pools in Japan. *Public Health* 111: 249-53
- Kane J, Leavitt E, Summerbell R, Krajden S, Kasatiya S. 1988. An outbreak of *Trichophyton tonsurans* dermatophytosis in a chronic care institution for the elderly. *European Journal of Epidemiology* 4: 144-49
- Kane J, Summerbell R, Sigler L, Krajden 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, California: Star Publishing.
- Kano R, Nakamura Y, Yasuda K, Watari T, Watanabe S, et al. 1997. The first isolation of *Arthroderma benhamiae* in Japan. *Microbiology and immunology* 42: 575-78
- Kano R, Sano A, Makimura K, Watanabe S, Nishimura K, et al. 2008. A new genotype of *Arthroderma benhamiae*. *Medical Mycology* 46: 739-44
- Kano R, Yamada T, Makimura K, Kawasaki M, Mochizuki T, et al. 2011. *Arthroderma benhamiae* (the teleomorph of *Trichophyton mentagrophytes*) mating type-specific genes. *Mycopathologia* 171: 333-7
- Kaszubiak A, Klein S, de Hoog GS, Graser Y. 2004. Population structure and evolutionary origins of *Microsporum canis*, *M. ferrugineum* and *M. audouinii*. *Infection, Genetics and Evolution* 4: 179-86
- Kawasaki M, Anzawa K, Mochizuki T, Ishizaki H, M. Hemashettar B. 2009. Successful mating of a human isolate of *Arthroderma simii* with a tester strain of *A. vanbreuseghemii*. *Medical Mycology Journal* 50: 15-18
- Kawasaki M, Anzawa K, Takeda K, Tanabe H, Mochizuki T, Ishizaki H. 2008a. Genetic and phenotypic variations among F1 progenies of *Arthroderma benhamiae*. *Medical Mycology Journal* 49: 103-10
- Kawasaki M, Anzawa K, Wakasa A, Takeda K, Mochizuki T, et al. 2010. Matings among three teleomorphs of *Trichophyton mentagrophytes*. *Medical Mycology Journal* 51: 143-52
- Kawasaki M, Anzawa K, Wakasa A, Takeda K, Tanabe H, et al. 2008b. Different genes can result in different phylogenetic relationships in *Trichophyton* species. *Japanese Journal of Medical Mycology* 49: 311-18
- Kawasaki M, Aso M, Inoue T, Ohsawa T, Ishioka S, et al. 2000. Two cases of tinea corporis by infection from a rabbit with *Arthroderma benhamiae*. *Japanese journal of medical mycology* 41: 263-7
- Kawasaki M, Mochizuki T, Ishizaki H, Fujihiro M. 2002. Isolation and genotype analyses of ascospores produced between genetically different *Arthroderma benhamiae* strains. *Medical Mycology Journal* 43: 169-73
- Kelly KL. 1964. *Inter-Society Color Council – National Bureau of Standards Color Name Charts Illustrated with Centroid Colors*. Washington, DC: US Government Printing Office.
- Kraemer A, Hein J, Heusinger A, Mueller R. 2012a. Clinical signs, therapy and zoonotic risk of pet guinea pigs with dermatophytosis. *Mycoses* 56: 168–72
- Kraemer A, Mueller R, Werckenthin C, Straubinger R, Hein J. 2012b. Dermatophytes in pet Guinea pigs and rabbits. *Veterinary microbiology* 157: 208-13
- Kuklova I, Kučerová H. 2001. Dermatophytoses in Prague, Czech Republic, between 1987 and 1998. *Mycoses* 44: 493-96
- Kwon-Chung KJ, Edman JC, Wickes BL. 1992. Genetic association of mating types and virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Infection and Immunity* 60: 602-05
- Leigh J, Bryant D, Steel M. 2013. PopART (Population Analysis with Reticulate Trees). Dostupné na: <http://popart.otago.ac.nz/index.shtml>.
- Leo AE, Ford R, Linde CC. 2015. Genetic homogeneity of a recently introduced pathogen of chickpea, *Ascochyta rabiei*, to Australia. *Biological Invasions* 17: 609-23

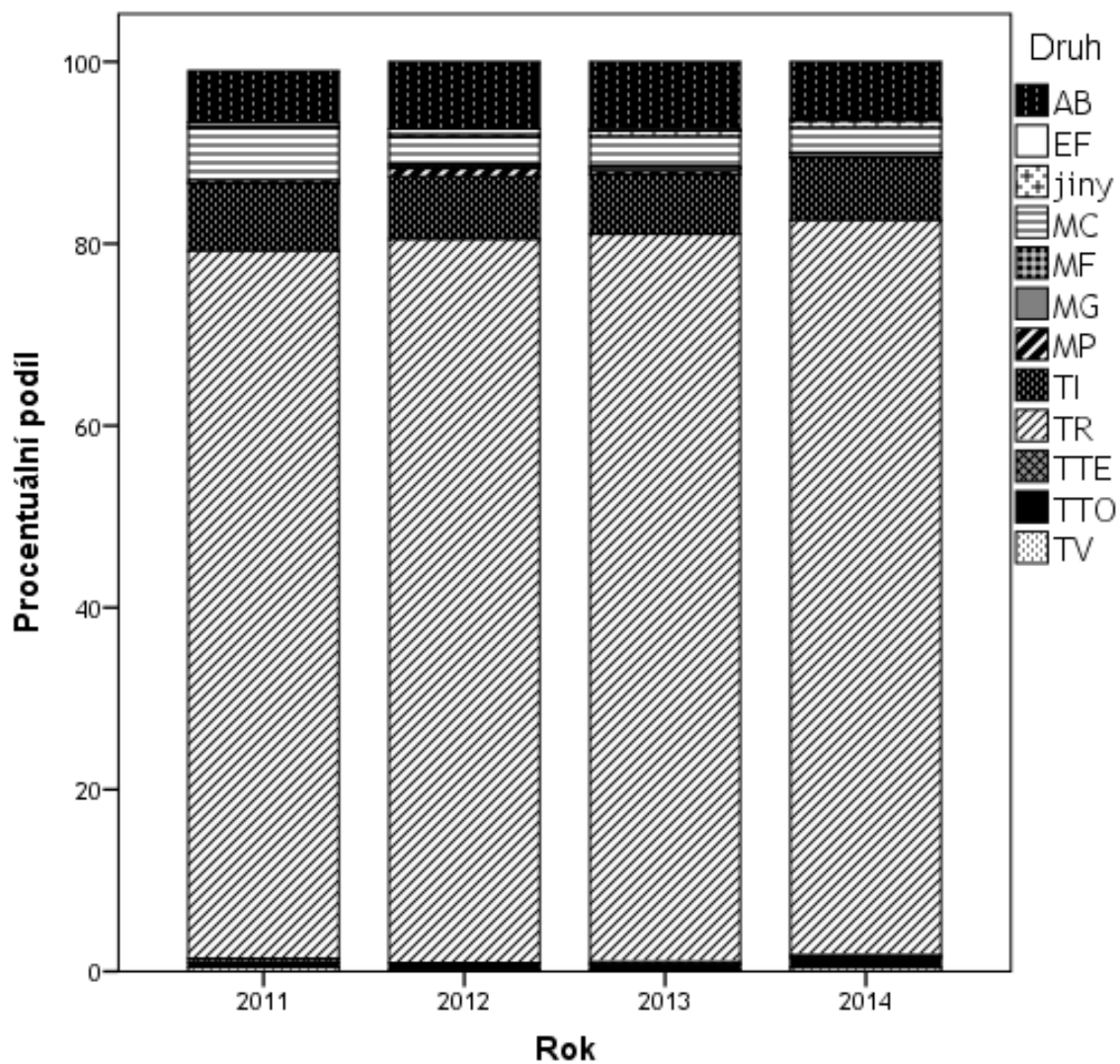
- Letunic I, Bork P. 2007. Interactive Tree Of Life (iTOL): an online tool for phylogenetic tree display and annotation. Dostupné na: <http://itol.embl.de/index.shtml>. *Bioinformatics* 23: 127-28
- Leyronas C, Bryone F, Duffaud M, Troulet C, Nicot P. 2015. Assessing host specialization of *Botrytis cinerea* on lettuce and tomato by genotypic and phenotypic characterization. *Plant Pathology* 64: 119-27
- Li W, Metin B, White TC, Heitman J. 2010. Organization and evolutionary trajectory of the mating type (MAT) locus in dermatophyte and dimorphic fungal pathogens. *Eukaryotic Cell* 9: 46-58
- Martins WS, Lucas DCS, de Souza Neves KF, Bertioli DJ. 2009. WebSat-A web software for microsatellite marker development. Dostupné na: <http://purl.oclc.org/NET/websat/>. *Bioinformation* 3: 282
- Matějů J, Dvořák S, Tejrovský V, Bušek O, Ježek M, Matějů Z. 2012. Current distribution of *Procyon lotor* in north-western Bohemia, Czech Republic (Carnivora: Procyonidae). *Lynx, series nova* 43
- Matute DR, Sepulveda VE, Quesada LM, Goldman GH, Taylor JW, et al. 2006. Microsatellite analysis of three phylogenetic species of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Journal of Clinical Microbiology* 44: 2153-57
- Meyer D, Zeileis A, Hornik K. 2012. Vcd: Visualizing categorical data. R package verze 1.2–13. Dostupné na: <http://cran.r-project.org/web/packages/vcd/index.htm>.
- Mochizuki T, Kawasaki M, Ishizaki H, Kano R, Hasegawa A, et al. 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. *Journal of dermatological science* 27: 14-20
- Mochizuki T, Kawasaki M, Tanabe H, Anzawa K, Ishizaki H, Choi JS. 2007. Molecular epidemiology of *Trichophyton tonsurans* isolated in Japan using RFLP analysis of non-transcribed spacer regions of ribosomal RNA genes. *Japanese Journal of Infectious Diseases* 60: 188-92
- Moretti A, Agnetti F, Mancianti F, Nardoni S, Righi C, et al. 2013. Epidemiological, clinical and zoonotic aspects. *Giornale Italiano di Dermatologia e Venereologia* 148: 563-72
- Müller-Using D. 1959. Die Ausbreitung des Waschbären (*Procyon lotor* [L.]) in Westdeutschland. *Zeitschrift für Jagdwissenschaft* 5: 108-09
- Muller K. 2006. SeqState. Verze 1.32. (2014-12-02). Dostupné na: <http://bioinfweb.info/Software/SeqState>.
- Musilová R, Alexander Š, Janoušek K. 2011. Mýval severní – vetřelec v Poohří. *Myslivost* 12: 22-23
- Nakamura Y, Kano R, Nakamura E, Saito K, Watanabe S, Hasegawa A. 2002. First report on human ringworm caused by *Arthroderma benhamiae* in Japan transmitted from a rabbit. *Mycoses* 45: 129-31
- Nenoff P, Gräser Y, Uhrlaß S, Krueger C, Herrmann J. *Arthroderma benhamiae*-an overlooked zoophilic Dermatophyte? *Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft, Malden, USA, 2011*, 9: 8-9. Wiley-Blackwell.
- Nenoff P, Herrmann J, Gräser Y. 2007. *Trichophyton mentagrophytes* sive *interdigitale*? A dermatophyte in the course of time. *Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft* 5: 198-202
- Nenoff P, Schulze I, Uhrlaß S, Krüger C. 2013. Kerion Celsi durch den zoophilen Dermatophyten *Trichophyton* species von *Arthroderma benhamiae* bei einem Kind. *Der Hautarzt* 64: 846-50
- Nenoff P, Uhrlaß S, Krüger C, Erhard M, Hipler U, et al. 2014. *Trichophyton* species of *Arthroderma benhamiae* – a new infectious agent in dermatology. *Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft* 12: 571-81
- Nielsen K, Marra RE, Hagen F, Boekhout T, Mitchell TG, et al. 2005. Interaction between genetic background and the mating-type locus in *Cryptococcus neoformans* virulence potential. *Genetics* 171: 975-83
- Nweze E. 2010. Dermatophytosis in Western Africa: a review. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 13: 649-56
- O'Donnell K, Cigelnik E. 1997. Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are nonorthologous. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 7: 103-16
- Ohst T, De Hoog S, Presber W, Stavrakieva V, Gräser Y. 2004. Origins of microsatellite diversity in the *Trichophyton rubrum*-*T. violaceum* clade (dermatophytes). *Journal of Clinical Microbiology* 42: 4444-48
- Olšová T. 2012. *Chov urzona kanadského (Erethizon dorsatum) v zoologických zahradách v České republice*. Česká zemědělská univerzita v Praze, Praha
- Overy DP, Marron-Lopez F, Muckle A, Bourque A, Lund L, et al. 2015. Dermatophytosis in farmed mink (*Mustela vison*) caused by *Trichophyton equinum*. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 1: 1-6
- Padhye A, Carmichael J. 1969. Mating behaviour of *Trichophyton mentagrophytes* varieties paired with *Arthroderma benhamiae* mating types. *Medical Mycology* 7: 178-81
- Pasquetti M, Peano A, Soglia D, Min ARM, Pankewitz F, et al. 2013. Development and validation of a microsatellite marker-based method for tracing infections by *Microsporum canis*. *Journal of dermatological science* 70: 123-29
- Popiołek M, Szczesna-Staskiewicz J, Bartoszewicz M, Okarma H, Smalec B, Zalewski A. 2011. Helminth parasites of an introduced invasive carnivore species, the raccoon (*Procyon lotor* L.), from the Warta Mouth National Park (Poland). *The Journal of Parasitology* 97: 357-60

- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945-59
- Probst S, De Hoog G, Graser Y. 2002. Development of DNA markers to explore host shifts in dermatophytes. *Studies in Mycology* 47: 57-74
- Rippon JW. 1985. The changing epidemiology and emerging patterns of dermatophyte species. In *Current Topics in Medical Mycology*, ed. M McGinnis, pp. 208-34. New York: Springer
- Rippon JW, Garber ED. 1969. Dermatophyte pathogenicity as a function of mating type and associated enzymes. *Journal of Investigative Dermatology* 53: 445-48
- Ronquist F, Teslenko M, van der Mark P, Ayres DL, Darling A, et al. 2012. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic biology* 61: 539-42
- Saito K, Kano R, Nakamura Y, Watanabe S, Hasegawa A. 2001. *Arthroderma benhamiae* infection in a rabbit. *Journal of Veterinary Medical Science* 63: 929-31
- Samils N, Gioti A, Karlsson M, Sun Y, Kasuga T, et al. 2013a. Sex-linked transcriptional divergence in the hermaphrodite fungus *Neurospora tetrasperma*. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 280: 20130862
- Samils N, Gioti A, Karlsson M, Yu S, Kasuga T, et al. 2013b. Sex-linked phenotypic divergence in the hermaphrodite fungus *Neurospora tetrasperma*. *Proceedings of the Royal Society of London* 280: 20130862
- Scott D, Scott F. 1973. Dermatophytoses in south Africa. *Medical Mycology* 11: 279-82
- Seebacher C, Bouchara J-P, Mignon B. 2008. Updates on the epidemiology of dermatophyte infections. *Mycopathologia* 166: 335-52
- Shah P, Krajden S, Kane J, Summerbell R. 1988. Tinea corporis caused by *Microsporum canis*: report of a nosocomial outbreak. *European Journal of Epidemiology* 4: 33-38
- Sharma R, de Hoog S, Presber W, Graser Y. 2007. A virulent genotype of *Microsporum canis* is responsible for the majority of human infections. *Journal of medical microbiology* 56: 1377-85
- Sharma R, Presber W, Rajak RC, Graser Y. 2008. Molecular detection of *Microsporum persicolor* in soil suggesting widespread dispersal in central India. *Medical Mycology* 46: 67-73
- Shiraki Y, Hiruma M, Matsuba Y, Kano R, Makimura K, et al. 2006a. A case of tinea corporis caused by *Arthroderma benhamiae* (teleomorph of *Tinea mentagrophytes*) in a pet shop employee. *Journal of the American Academy of Dermatology* 55: 153-54
- Shiraki Y, Ishibashi Y, Hiruma M, Nishikawa A, Ikeda S. 2006b. Cytokine secretion profiles of human keratinocytes during *Trichophyton tonsurans* and *Arthroderma benhamiae* infections. *Journal of medical microbiology* 55: 1175-85
- Shroba J, Olson-Burgess C, Preuett B, Abdel-Rahman S. 2009. A large outbreak of *Trichophyton tonsurans* among health care workers in a pediatric hospital. *American Journal of Infection Control* 37: 43-48
- Schlueter PM, Harris SA. 2006. Analysis of multilocus fingerprinting data sets containing missing data. *Molecular Ecology Notes* 6: 569-72
- Schuelke M. 2000. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nature Biotechnology* 18: 233-34
- Siekclucki U, Oh SH, Hoyer LL. 2014. Frequent isolation of *Arthroderma benhamiae* from dogs with dermatophytosis. *Veterinary dermatology* 25: 39-e14
- Singh I, Mishra A, Kushwaha R. 2009. Dermatophytes, related keratinophilic and opportunistic fungi in indoor dust of houses and hospitals. *Indian Journal of Medical Microbiology* 27: 242-46
- Skořepová M, Hubka V, Polášková S, Stará J, Čmoková A. 2014. Naše první zkušenosti s infekcemi vyvolanými *Arthroderma benhamiae* (*Trichophyton* sp.). *Čes-slov. Derm.* 89: 192-98
- Snider R, Landers S, Levy M. 1993. The ringworm riddle: an outbreak of *Microsporum canis* in the nursery. *The Pediatric Infectious Disease Journal* 12: 145-48
- Spesso M, Nuncira C, Burstein V, Masih D, Dib M, Chiapello L. 2013. Microsatellite-primed PCR and random primer amplification polymorphic DNA for the identification and epidemiology of dermatophytes. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 32: 1009-15
- SPSS I. 2011. IBM SPSS Statistics for Windows, Verze 20.0. Dostupné na: <http://www-01.ibm.com/support/docview.wss?uid=swg21509012>. Chicago, IL: SPSS Inc
- Stockdale PM, Mackenzie D, Austwick P. 1965. *Arthroderma simii* sp. nov., the perfect state of *Trichophyton simii* (Pinoy) comb. nov. *Medical Mycology* 4: 112-23
- Sugita T, Shiraki Y, Hiruma M. 2006. Genotype analysis of the variable internal repeat region in the rRNA gene of *Trichophyton tonsurans* isolated from Japanese Judo practitioners. *Microbiology and Immunology* 50: 57-60

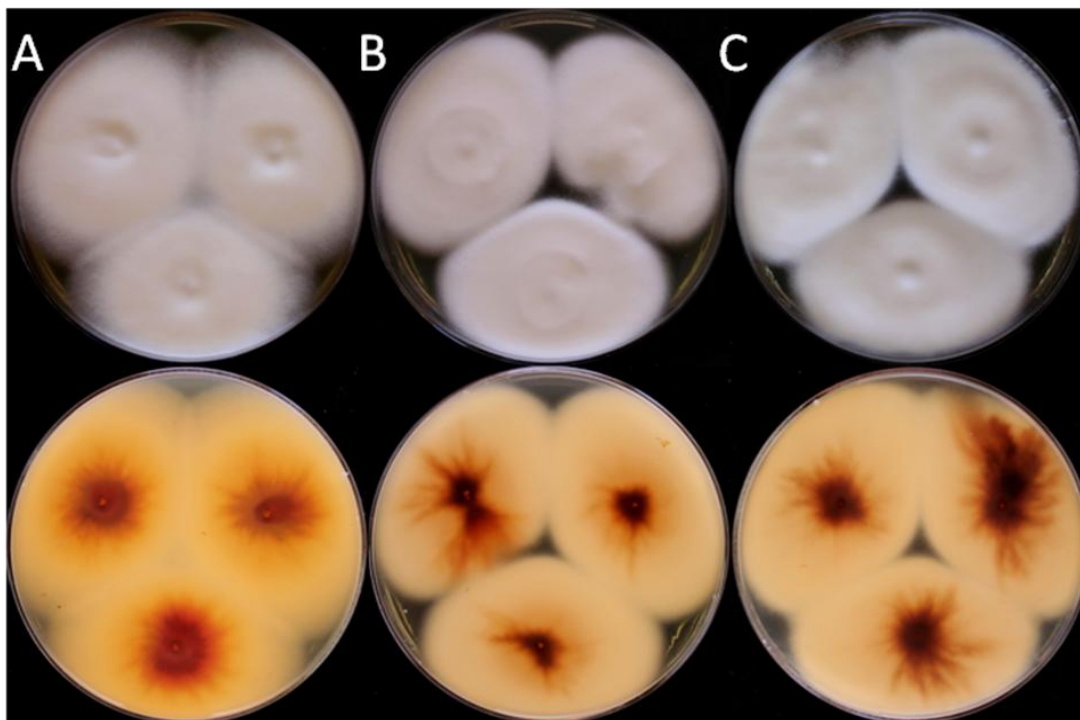
- Summerbell R. 2002. What is the evolutionary and taxonomic status of asexual lineages in the dermatophytes? *Studies in Mycology*: 97-101
- Summerbell R, Weitzman I, Padhye A. 2002. The *Trichophyton mentagrophytes* complex: biological species and mating type prevalences of North American isolates, and a review of the worldwide distribution and host associations of species and mating types. *Studies in Mycology*: 75-86
- Symoens F, Jousson O, Packeu A, Fratti M, Staib P, et al. 2013. The dermatophyte species *Arthroderma benhamiae*: intraspecies variability and mating behaviour. *Journal of medical microbiology* 62: 377-85
- Symoens F, Jousson O, Planard C, Fratti M, Staib P, et al. 2011. Molecular analysis and mating behaviour of the *Trichophyton mentagrophytes* species complex. *International Journal of Medical Microbiology* 301: 260-6
- Šimaljaková M. 2010. Zooantroponózne dermatofytózy. *Dermatol. prax* 4: 86–88
- Takahashi H, Takahashi-Kyuhachi H, Takahashi Y, Yarita K, Takayama A, et al. 2008. An intrafamilial transmission of *Arthroderma benhamiae* in Canadian porcupines (*Erethizon dorsatum*) in a Japanese zoo. *Medical Mycology* 46: 465-73
- Takahashi Y, Sano A, Takizawa K, Fukushima K, Miyaji M, Nishimura K. 2003. The epidemiology and mating behavior of *Arthroderma benhamiae* var. *erinacei* in household four-toed hedgehogs (*Atelerix albiventris*) in Japan. *Japanese Journal of Medical Mycology* 44: 31-38
- Takashio M. 1972. Sexual reproduction of some *Arthroderma* and *Nannizzia* on diluted Sabouraud agar with or without salts. *Mycoses* 15: 11-17
- Takashio M. 1973. Une nouvelle forme sexuée du complexe *Trichophyton mentagrophytes*, *Arthroderma vanbreuseghemii* sp. nov. *Annales de Parasitologie humaine et comparée* 48: 713-32
- Takashio M. 1974. Observations on African and European strains of *Arthroderma benhamiae*. *International Journal of Dermatology* 13: 94-101
- Takashio M. 1979. Taxonomy of dermatophytes based on their sexual states. *Mycologia*: 968-76
- Takeda K, Nishibu A, Anzawa K, Mochizuki T. 2012. Molecular epidemiology of a major subgroup of *Arthroderma benhamiae* isolated in Japan by restriction fragment length polymorphism analysis of the non-transcribed spacer region of ribosomal RNA gene. *Japanese Journal of Infectious Diseases* 65: 233-39
- Tietz H, Hämmerling R. 2007. Die Bedeutung zoophiler Dermatophyten für den Menschen und anthropophiler Zoonosen für das Tier. *Prakt Tierarzt* 9: 78-86
- Torres-Rodriguez J, Dronda M, Rossell J, Madrenys N. 1992. Incidence of dermatophytoses in rabbit farms in Catalonia, Spain, and its repercussion on human health. *European Journal of Epidemiology* 8: 326-29
- Uhrlass S, Ebert A, Krueger C, Nenoff P. *Mycoses, Trichophyton species of Arthroderma benhamiae-a new and frequently isolated zoophilic dermatophyt-data concerning the prevalence in Central Germany. Hoboken, USA, 2013*, 56: 15-15. Wiley-Blackwell.
- Uhrlass S, Nenoff P, Krueger C. *Mycoses, Microsporum canis and Trichophyton anamorph of Arthroderma benhamiae-a comparison of the prevalence of the zoophilic dermatophytes in Central Germany. Hoboken, USA, 2014*, 57: 29-29. Wiley-Blackwell.
- van Avermaete K. 2014. *The prevalence of Trichophyton mentagrophytes and Cheyletiella spp. in guinea pigs in Dutch petshops*. Utrecht University, Netherlands
- Vangeel I, Pasmans F, Vanrobaeys M, Herdt Pd, Haesebrouck F. 2000. Prevalence of dermatophytes in asymptomatic guinea pigs and rabbits. *Veterinary Record* 146: 440-41
- Vella Zahra L, Gatt P, Boffa MJ, Borg E, Mifsud E, et al. 2003. Characteristics of superficial mycoses in Malta. *International Journal of Dermatology* 42: 265-71
- Venables WN, Smith DM, (2011) tRDCT. 2011. An Introduction to R - Notes on R: A Programming Environment for Data Analysis and Graphics. Verze 2.13.0 (2011–06–10). Dostupné na: <http://www.r-project.org/via>
- Vidyasagar G, Hosmani N, Shivkumar D. 2005. Keratinophilic fungi isolated from hospital dust and soils of public places at Gulbarga, India. *Mycopathologia* 159: 13-21
- Weir BS, Cockerham CC. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38: 1358-70
- 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. *Medical Mycology* 5: 335-40
- Wickes BL, Edman U, Edman JC. 1997. The *Cryptococcus neoformans* STE12 α gene: a putative Saccharomyces cerevisiae STE12 homologue that is mating type specific. *Molecular Microbiology* 26: 951-60
- Yazdanparast A, Jackson CJ, Barton RC, Evans E. 2003. Molecular strain typing of *Trichophyton rubrum* indicates multiple strain involvement in onychomycosis. *British Journal of Dermatology* 148: 51-54

- Yockteng R, Marthey S, Chiapello H, Gendrault A, Hood ME, et al. 2007. Expressed sequence tags of the anther smut fungus, *Microbotryum violaceum*, identify mating and pathogenicity genes. *BMC genomics* 8: 272
- 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
- Yue C, Cavallo LM, Alspaugh JA, Wang P, Cox GM, et al. 1999. The STE12 α homolog is required for haploid filamentation but largely dispensable for mating and virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Genetics* 153: 1601-15
- Zeigler R, Cuoc L, Scott R, Bernardo M, Chen D, et al. 1995. The relationship between lineage and virulence in *Pyricularia grisea* in the Philippines. *Phytopathology* 85: 443-51
- Ziółkowska G, Nowakiewicz A, Gnat S, Trościańczyk A, Zięba P, Majer Dziedzic B. 2015. Molecular identification and classification of *Trichophyton mentagrophytes* complex strains isolated from humans and selected animal species. *Mycoses* 58: 119-26

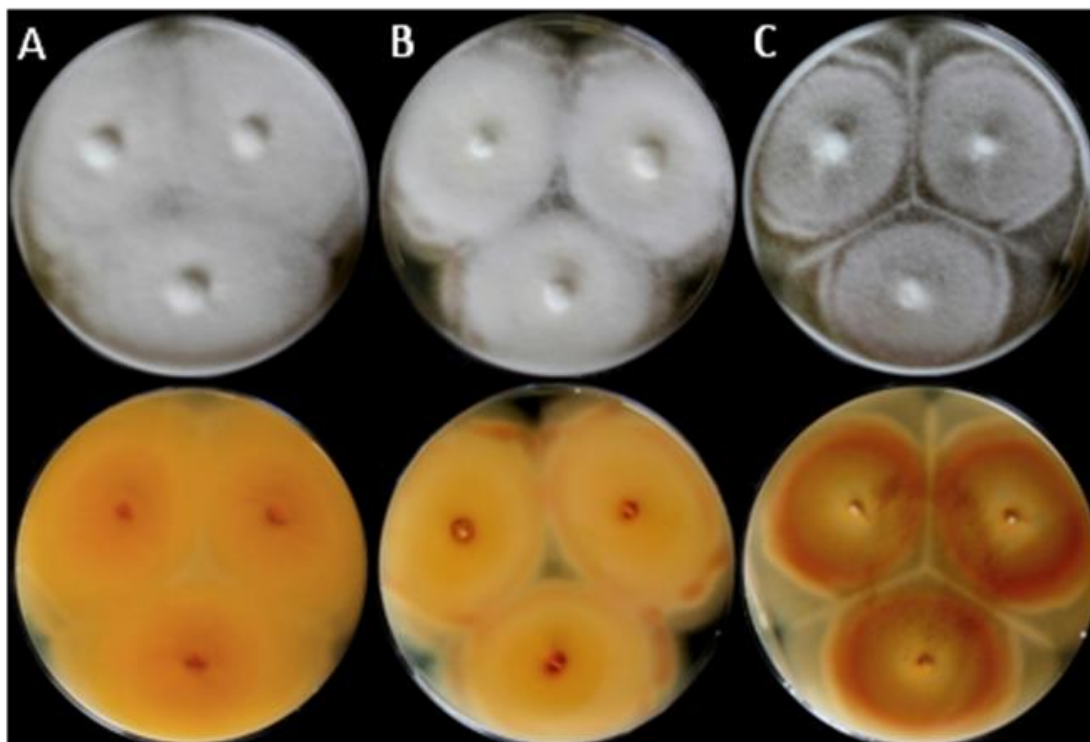
7. PŘÍLOHA 1 - obrazová příloha



Obrázek P1: Procentuální podíl jednotlivých druhů dermatofytů izolovaných z případů dermatofytóz na lékařských pracovištích v ČR (n=5447) v letech 2011 (n=904), 2012 (n=1710), 2013 (n=1593) a 2014 (n=1240).



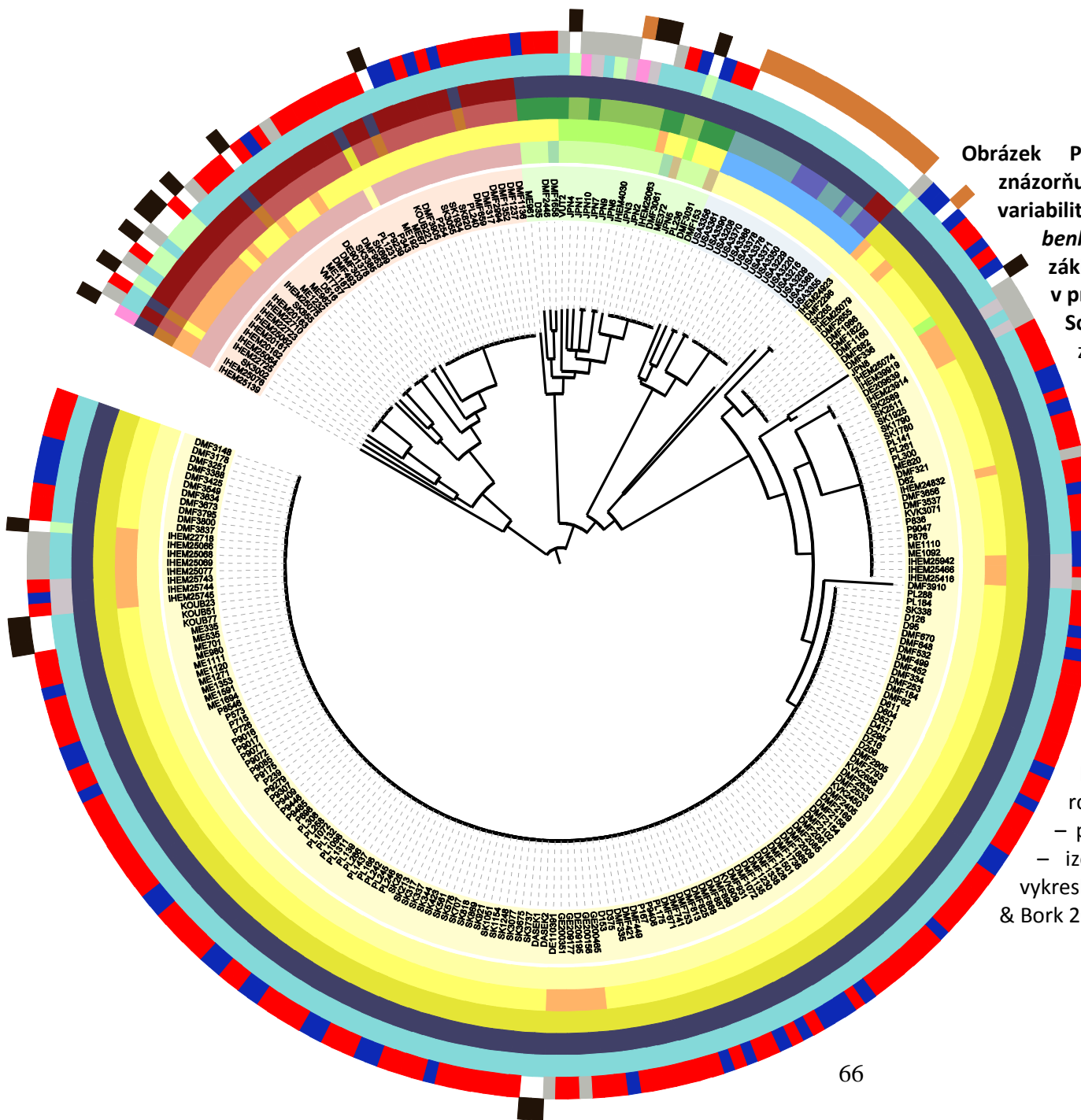
Obrázek P2: Makromorfologie kmenu ME 67 (fenotyp F2, MAT1-1 párovací typ) druhu *Arthroderma benhamiae* při 25°C po 14 dnech kultivace na SAB (A), MEA (B) a PDA (C).



Obrázek P3: Makromorfologie kmenu IHEM 4030 (fenotyp F3) druhu *Arthroderma benhamiae* při 25°C po 14 dnech kultivace na SAB (A), MEA(B) a PDA(C).

Tabulka P1: Počty genotypů, frekvence jednotlivých alel a Shannonův index diverzity (D) jednotlivých lokusů pro mikrosatelitní a sekvenční data.

Mikrosatelitní analýza													Sekvenční analýza																	
Lokus	AB_CT21	AB_CT21b	AB_TAG16	AB_TC17b	AB_TC20	AB_TCA16	AB_AG21	AB_TC19	AB_TC17a	AB_AG21	Všechny lokusy	<i>gpdh</i>	ITS	ITS+ <i>gpdh</i>																
D	0,49	0,48	0,62	0,47	0,42	0,49	0,47	0,48	0,48	0,52	0,68	0,39	0,39	0,4																
Počet genotypů	9	6	13	5	6	9	6	6	7	6	32	5	6																	
Alely a jejich frekvence (%)	228	0,74	271	0,37	205	5,95	328	0,37	173	0,37	251	0,37	325	7,81	227	5,58	260	0,37	347	0,37	YEL1	1,12	1	75,8	1	75,8	SG1	75,8		
	240	7,81	273	5,95	233	5,2	346	0,37	183	7,81	268	0,37	339	0,37	231	0,37	270	8,18	367	0,74	YEL2	2,6	2	16	2	16,7	SG2	16		
	242	0,74	279	69,5	236	1,86	356	12,6	185	0,74	280	8,18	351	19	233	70,3	276	0,37	369	65,8	YEL3	1,12	3	7,81	3	6,32	SG3	6,32		
	246	0,37	280	0,37	239	8,55	358	16,4	187	75,1	283	11,9	353	2,23	237	0,37	278	0,74	371	4,09	YEL4	0,74	4	0,37	4	0,74	SG4	0,74		
	248	4,09	183	15,6	246	0,37	360	70,3	195	9,67	286	4,09	355	0,74	239	15,2	280	15,2	375	17,1	YEL5	8,92		5	0	SG5	0,74			
	250	11,2	291	8,18	255	0,37			197	6,32	292	69,9	361	69,9	241	8,18	282	69,9	377	11,9	YEL6	0,37					SG6	0		
	252	5,2			281	59,5					298	3,72					286	5,2			YEL7	55								
	254	70,3			284	9,29					301	1,12																		
	258	0,37			287	6,69					316	0,37																		
					290	0,74																								
					293	0,37																								
					296	0,37																								
				299	0,74																									



Obrázek P4: Fylogenetický strom znázorňující vnitrodruhovou variabilitu druhu *Arthroderma benhamiae* vytvořený na základě mikrosatelitních dat v programu FAMD (Dieringer & Schlötterer 2003). Kmeny jsou zvýrazněny podle příslušnosti k jednotlivým subpopulacím (MG1-MG4). Barevné kódy: vnitřní kruh - barevně vyznačuje příslušnost kmenů ke genotypu zjištěného sekvenční analýzou ITS rDNA a genu pro *gpdh*; druhý vnitřní kruh - původ kmenů; třetí vnitřní kruh - fenotyp kmenů; čtvrtý vnitřní kruh - příslušnost kmenů k jedné ze dvou idiomorf MAT genu (MAT1-1 nebo MAT1-2), pátý vnitřní kruh – rok izolace, šestý vnitřní kruh – pohlaví pacienta, vnější kruh – izoláty ze zvířat. Strom byl vykreslen v programu iTOL (Letunic & Bork 2007).

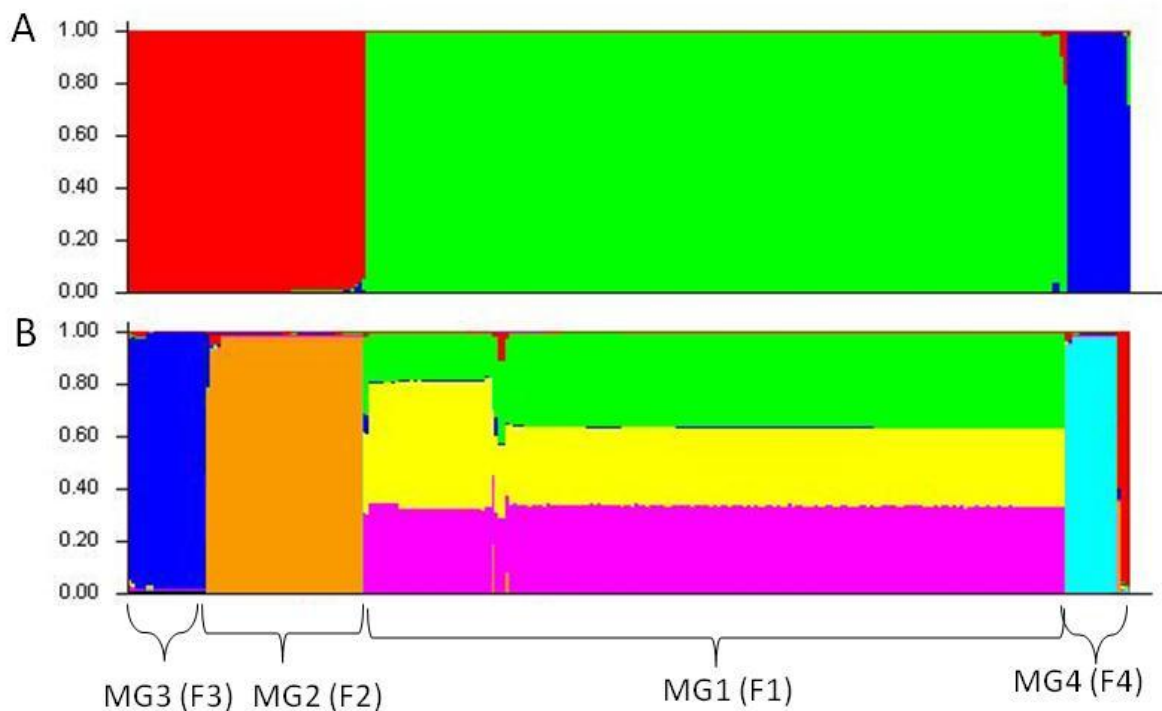
Barevné značení:

Subpopulace

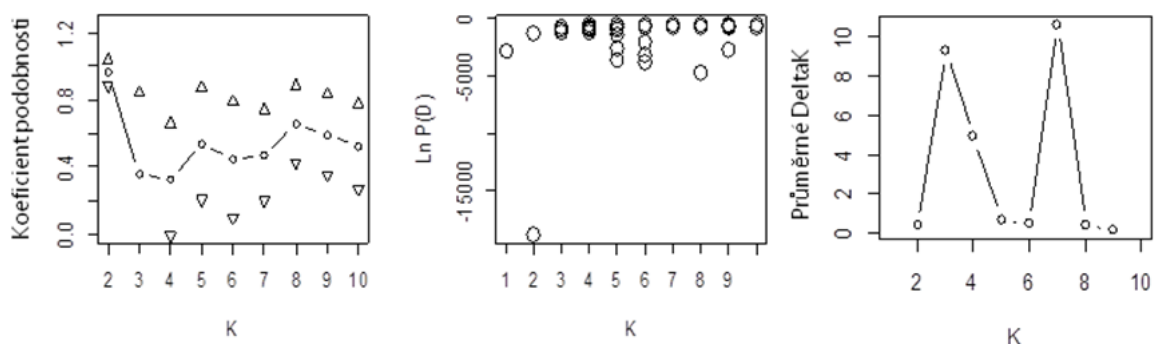
- MG1
- MG4
- MG3
- MG2

Barevné kódy (kruhy):

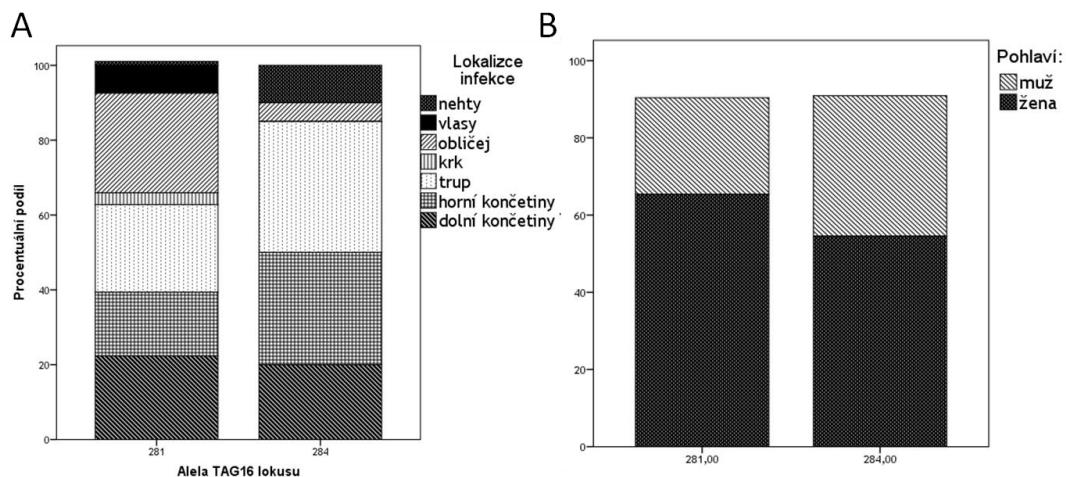
- 7) Zvíře**
 - Pes
 - Morče
- 6) Pohlaví pacienta**
 - Žena
 - Muž
- 5) Rok izolace**
 - od roku 2009
 - 2009 - 1997
 - do roku 1997
- 4) Křížící typ**
 - MAT1-1
 - MAT1-2
- 3) Fenotyp**
 - F1
 - F2
 - F3a / F3b
 - F4a / F4b
- 2) Původ**
 - Česká Republika
 - Evropa
 - Japonsko
 - USA
- 1) Genotyp (sekvenční analýza)**
 - G1
 - G2
 - G3
 - G4
 - G5



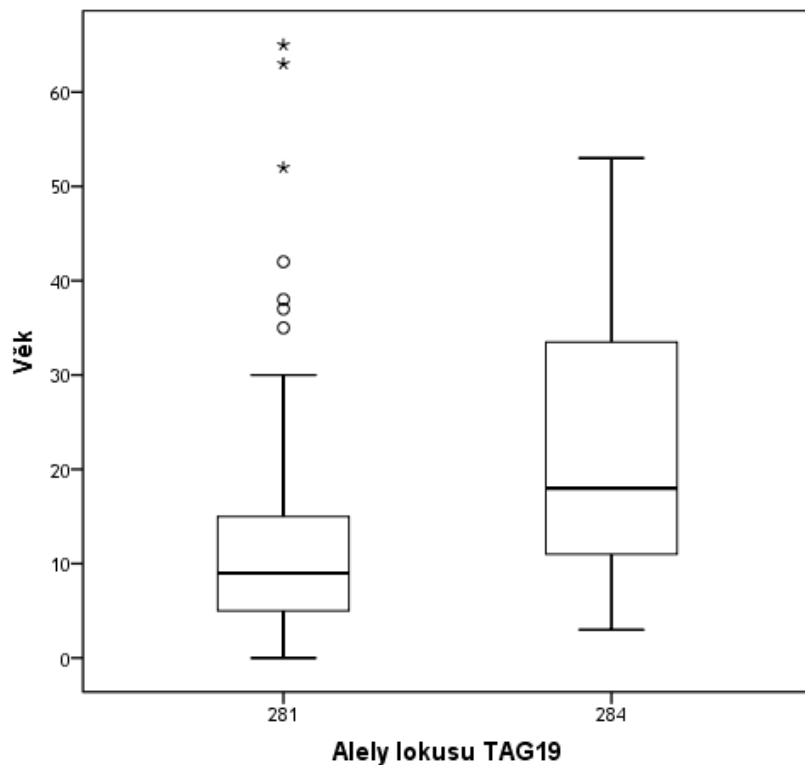
Obrázek P5: Výstup z programu STRUCTURE znázorňující shlukování jedinců do skupin na základě genetické podobnosti mezi jedinci. Shlukování jedinců v případě rozdělení do tří skupin ($K=3$) (A); shlukování jedinců v případě rozdělení do sedmi skupin ($K=7$) (B), příslušnost k jednotlivým fenotypovým skupinám (F1-F4) a příslušným subpopulacím (MG1-MG4) je znázorněna pod grafy.



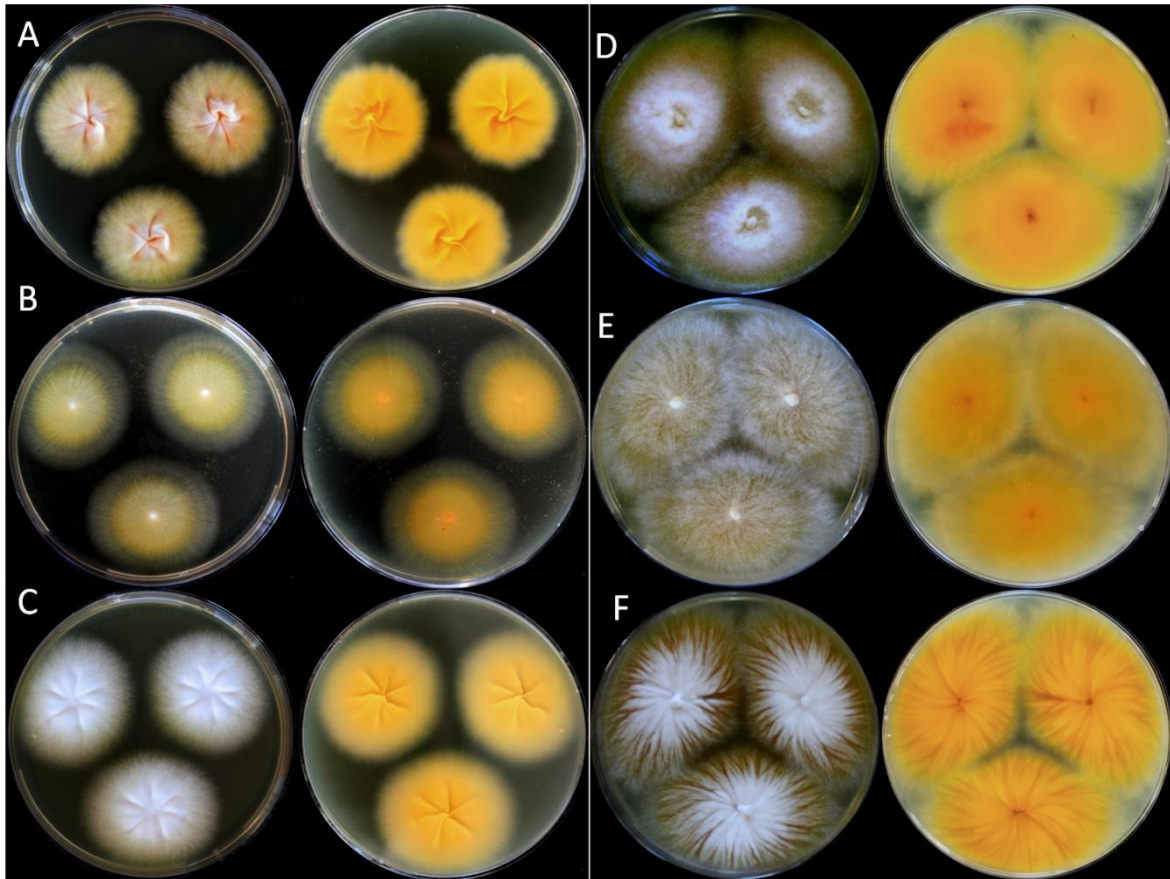
Obrázek P6: Charakteristiky jednotlivých běhů programu Structure ukazující na rozdělení datasetu do optimálního počtu skupin (K). Koeficient podobnosti (A) a logaritmus pravděpodobnosti ($\ln P$) (B) mezi jednotlivými běhy programu pro $K=10$; průměrné ΔK počítané jako průměr absolutních hodnot míry změny mezi dvěma páry běhu programu Structure (C). Charakteristiky byly vypočítané pomocí skriptu Structure-sum-2011.R (Ehrich et al 2007) pro rozdělení do deseti skupin ($K=10$) a 10krát proběhlý algoritmus v programu STRUCTURE.



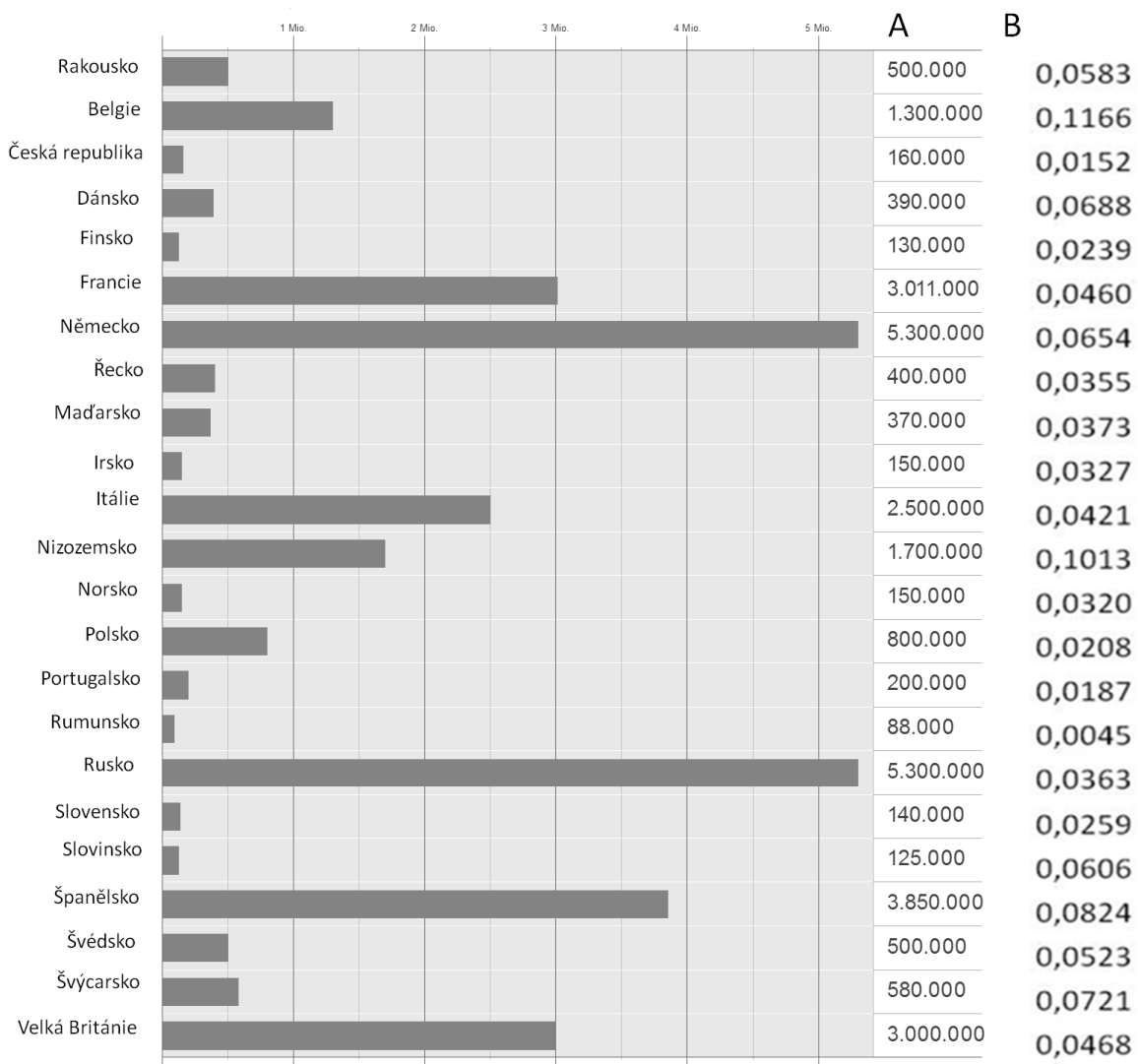
Obrázek P7: Souvislost mezi pohlavím pacienta (a příslušností ke dvěma alelám lokusu TAG16 v rámci mikrosatelitní subpopulace MG1; alela 281 (n=100), alela 284 (n=21). Počty případů v jednotlivých skupinách byly převedeny na procentuální podíl.



Obrázek P8: Souvislost mezi věkem pacienta a příslušností ke dvěma alelám lokusu TAG16 v rámci mikrosatelitní subpopulace MG1; alela 281 (n=100), alela 284 (n=21). Střední horizontální linie značí medián, horizontální linie nad a pod mediánem vymezují interkvartilové rozpětí, vnitřní a vnější hradby jsou definované jako 1,5 interkvartilového rozpětí, kolečka označují odlehlé hodnoty, hvězdičky extrémně odlehlé hodnoty.



Obrázek P9: Makromorfologie fenotypové skupiny F1 druhu *Arthroderma benhamiae* při 25°C po 14 dnech kultivace na MEA (A), SAB (B), PDA (C) a druhu *Microsporium canis* na MEA (D), SAB (E), PDA (F) agaru.



Obrázek P10: Počet morčat chovaných v lidských domácnostech ve 23 evropských státech. Populace byla přepočítána na obyvatele (údaje z roku 2015 Eurostat). Do výzkumu se zapojilo 650 společností prodávající krmiva. Překresleno podle: FEDIAF (The European Pet Food Industry; ke stažení zde: <http://www.fediaf.org/facts-figures/>)

8. PŘÍLOHA 2 – články

Článek 1

Detekce, identifikace a typizace dermatofytů molekulárně genetickými metodami

Čmoková A.¹, Hamal P.², Svobodová L.¹, Hubka, V.^{1,3}

¹ Katedra botaniky, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova v Praze
vedoucí doc. RNDr. Yvonne Němcová, Ph.D.

² Ústav mikrobiologie, Lékařská fakulta Univerzity Palackého v Olomouci
přednosta prof. MUDr. Milan Kolář, Ph.D.

³ Laboratoř genetiky a metabolismu hub, Mikrobiologický ústav, Akademie věd České republiky, v. v. i., Praha
vedoucí Mgr. Miroslav Kolařík, Ph.D.

SOUHRN

V laboratořích klinické mikrobiologie jsou stále častěji využívány molekulárně genetické metody (MGM), a to nejen ke správné identifikaci izolovaného původce onemocnění, ale také k jeho přímé, časné detekci v klinickém materiálu. Také v dermatomykologii MGM vhodně doplňují a někdy dokonce nahrazují klasické, časově a odborně náročné diagnostické postupy, založené zejména na přímé mikroskopii a kultivaci. Výhodou MGM je především vysoká citlivost a rychlost detekce agens, které je možné prokázat v řádu několika hodin až dnů. To může napomoci časnému zahájení cílené léčby, nebo naopak zabránit zbytečnému zatěžování pacienta antimykotiky. MGM určené pro přímou detekci mikromycet nám však i přes značný pokrok stále nezaručují jejich přesnou identifikaci. K tomuto účelu je stále třeba patogen nejprve izolovat, poté je možné využít některých dalších MGM k jeho určení. Cílem tohoto přehledového článku je shrnout možnosti využití MGM pro přímou detekci dermatofytů z klinických vzorků, dále pro identifikaci druhů a typizaci kmenů.

Klíčová slova: molekulárně genetické metody – dermatofyty – dermatomykózy – detekce – identifikace – typizace

SUMMARY

Detection, Identification and Typization of Dermatophytes by Molecular Genetic Methods

The molecular genetic methods (MGM) are used frequently in clinical microbiology to identify the agent of infection and also to its early direct detection in clinical specimens. In dermatomycology MGM supply or even substitute the classic time consuming and sophisticated diagnostic methods based on direct microscopy and cultivation. The high sensitivity and rapid agent detection available in few hours or days is an advantage of MGM that enables to start the early targeted therapy or to avoid an unnecessary antifungal treatment. However MGM designated to direct micromycetes detection does not guarantee their precise diagnostics which still requires the pathogen isolation before MGM are used to its identification. Article reviews the possibilities of MGM use in direct dermatophytes detection from clinical specimens and in species and strains identification.

Key words: molecular genetic methods – dermatophytes – mycosis – detection – identification – typization

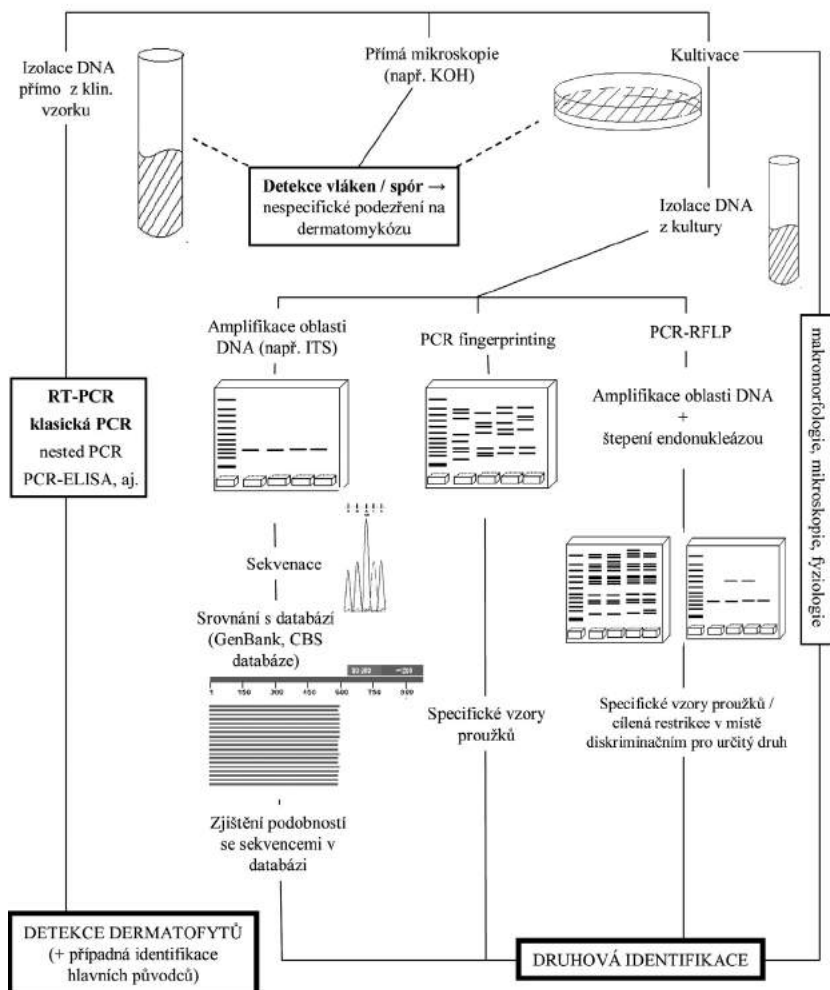
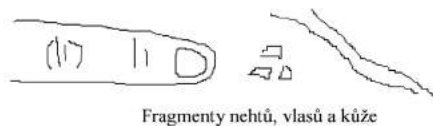
Čes-slov Derm, 89, 2014, No. 4, p. 175–186

ÚVOD

Klasická diagnostika dermatofytóz většinou zahrnuje zhodnocení klinických projevů onemocnění, dále mikroskopické a kultivační vyšetření odebraných vzorků. Přímá mikroskopie je poměrně citlivá, obvykle však není možné tímto způsobem houby identifikovat. Kultivace bývá zase poměrně málo úspěšná, zejména v případech onychomykóz, navíc je třeba původce inkubovat na půdách až několik týdnů. Dobře známá morfologická variabilita dermatofytů komplikuje používání klasických metod identifikace, tj. hodnocení vzhledu kultury a mycelia s reprodukčními strukturami. Také doplňkové fyziologické či biochemické

testy (růst na speciálních médiích, produkce ureázy, perforace vlasu, aj.) nemívají stabilní výsledky a nejsou ani druhově specifické. Stále většího významu proto i v oblasti dermatomykologické diagnostiky nabývají molekulárně genetické metody (MGM) [15].

MGM užívané k přímému průkazu a identifikaci dermatofytů prodělaly v posledních letech rychlý vývoj, a tak již do značné míry mohou pomoci řešit některé nedostatky klasické diagnostiky [43]. Při detekci houbového patogenu přímo v klinickém vzorku dovedou výrazně zkrátit interval mezi odběrem a stanovením diagnózy, bohužel zpravidla neumožňují jeho přesnou identifikaci. K tomuto účelu musí být zvolen metodický postup umožňující v dodaném materiálu odhalit i velmi



Obr. 1. Schéma znázorňující začlenění molekulárních metod do detekce a identifikace dermatofytů

malé množství DNA mikromycety, ale nereagující na možnou přítomnost nukleových kyselin z jiných mikroorganismů. Naopak v případě využití MGM k přesnému druhovému určení izolátu bývá k dispozici prakticky neomezené množství DNA z kultury, a je proto třeba zvolit techniku zajišťující co nejpřesnější identifikaci izolátů. Vnitrodruhová typizace izolátů, metodicky založená na podobných principech, má důležitou úlohu v epidemiologii mykotických infekcí, neboť umožňuje odhalit zdroj nákazy a sledovat proces jejího šíření v populaci [21]. Role MGM v rámci současného pojetí diagnostiky dermatofytóz je přehledně demonstrována na obrázku 1. Podobně jako v jiných oborech mikrobiologie se i v rámci molekulární diagnostiky dermatomykóz používá pro určování klinických izolátů stále častěji ekonomicky výhodná a technicky jednoduchá hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF [72]. I zde však MGM hrají důležitou roli, neboť databáze druhů hub by se měla opírat o spektra získaná z mikromycet identifikovaných analýzou genomu, navíc by zařazené kmeny měly mít i dostatečnou vnitrodruhovou diverzitu.

Při využívání MGM v diagnostické praxi je třeba zvolit optimální postup izolace DNA, dále vybrat odpovídající parametry PCR a konečně se rozhodnout pro nejvhodnější metodu k průkazu houbové DNA v klinickém vzorku, respektive k identifikaci nebo typizaci izolátu. A právě na uvedenou problematiku je zaměřen následující přehledový článek.

IZOLACE DNA

V případě detekce dermatofytů přímo v klinických vzorcích (zejména z kožních šupin, vlasů či nehtů) závisí výtěžnost a čistota DNA především na kvantitě a kvalitě odebraného materiálu. Množství DNA infekčního agens ve vzorku je totiž značně omezené, další komplikací bývá kontaminace genetickým materiálem pocházejícím z vláknitých hub přítomných v prostředí nebo z kvasinek kolonizujících kůži.

Při izolaci houbové DNA je nejprve třeba efektivně rozrušit buněčnou stěnu, dále lyzovat cytoplazmu a jadernou

membránu, precipitovat proteiny a zbavit DNA řady inhibitorů, které mohou snižovat účinnost následně prováděné polymerázové řetězové reakce (PCR). Jednotlivé kroky lze provádět pomocí chemikálií známými metodickými postupy, nebo lze využít komerční soupravy, které mohou izolaci usnadnit. V takovém případě však může být problémem optimalizace metodického postupu, neboť některé chemikálie v diagnostických kitech bývají předmětem firemního tajemství.

Rozrušení buněčných stěn může být dosaženo manuální homogenizací zmrazeného vzorku ve třecí misce s tekutým dusíkem [25, 87], vortexováním se skleněnými nebo silikátovými kuličkami [19, 81], nebo opakovaným zmrazováním [60]. Lýza membrán je zajištěna detergenty (např. Triton X-100, laurylsíran sodný) s následným uvolněním nukleových kyselin do pufovaného roztoku. Ten dále obsahuje chelátory, nejčastěji etylendiaminotetraoctovou kyselinu (EDTA), které vychytávají kationty vápníku, sloužící jako kofaktor nukleáz, čímž je zabráněno štěpení uvolněné DNA. Pro zvýšení čistoty nukleové kyseliny se někdy k lyzačnímu roztoku přidává proteináza K, která štěpí bílkoviny včetně histonů vázaných na DNA.

Z metodického hlediska je současným trendem ústup od tradiční, ale toxické fenol-chloroformové metody a redukce počtu kroků izolace DNA na minimum. Často používaným postupem je inkubace s proteinázou K přes noc a následně dokončení izolace komerční soupravou, nebo tzv. automatickým izolátorem [3, 6, 9, 91]. Patentovaná metoda izolace DNA z klinických vzorků ve dvou krocích, trvající 15 minut, se stala součástí produktu Dermatophyte PCR Kit (SSI Diagnostica, Hillerød, Dánsko) [13, 56]. Ke stejnému účelu byly dále použity soupravy Genomic Prep Cells and Tissue DNA Isolation kit (Amersham Biosciences; Piscataway, USA) [49], Genomic DNA Purification kit (Gentra Systems; Minneapolis, USA) [14] a QIAamp DNA Minikit (Qiagen, Hilden, Německo) [6, 65]. Automatické izolátory DNA jsou přístroje, které byly vyvinuty tak, aby minimalizovaly manipulaci se vzorky a proces od určitého kroku automatizovaly. V diagnostice dermatofytóz byly použity např. FastPrep FP120 Instrument (Thermo Savant, Boston, USA) [16], MagNA Pure Compact Nucleic Acid Extraction Instrument (Roche, Indianapolis, USA) [7], Biorobot EZ1 (Qiagen, Hilden, Německo), nebo QIASymphony (Qiagen) [3].

V případě identifikace a typizace houbových izolátů MGM probíhá úvodní kultivace nejčastěji na Sabouraudově agaru (SAB) s přidavkem chloramfenikolu a cykloheximidu. Hlavním požadavkem je čistota a stáří kultury (ideálně do 14 dnů). Izolaci DNA lze provádět podle známých protokolů [26, 27, 62], existuje však i velké množství komerčních souprav. K tomuto účelu byly úspěšně použity např. Fast DNA kit (Bio101; Lajolla, USA) [16], ArchivePure DNA Yeast + Gram+ kit (5PRIME; GaitHERSBURG, USA) [39, 40], nebo Microbial DNA Isolation Kit (Mo-Bio Laboratories; Carlsbad, USA). Pomocí posledních dvou jmenovaných produktů je izolována DNA z dermatofytů, ale i jiných vláknitých hub také na našem pracovišti [38, 37].

Výhledově se předpokládá, že budou vypracovány doporučené standardizované postupy pro izolaci DNA dermatofytů z kultur i klinických vzorků, což je nutné pro sjednocení a porovnávání metod.

METODY DETEKCE A IDENTIFIKACE DERMATOFYTŮ

Přímý průkaz DNA v klinických vzorcích

Tato skupina metod je založená vesměs na principu PCR a při vhodné optimalizaci může být využita i ke druhové identifikaci dermatofytů. Výhodou je zejména vysoká citlivost (tab. 1) a rychlost detekce [7, 65], která se podle zvoleného postupu pohybuje od několika hodin po 2–3 dny.

K průkazu DNA kožních houbových patogenů a odlišení od DNA jiných eukaryot a prokaryot bylo navrženo několik sad specifických primerů, které jsou cílené na různé oblasti DNA. Metody, které dovolují pouze detekci dermatofytů bez další specifikace (pan-dermatophyte PCR), jsou zaměřeny na konzervativní úseky DNA, jako je např. gen pro chitin syntázu 1 (CHS1) [48]. Většina dnes používaných metod, které si dávají za úkol nejen dermatofyty detekovat, ale i identifikovat hlavní druhy, jsou zacíleny na oblast ribozomální DNA (obsahuje oblasti 18S, ITS1, 5,8S, ITS2 a 28S), zejména na ITS oblast, která poskytuje dostatečné rozlišení mezi druhy dermatofytů. Výjimkami jsou metody užívající jako marker gen pro topoizomerázu II (TOP II) [6] nebo oblast mikrosatelitu [10]. Jde obvykle o úseky DNA, které jsou přítomné v genomu v mnoha kopiích a k úspěšné detekci je tedy potřeba menší množství izolované DNA, čímž se zvyšuje citlivost.

Metody detekce v klinických vzorcích jsou v současnosti omezeny buď pouze na průkaz dermatofytů jako skupiny bez dalšího určení, nebo dovolují identifikaci pouze nejběžnějších druhů. Dají se použít i v mnohanásobném uspořádání (multiplex), kdy je v jediné reakci přítomno několik sad primerů. Takové uspořádání umožní zvýšit specifitu reakce, nebo dovoluje identifikovat několik druhů dermatofytů za použití jediné reakce. Zajímavá je v tomto směru kombinace metody nested PCR se sekvenováním [88], která může zajistit velmi přesnou identifikaci na úrovni druhu. Sekvenování přímo navazující na PCR reakci provedenou v materiálu z klinického vzorku totiž většinou není možné, protože namnožený produkt, s výjimkou nested PCR, nebývá v dostatečné koncentraci [88]. Riziko laboratorní kontaminace sporami dermatofytů je velmi nízké v porovnání např. s rody *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium* či *Alternaria*.

Výhodou **konvenční (klasické) PCR** je jednoduchost provedení a nízká cena i ve srovnání s běžnými kultivačními metodami [33]. Nevýhodou oproti RT-PCR je nutnost nanést produkty před vyhodnocením na gelovou elektroforézu. Metody založené na klasické PCR detekují nejčastěji všechny 3 rody dermatofytů jako celek bez přesnějšího určení, nebo nabízejí multiplex uspořádání s dourčením hlavních druhů. Součástí je téměř vždy dvojice primerů pro účely detekce všech druhů dermatofytů bez

Tabulka 1. Ukazatele diagnostické síly vybraných metod používaných k detekci (někdy též hrubé identifikaci) dermatofytů v klinických vzorcích

Metoda detekce	Materiál	Počet vzorků	Specifická (%)	Specifická (%)	PPV (%)*	NPV (%)*	Zdroj
Kultivace agens	nehty, kůže, vlasy	202	97	77	96	82	Bergman et al. [7],
Kultivace agens	nehty	104	100	64	100	79	Li et al. [58]
Konvenční PCR, duplex; Dermatophyte-PCR kit (detekce všech dermatofytů + identifikace <i>T. rubrum</i>)	nehty	177	94	85	93	87	Kondori et al. [56]
Konvenční PCR, duplex; Dermatophyte-PCR kit (detekce všech dermatofytů + identifikace <i>T. rubrum</i>)	kůže, vlasy	191	84	83	71	94	Kondori et al. [57]
Konvenční PCR, multiplex (identifikace 5 druhů dermatofytů, detekce rodu <i>Trichophyton</i> bez dourčení, identifikace několika druhů a rodů nedermatofytických hub)	nehty, kůže	253	64	80	50	87	Mehlig et al. [65]
Přímá mikroskopie + kultivace + multiplex PCR	nehty, kůže	253	94	87	87	94	Mehlig et al. [65]
RT-PCR, pan-dermatophyte (detekce všech dermatofytů bez identifikace)	nehty, kůže, vlasy	202	99	92	99	93	Bergman et al. [7]
RT-PCR, dvě zkumavky (detekce všech dermatofytů + duplex k identifikaci <i>T. rubrum</i> a <i>T. interdigitale</i>)	nehty, kůže, vlasy	202	97	100	97	100	Bergman et al. [7]
RT-PCR, triplex (detekce dermatofytů, kvasinek a nedermatofytických hub bez identifikace)	nehty	104	100	93	100	95	Li et al. [58]
RT-PCR, multiplex ve dvou zkumavkách (detekce všech dermatofytů + 4 druhy <i>Trichophyton</i> + <i>Microsporum</i> na úrovni rodu)	nehty, kůže, vlasy	697	66	97	55	99	Wisselink et al. [91]

*PPV – pozitivní prediktivní hodnota; NPV – negativní prediktivní hodnota

identifikace [11–13, 55, 56, 59]. Vyhodnocení probíhá na základě přítomnosti produktu na elektroforetogramu. Multiplex uspořádání u těchto metod většinou přináší možnost přímo určit, že původcem dermatofytózy je *Trichophyton rubrum* [12, 13, 56], případně jiné druhy [11]. Odlišně navržené metody dokáží specificky identifikovat např. *T. rubrum*/*T. violaceum*, ale bez detekce ostatních dermatofytů [10]. Metoda publikovaná kolektivem Kim et al. [55] dovoluje detekci všech dermatofytů a identifikaci na úrovni rodu. Metoda autorů Li et al. [58] je schopná detekovat dermatofyty jako celek a v dalších dvou samostatných reakcích skupinu kvasinek a jakoukoliv houbu. Nejkomplexnější v tomto ohledu je komerční souprava

Mentype Mycoderm PCR Amplification kit (Biotype Diagnostic GmbH, Moritzburger, Německo), která je schopná identifikovat ve dvou oddělených PCR *T. rubrum*, *T. interdigitale*, *Microsporum canis*, *M. gypseum* a *Epidermophyton floccosum*, dále ještě rod *Trichophyton* jako celek a několik důležitých nedermatofytických hub [65].

Nested PCR pracuje se systémem tzv. vnějších a vnitřních primerů. V prvním kole PCR, kdy se množí delší fragment DNA, je použita dvojice vnějších primerů. V této fázi mohou vznikat nespecifické produkty. Ve druhém kole se množí kratší fragment uvnitř amplikonu z první PCR pomocí vnitřních primerů. Pokud se v prvním kole amplifikovalo více nespecifických produktů, je pravděpo-

dobné, že při druhé PCR bude specificky namnožen jen jediný produkt odpovídající oblasti uvnitř ampliconu z prvního kola. Podle nastavení metody se může jednat o detekci dermatofytů bez detailnějšího určení (vzorky z nehtů, CHS1, Litz et al. [60]; vzorky z nehtů, CHS1, Garg et al. [24]; kůže a vlasy, velká podjednotka genu pro ribozomální RNA = LSU rDNA, Verrier et al. [88]), nebo se dá produkt první reakce použít pro jednu, či více následných PCR specifických jen pro určitý druh (parafinový řez, vnitřní přepisovaný mezerník genu pro ribozomální RNA = ITS rDNA, detekce *T. rubrum*, Nagao et al. [71]). V mnohanásobném (multiplex) uspořádání je při druhé PCR do směsi přidáno několik sad primerů specifických pro určité druhy. Jsou navrženy tak, aby výsledné amplicony měly pro různé druhy odlišnou délku a identifikace je tak možná na základě velikosti produktu na elektroforetogramu. Amplicon je také možné podrobit sekvenační reakci za použití primerů z druhé reakce. Přesnost identifikace na základě získané sekvence DNA potom závisí na oblasti, která byla namnožena a na délce produktu. Ebihara et al. [19] navrhli postup pro časnou diagnostiku hub působících onychomykózu, v prvním kroku byla nespecificky namnožena oblast LSU rDNA pro jakoukoliv houbu, v druhé následné PCR mohly být použity primery specifické pro všechny dermatofyty, *T. rubrum*, *T. mentagrophytes* a některé nedermatofytické rody hub. Jako **seminested PCR** je označován postup, kdy je při druhé PCR použit jeden z dvojice primerů z prvního kola. Tímto postupem byl detekován *T. rubrum* z nehtů. Metoda byla vyvinuta jak pro aktin, tak pro ITS rDNA [33].

Stále více se dnes v diagnostice dermatofytóz využívá **PCR v reálném čase (RT-PCR)**, většinou opět v multiplex uspořádání, nebo s využitím značených DNA sond, které umožňují současnou detekci několika druhů. Metodicky se v podstatě jedná o klasickou PCR, ale speciální termocykler umožňuje průběžně monitorovat přírůstky DNA během každého cyklu. To je umožněno díky fluorescenčnímu substrátu, který se váže na DNA a intenzita fluorescence pak odráží množství nově syntetizované DNA. Produkty amplifikace téhož genu mají u různých druhů různou sekvenci, a tedy i teplotu tání. Produkty pak můžeme rozlišit pomocí odlišných křivek tání a využít tuto informaci k druhové identifikaci nebo odhalení nespecifických produktů amplifikace.

Výhodou metody je vysoká specifita a citlivost. Identifikace nejčastějších druhů dermatofytů může být provedena během několika hodin [12, 13, 55]. Metoda je výhodná i tím, že celý proces je automatizovaný v jediné uzavřené zkumavce, což minimalizuje rizika kontaminace.

V posledních letech bylo publikováno několik postupů založených na RT-PCR a umožňujících detekci různého počtu druhů dermatofytů. První kvalitní práce z roku 2007 byla zaměřená na oblast ITS a umožňovala rozlišit několik základních druhů pomocí značených sond. Práce posloužila jako základ pro další studie a je z dnešního pohledu již překonaná. Alexander et al. [3] použili detekci *T. rubrum* pomocí RT-PCR jako počáteční krok v diagnostice onychomykózy v kombinaci s klasickou diagnostikou

pomocí přímé mikroskopie a kultivace. Jako neefektivnější postup bylo doporučeno, aby byly kultivovány pouze PCR-negativní a mikroskopicky pozitivní vzorky. Metoda vyvinutá Bergmansem et al. [9] je naopak schopná identifikovat až 11 klinicky významných druhů v jediné multiplex reakci za pomoci systému značených sond a analýzy křivek tání produktů. Žádná z dosud uvedených metod neměla, na rozdíl od následujících, publikovaných autory Wisselink et al. [91], Bergman et al. [7], Miyajima et al. [66], jako svou součást možnost detekce celého druhového spektra dermatofytů, což je zásadní pro průkaz některých málo běžných nebo nepopsaných druhů. Kromě toho jsou všechny tři metodiky schopné identifikovat i několik hlavních druhů dermatofytů; nevýhodou prvních dvou studií [7, 91] je průběh ve dvou oddělených reakcích. Někteří zmínění autoři uvádějí [9, 91], že jejich RT-PCR metoda je schopná zcela nahradit klasické diagnostické metody.

V případě **reverzní hybridizace v návaznosti na PCR (PCR-RLB)** je v prvním kroku provedena PCR s primery nasedajícími na ITS oblast genomu dermatofytů, přičemž je jeden z primerů značený. Produkty amplifikace jsou následně hybridizovány na membráně se specifickými značenými oligonukleotidovými DNA-sondami. Uvedená metoda byla vyvinuta pro detekci a identifikaci devíti nejběžnějších druhů dermatofytů ze vzorků nehtů, kůže a vlasů [8]. Je poměrně pracná, navíc výsledky mohou být obtížně interpretovatelné u vzorků s malým výchozím množstvím DNA. Výsledky je však možné vyhodnotit již následující den po odběru.

Pro detekci a identifikaci pěti druhů dermatofytů (*T. rubrum*, *T. interdigitale*, *T. violaceum*, *M. canis* a *E. floccosum*) byla vyvinuta metoda **PCR-ELISA** [6]. Začíná pěti separátními PCR reakcemi se značenými, druhově specifickými primery. Amplicony poté hybridizují s komplementárními, druhově specifickými sondami značenými biotinem a zacílenými na TOP II. Produkt hybridizace je vizualizován na mikrotitrační destičce pokryté streptavidinem. Tuto metodu využívá komerční kit Onychodiag (Bio Advance, Francie), který umožňuje identifikaci výše zmíněných druhů v klinických vzorcích během 24 hodin. Metoda je údajně až desetkrát citlivější než konvenční PCR. Hlavními nevýhodami jsou pracnost, riziko kontaminace a riziko zkřížené reaktivity sond.

Některé diagnostické **sady mikrodestiček (microarrays)** jsou schopné identifikovat i dermatofyty. Souprava vyvinutá autory Sato et al. [81] je založená na amplifikaci ITS rDNA všech mikromycet a následné hybridizaci produktu s prefabrikovanými specifickými DNA sondami navázanými na destičce. Ta obsahuje celkem 26 druhově specifických sond a 3 rodově specifické, dále políčko cílené na všechny mikromycety a jen na vláknité houby. Mezi nevýhody uvedené metody je nutno uvést možnou detekci kožních komenzálů, případně i zkříženou reaktivitu sond.

Identifikace kultur

Metody pro určování kultur hub je možné podle typu výsledku rozdělit na sekvenační, fingerprintové a jiné (viz obr. 1).

Tabulka 2. Přístupová čísla k sekvencím vybraných genů uložených v databázi GenBank pro běžné druhy dermatofytů

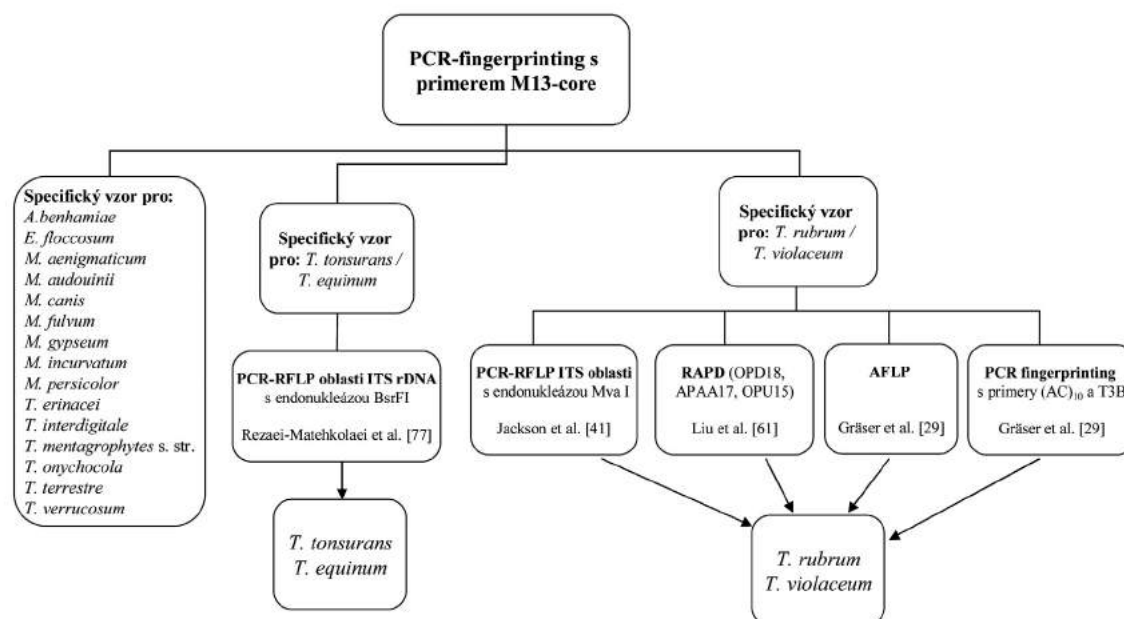
Druh (kmen*)	ITS	benA	Aktin	TOP II	GAPD	CHS1
<i>Epidermophyton floccosum</i> (ATCC 26072, ATCC 52066)	AJ000629	EF631709	EF631625	AB096069	EF631646	AB015039
<i>Microsporum audouinii</i> (CBS 280.63, NBRC 6074)	AJ000622	JF731113	AF150736			
<i>M. canis</i> (CBS 496.86, ATCC 36299, CHUS 14303)	AJ000611	EF631710	EF631626	AB096067	EF631647	AB003563
<i>M. fulvum</i> (CBS 287.55*, VUT-4006, RV 15252, CCF 4684)	AJ000627*	HG518416	AB593406	AB593414	AB003559	
<i>M. gypseum</i> (CBS 258.61*, VUT-4004, ATCC 24102, CBS 118893)	AJ970141*	HG518420*	EF631632	AB110275	XM_003173847	AB003560
<i>M. incurvatum</i> (CBS 174.64*, KMU 2981, VUT-4002)	AJ970153*	HG518422*		AB110274		AB003562
<i>M. persicolor</i> (NBRC 5975, VUT-77160, JCM 1911)	JCM 1911)	JN134144	JF731112		AB110277	AB006983
<i>Trichophyton erinacei</i> (CBS 511.73*, CBS 677.86)	EF078476*	JF731117				
<i>T. interdigitale</i> (CBS 428.63*, CBS 558.66, IHEM 7493)	JX122216*	JQ407161	JQ407116			AB005794
<i>T. mentagrophytes</i> (CBS 318.56*, IHEM 2468, KMU 6067)	Z97995*	JQ407163	JQ407118	AB520839		
<i>T. simii</i> (CBS 417.65*, CBS 150.66, IHEM 4421, KMU 4810)	Z98017*	JQ407139	AB432895	AB430796	AB573033	AB003564
<i>T. tonsurans</i> (CBS 496.48*, NBRC 5928, KMU 4872)	Z98005*	JF731073	AF152231	AB430790	AB573053	AB022279
<i>T. verrucosum</i> (CBS 554.84, KMU 4826, BMU 03357)	Z98002	EF631728	EF631644	AB430805	AB573051	EU363514
<i>T. violaceum</i> (CBS 374.92*, CBS 305.60, BMU 02087, KMU 4128)	JX122372*	EF631729	EF631645	AB430803	AB573043	AB017698
<i>T. rubrum</i> (CBS 735.88, IHEM 13800, KMU 4849)	Z97994	JQ407175	JQ407130	AB520838	AB573052	AB005793
<i>T. terrestre/Arthroderma quadrifidum</i> (CBS 613.78)	AJ877214					
Trichophyton sp. / Arthroderma benhamiae (* = CBS 623.66*, KMU 4771)	Z98015*	JQ407137*	JQ407092*	AB430807	AB573047	AB044155

*ex-typové kmeny a jejich přístupová čísla jsou označena hvězdičkou

Sekvenování cílových genů zajišťuje při správném výběru oblastí naprosto přesnou druhovou identifikaci. Hlavní nevýhodou je stále vyšší časová a finanční náročnost, zejména při zpracování většího počtu vzorků. Přesto podle některých výpočtů [49] není sekvenování např. ITS oblasti rDNA o mnoho dražší, než je druhová identifikace za použití klasických metod. U dermatofytů bývají nejčastěji vybírány úseky ITS1, 5,8S a ITS2 rDNA, které jsou známy pro všechny druhy dermatofytů a poskytují až na výjimky dostatečné rozlišení. Dalšími možnými oblastmi jsou geny pro β -tubulin (benA), aktin (ACT), mangan-dependentní superoxidodismutázu (MnSOD), translační elongační faktor 1- α (TEF1- α) a glycerinaldehyd-3-fosfát dehydrogenázu (GAPD), TOP II a CHS1 [5, 22, 39, 40, 47, 52, 75, 78]. Přístupová čísla k sekvencím, které pocházející z věrohodně určených kmenů běžných druhů dermatofytů a jsou uloženy v databázi GenBank, jsou uvedena v tabulce 2. K rutinnímu určování je obvykle dostačující oblast ITS rDNA [41, 73, 87], sekvence genů kódujících proteiny jsou využívány především ve fylogenetických studiích [5, 52]. ITS je zatím je-

diný sekvenční marker zastoupený pro všechny v současnosti akceptované druhy v databázi GenBank [32]. Nevýhodou databáze je ale velké množství chybně identifikovaných izolátů [32, 85]. Z tohoto důvodu byla vytvořena a je spravovaná databáze sekvencí ITS rDNA dermatofytů, která zahrnuje jen sekvence patřící správně určeným kmenům (<http://www.cls.knaw.nl/dermatofytes>).

Fingerprintové metody jsou rychlé, většinou jednoduché a levné. Jsou vhodné zejména při velkém počtu analyzovaných vzorků. Naopak nevýhodou některých z nich jsou nároky na kvalitu DNA, která nesmí být kontaminována [46, 64]. Aby byly výsledky inter-, ale i intralaboratorně porovnatelné, je nutné u nejcitlivějších metod vždy dodržovat stejnou metodiku izolace DNA a při PCR užívat stejný termocykler a chemikálie od stejných výrobců. Problémem limitujícím využití metod pro fylogenetické účely bývá možná komigrace fragmentů o stejné délce, ale odlišné sekvenci, a tedy nereprezentujících homolonní úseky DNA. Mezi fingerprintové metody použité u dermatofytů patří **náhodná amplifikace polymorfni DNA**



Obr. 2. Schéma identifikace hlavních druhů dermatofytů bez nutnosti sekvence

Úvodní metoda ISSR-PCR s primerem M13-core je schopná rozlišit všechny hlavní původce dermatofytů v ČR na základě charakteristických vzorů (pattern) proužků. Problematické je rozlišení některých blízkých příbuzných druhů: *Trichophyton tonsurans* a *T. equinum* (rozlišitelné restričním štěpením ITS oblasti, nebo sekvenací genů TEF1- α , benA nebo úseku ITS rDNA [77]), dále *T. rubrum* a *T. violaceum* (řada metod – viz schéma, nebo sekvenace ITS rDNA); schopnost metody rozlišit *M. canis* a *M. ferrugineum* nebyla testována – existuje opět možnost druhy rozlišit sekvenací, nebo RFLP-PCR [78]; podobně není známo, zda metoda rozliší *T. mentagrophytes* s. str. od blízkých příbuzných *T. schoenleinii* a *T. simii* (rozlišitelné sekvencí ITS rDNA [5]).

(RAPD), polymorfismus sekvencí mezi dvěma mikrosatelity (ISSR-PCR) a polymorfismus délky amplifikovaných fragmentů (AFLP).

RAPD je charakteristická použitím jednoho, či více krátkých primerů. V PCR je navíc použita nízká teplota pro jejich nasedání, což způsobuje, že primery nemusí nasedat zcela komplementárně na DNA a výsledný fingerprint je pak bohatší. Metoda je velmi citlivá na změny reakčních podmínek. U dermatofytů byla úspěšně použita ke druhové identifikaci [63, 61, 67]. Někdy se od RAPD odděluje principiálně velmi obdobná metoda zvaná náhodná PCR (APPCR) [61], která užívá primery o delší sekvenci.

ISSR-PCR využívá primery v podobě repetitivních sekvencí komplementárních k tzv. mini- a mikrosatelitním lokusům. Primer mívá často i krátkou tzv. kotvící sekvenci, která přesahuje okraj lokusu, čímž se sníží počet mikrosatelitů, na které je primer schopný nasedat, a tedy i počet produktů. Výsledné fingerprinty vykazují často vysokou komplexnost a na rozdíl od RAPD má metoda i vysokou reprodukovatelnost [20]. Využitím mikrosatelitního primeru (GACA)₄ byly rozpoznány běžné druhy dermatofytů [20, 84]. Navíc byl ve studii použit druhý primer (GTG)₅, který úspěšně odlišoval i fylogeneticky velmi blízké druhy *T. interdigitale* („*T. mentagrophytes*“) a *T. tonsurans* [84]. Na našem pracovišti se velmi osvědčila metoda ISSR-PCR s primerem M13-core, který je schopný dobře rozlišit nejdůležitější druhy dermatofytů vyskytující se na našem území (obr. 2) a byl úspěšně použit u zmíněných houbových agens i v minulosti [26].

Metoda **AFLP** byla u dermatofytů použita jen v omezené míře pro taxonomické účely [29, 28]. Ačkoliv je dobře

reprodukovatelný a podává odpovídající představu o polymorfismu srovnávaných organismů na druhové a nižší úrovni, je jeho použití pro identifikaci nepraktické kvůli vyšší časové i finanční náročnosti.

Polymorfismus délky restričních fragmentů (PCR-RFLP) je založen na klasické PCR, kdy je v prvním kroku amplifikován specifickými primery určitý úsek DNA, který je následně štěpen restričními enzymy (endonukleázami). K namnožení DNA se používají podobné oblasti DNA jako při sekvenování, např. úseky ITS nebo NTS rDNA (Non-Transcribed Spacer; nepřepisovaný mezerník) [35, 41, 79], geny TOP II [34, 45] nebo benA [1]. Dnes se metoda častěji používá k rozlišení blízkých příbuzných druhů uvnitř druhových komplexů, které jsou obtížně rozlišitelné jinými MGM [77, 78]. Při určitém zjednodušení je pak postup navržen tak, že je v sekvencích dvou blízkých druhů nalezeno variabilní místo, které u jednoho z nich specificky rozeznává a štěpí určitá endonukleáza. Ta je pak použita ke štěpení amplifikovaného úseku DNA. Na elektroforetogramu se pak u prvního druhu vyskytuje pouze jeden produkt a u druhého dva. Výhodou je, že se tím lze vyhnout ekonomicky náročnějšímu sekvenování, metoda je navíc dobře reprodukovatelná. Podobně finančně výhodné může být při velkém počtu izolátů použití několika restričních endonukleáz na jediný amplifikovaný úsek DNA. Většina kultur může být určena podle specifického fingerprintu po prvním restričním štěpení, zbylé druhy jsou určeny jen do druhových komplexů a mohou být identifikovány štěpením stejného úseku za použití jiné restriktázy [80]. Velmi blízké příbuzné druhy *T. tonsurans* a *T. equinum* nebo druhy *M. canis*, *M. ferrugineum* a *M. au-*

douinii se dají odlišit restrikcí štěpením genů TEF-1 α , benA a oblasti ITS rDNA pomocí různých endonukleáz [77, 78, 80].

RT-PCR je použitelná nejen v detekci dermatofytů, ale i v identifikaci navazující na jejich kultivaci. Taková metodika byla popsána pro 10 druhů dermatofytů, včetně některých vzácně izolovaných [95]. Přínosem studie je především možnost obohatit současné protokoly RT-PCR pro detekci DNA přímo z klinických vzorků o vzácné druhy. Potenciál metody není zatím pro běžné určování druhů velký, protože existuje řada levnějších a jednodušších identifikačních metod, které pokrývají větší množství druhů.

TYPIZACE IZOLÁTŮ

Typizační metody mohou pomoci lépe porozumět epidemiologii, populační biologii a patogenезi dermatofytóz. Jsou využívány při identifikaci endemických kmenů, pátrání po zdroji infekce v rodině, veřejném zařízení, u zvířat, dále také při zjišťování, zda je infekce způsobena jedním, či více kmeny. Je možné rovněž stanovit, které kmeny jsou virulentnější, mají vyšší rezistenci k antimykotikům nebo způsobují specifický klinický obraz infekce. U chronických dermatofytóz může být ověřeno, zda se jedná o recidivu nebo reinfekci. Dále lze získat informaci o distribuci jednotlivých genotypů v populaci, což může odhalit změny v závislosti na převládající léčbě.

Mikrosatelity jsou hypervariabilní DNA sekvence složené z motivů krátkých tandemových repetic, které se v genomech všech doposud studovaných eukaryotických organismů vyskytují s poměrně vysokou frekvencí [59].

Mikrosatelity mají mnohem vyšší mutační rychlost (10^{-2} - 10^{-5} mutací na nukleotidový pár na generaci) oproti frekvenci 10^{-9} , která se uvádí pro bodové mutace v nekódujících oblastech, jako je např. ITS oblast [74]. Tato nestálost vytváří vysokou vnitrodruhovou variabilitu. Mikrosatelity jsou z tohoto důvodu u hub, ale i v jiných říších organismů, používány především v populačních studiích [30]. 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 [30]. Výhodou u skupiny dermatofytů je fakt, že je známý genom několika druhů, což proces hledání mikrosatelitů usnadňuje. Přesto jsou dostupné primery jen k několika variabilním mikrosatelitům u malého počtu klinicky významných druhů (viz tab. 3), těmi jsou *T. rubrum* [31, 74], *M. canis* [82] a *M. persicolor* [83].

Data získaná analýzou mikrosatelitů jsou užitečná nejen pro epidemiologii, ale přináší i cenné informace z hlediska evoluce a biologie druhů. Analýza mikrosatelitů například podpořila status samostatného druhu pro *M. audouinii* a *M. ferrugineum* uvnitř komplexu *M. canis* [50], další druhy a variety byly synonymizovány s těmito třemi druhy. Jiná studie ukázala, že za většinu lidských infekcí způsobených *M. canis* zodpovídá jediný, více virulentní zvířecí genotyp, který se s vyšší úspěšností přenáší na člověka [82]. Populační studie na druhu *T. rubrum* potvrdily jeho nízkou vnitrodruhovou variabilitu a oprávněnost synonymizace řady dříve uznávaných druhů s *T. rubrum*. Jediné druhové jméno, které ve skutečnosti reprezentuje jen jakousi částečně izolovanou a geneticky odlišnou populaci, je *T. soudanense* [31, 74].

Tabulka 3. Mikrosatelitní markery navržené k typizaci dermatofytů

Druh	Repetitivní element	Ta (°C) *	Forward primer (5'-3')	Reverz primer (3'-5')	Zdroj
<i>Trichophyton rubrum</i>	CA15	60	GTAAGGATGGCTAGTTAGGGGG	TGGTCTGGCCTTGACTGACC	Ohst et al. [74]
	T17	56-62	CCCATCGAGGTTCATATACGC	ATTTTGGTTCTTTTTTGAGTG	Gräser et al. [31]
	GA18CA13	56-63	CTCCGTCGGTCCAGATG	CGCTGCTGGTAAGAGATGAC	Gräser et al. [31]
	GA17	56-64	CGTCGCTTGCTTTGGTACAC	TATGGACTTGTTTCGGATGGG	Gräser et al. [31]
	GA18	56-65	GACTCAACGGTTCAGATTAC	CTTATTTGTCGCTTCTCTCG	Gräser et al. [31]
	GA25	56-66	GCGATGGTTGGAGGAGTTG	GCCTGTCGCTGCTTACTTG	Gräser et al. [31]
	CT20	56-67	GCCGTGGCGTCTTCTATC	CAGCAGACAACATAGCAGTCG	Gräser et al. [31]
	<i>Microsporum persicolor</i>	CA23	64	TCGGCCTCCTATCCTTC	TCGGGATGTAAGTGAAAGGG
CT17		58	GGGCAATTCTATGGGCAAG	CTTCTTCCAAGCTCTGCCTG	Sharma et al. [83]
GA27		60	GGCTTGAGTGGCGTCTTC	AGCAAACGAACCGCTGAG	Sharma et al. [83]
<i>Microsporum canis</i>	GT13	60	GATCGGAGCATGCCATACAG	TCTTCCCACCCTTCTCAATG	Sharma et al. [82]
	GT17	60	GCTCTGGGATAAGGTGTTTG	GTAGCAGTAAAGCCAAGAGGG	Sharma et al. [82]
	GT17-1	54	GAAGGAGGTATATATGGGTGTG	GATAAGGTGTTTGGCACTGA	Pasquetti et al. [76]
	GT17-2	54	GGGAACAATCTGCCTTAAAC	CACAGAGATATGCCGTATGC	Pasquetti et al. [76]
	GT17-3	54	AGGTGTTTGGCACTGAGC	CGAAGAGAAGGAGGTATATATGG	Pasquetti et al. [76]
	GT15	54	CAGCATCTAAATAACTGGCCTA	TTTTCTTCTACTTCCCCTTG	Pasquetti et al. [76]
	GT14	54	GGTTTACACGCAGCATGA	CGTGGCTGAAGAAGTCTACC	Pasquetti et al. [76]
	AT15	58	CGTCTGGGACTTGGTAGTAA	TCGGAGGATCTTAAACTGT	Pasquetti et al. [76]
	AC20AT14	56	GCCAAAAGACTTGCTGAG	CGTTAGCATGCATCTCTATAC	Pasquetti et al. [76]
	GT13	65	GATCGGAGCATGCCATACAG	TCTTCCCACCCTTCTCAATG	Pasquetti et al. [76]

*Teplota annealingu

Multilokusová sekvenční typizace (MLST) vykazuje při výběru vhodných genů ve srovnání se sekvenováním jednoho PCR produktu vysokou vnitrodruhovou diskriminační schopnost. Problémem je nutnost velmi kvalitních sekvencí (sekvenční chyby vytváří falešnou variabilitu) a vysoká finanční náročnost. Na druhou stranu tkví velká výhoda MLST v možnosti dobrého sdílení výsledků mezi laboratořemi a možnost využít a revidovat data kdykoliv v budoucnu. V rámci skupiny dermatofytů MLST schéma zatím pro populační studie využito nebylo. Z dosud publikovaných molekulárních dat je patrné, že sekvenované lokusy (ACT, TOP II, benA, ITS rDNA a GPD) mají poměrně nízkou diskriminační sílu pro klonální druhy jako *T. rubrum* a *T. verrucosum*, ale naopak rozlišily řadu haplotypů uvnitř druhu *Arthroderma benhamiae* [5, 52, 51]. Využití metody jako možné typizační techniky u dermatofytů tedy nic nebrání a patří jí spolu s mikrosatelity budoucnost v typizaci dermatofytů.

Fingerprintové metody typu **RAPD** dokážou s různou mírou úspěšnosti odlišit kmeny některých druhů [26, 61, 96]. Nízká reprodukovatelnost výsledků a nezhřídka i nedostatečná variabilita odsouvají do značné míry tyto metody ze zájmu populačních studií u hub, kde se prosazuje především analýza mikrosatelitů. V případě dermatofytů ale metoda RAPD zůstává nejběžnější metodou typizace kmenů a stále vzniká řada typizačních schémat na ní založených. Metoda byla s různou mírou úspěchu (žádné vnitrodruhové rozlišení až po rozlišení téměř všech zkoumaných izolátů) aplikována na řadu druhů. Nejčastějším cílem typizace jsou kmeny *T. rubrum* [4, 35, 36, 92, 93], dále pak *T. interdigitale* [44, 54], *M. canis* [18, 84, 94] a *E. floccosum* [53]. Dobré rozlišení izolátů *T. rubrum* nabízí metodika polských autorů [36], která kombinovala dva primery a úspěšně rozlišila 47 různých genotypů mezi 55 izoláty. U *T. interdigitale* („*T. mentagrophytes*“ podle starších identifikačních schémat) se pomocí RAPD daří například odlišit lidské izoláty působící převážně onychomykózu a tinea pedis od původem zvířecích izolátů, které u člověka působí hlavně tinea corporis [54].

PCR-RFLP až na výjimky nepředstavuje nástroj příliš vhodný k posouzení vnitrodruhové variability. Výjimkou je NTS oblast rDNA, která se u dermatofytů ukázala jako velmi variabilní, a proto je používána i v diskriminaci jednotlivých izolátů u druhů *T. rubrum* [17, 92], *T. interdigitale* [69, 89], *A. benhamiae* [68, 86] a *T. tonsurans* [2, 23, 70]. Izoláty jinak geneticky homogenního druhu *T. rubrum* je také možné rozlišit na základě počtu kopií dvou tandemově se opakujících prvků označovaných jako TRS-1 a TRS-2 (Tandemly Repetitive Subelements) [42]. Hlavní předností RAPD a PCR-RFLP je jednoduchost a nízká finanční náročnost ve srovnání s analýzou mikrosatelitů a MLST, které ale dávají lépe interpretovatelné výsledky.

LITERATURA

1. ABASTABAR, M., MIRHENDI, H., REZAEI-MATEHKOLAEI, A., et al. Restriction analysis of β -tubulin gene for differen-

tiation of the common pathogenic dermatophytes. *J. Clin. Lab. Anal.*, 2014, 28, p. 91–96.

2. ABDEL-RAHMAN, S. M., SUGITA, T., GONZÁLEZ, G. M., et al. Divergence among an international population of *Trichophyton tonsurans* isolates. *Mycopathologia*, 2010, 169, p. 1–13.

3. ALEXANDER, C., SHANKLAND, G., CARMAN, W., WILLIAMS, C. Introduction of a dermatophyte polymerase chain reaction assay to the diagnostic mycology service in Scotland. *Brit. J. Dermatol.*, 2011, 164, p. 966–972.

4. BAEZA, L. C., MATSUMOTO, M. T., ALMEIDA, A. M. F., MENDES-GIANNINI, M. J. S. Strain differentiation of *Trichophyton rubrum* by randomly amplified polymorphic DNA and analysis of rDNA nontranscribed spacer. *J. Med. Microbiol.*, 2006, 55, p. 429–436.

5. BEGUIN, H., PYCK, N., HENDRICKX, M., et al. The taxonomic status of *Trichophyton quinckeanum* and *T. interdigitale* revisited: a multigene phylogenetic approach. *Med. Mycol.*, 2012, 50, p. 871–882.

6. BEIFUSS, B., BEZOLD, G., GOTTLÖBER, P., et al. Direct detection of five common dermatophyte species in clinical samples using a rapid and sensitive 24-h PCR-ELISA technique open to protocol transfer. *Mycoses*, 2011, 54, p. 137–145.

7. BERGMAN, A., HEIMER, D., KONDORI, N., ENROTH, H. Fast and specific dermatophyte detection by automated DNA extraction and real-time PCR. *Clin. Microbiol. Infect.*, 2013, 19, p. E205–E211.

8. BERGMANS, A., SCHOOLS, L., VAN DER ENT, M., et al. Validation of PCR–reverse line blot, a method for rapid detection and identification of nine dermatophyte species in nail, skin and hair samples. *Clin. Microbiol. Infect.*, 2008, 14, p. 778–788.

9. BERGMANS, A., VAN DER ENT, M., KLAASSEN, A., et al. Evaluation of a single-tube real-time PCR for detection and identification of 11 dermatophyte species in clinical material. *Clin. Microbiol. Infect.*, 2010, 16, p. 704–710.

10. BRASCH, J., BECK – JENDROSCHEK, V., GLÄSER, R. Fast and sensitive detection of *Trichophyton rubrum* in superficial tinea and onychomycosis by use of a direct polymerase chain reaction assay. *Mycoses*, 2011, 54, p. e313–e317.

11. BRILLOWSKA-DAABROWSKA, A., SWIERKOWSKA, A., LINDHARDT SAUNTE, D. M., ARENDRUP, M. C. Diagnostic PCR tests for *Microsporum audouinii*, *M. canis* and *Trichophyton* infections. *Med. Mycol.*, 2010, 48, p. 486–490.

12. BRILLOWSKA-DABROWSKA, A., NIELSEN, S. S., NIELSEN, H. V., ARENDRUP, M. C. Optimized 5-hour multiplex PCR test for the detection of tinea unguium: performance in a routine PCR laboratory. *Med. Mycol.*, 2010, 48, p. 828–831.

13. BRILLOWSKA-DABROWSKA, A., SAUNTE, D. M., ARENDRUP, M. C. Five-hour diagnosis of dermatophyte nail infections with specific detection of *Trichophyton rubrum*. *J. Clin. Microbiol.*, 2007, 45, p. 1200–1204.

14. CAFARCHIA, C., GASSER, R. B., FIGUEREDO, L. A., et al. An improved molecular diagnostic assay for canine and feline dermatophytosis. *Med. Mycol.*, 2013, 51, p. 136–143.

15. CAFARCHIA, C., IATTA, R., LATROFA, M. S., GRÄSER, Y., OTRANTO, D. Molecular epidemiology, phylogeny and evolution of dermatophytes. *Infect. Genet. Evol.*, 2013, 20, p. 336–351.

16. CANO, J., REZUSTA, A., SOLE, M., et al. Inter-single-se-

- quence-repeat-PCR typing as a new tool for identification of *Microsporium canis* strains. *J. Dermatol. Sci.*, 2005, 39, p. 17–21.
17. DE ASSIS SANTOS, D., DE CARVALHO ARAUJO, R. A., KOHLER, L. M., et al. Molecular typing and antifungal susceptibility of *Trichophyton rubrum* isolates from patients with onychomycosis pre- and post-treatment. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 2007, 29, p. 563–569.
 18. DOBROWOLSKA, A., DEBSKA, J., KOZŁOWSKA, M., STĄCZEK, P. Strains differentiation of *Microsporium canis* by RAPD analysis using (GACA)₄ and (ACA)₅ primers. *Pol. J. Microbiol.*, 2011, 60, p. 145–148.
 19. EBIHARA, M., MAKIMURA, K., SATO, K., ABE, S., TSUBOI, R. Molecular detection of dermatophytes and nondermatophytes in onychomycosis by nested polymerase chain reaction based on 28S ribosomal RNA gene sequences. *Brit. J. Dermatol.*, 2009, 161, p. 1038–1044.
 20. FAGGI, E., PINI, G., CAMPISI, E., et al. Application of PCR to distinguish common species of dermatophytes. *J. Clin. Microbiol.*, 2001, 39, p. 3382–3385.
 21. FARI, E., GRÄSER, Y. An epidemic of tinea corporis caused by *Trichophyton tonsurans* among children (wrestlers) in Germany. *Mycoses*, 2000, 43, p. 191–196.
 22. FRÉALLE, E., RODRIGUE, M., GANTOIS, N., et al. Phylogenetic analysis of *Trichophyton mentagrophytes* human and animal isolates based on MnSOD and ITS sequence comparison. *Microbiology*, 2007, 153, p. 3466–3477.
 23. GAEDIGK, A., GAEDIGK, R., ABDEL-RAHMAN, S. M. Genetic heterogeneity in the rRNA gene locus of *Trichophyton tonsurans*. *J. Clin. Microbiol.*, 2003, 41, p. 5478–5487.
 24. GARG, J., TILAK, R., SINGH, S., et al. Evaluation of pan-dermatophyte nested PCR in diagnosis of onychomycosis. *J. Clin. Microbiol.*, 2007, 45, p. 3443–3445.
 25. GARG, J., TILAK, R., GARG, A., et al. Rapid detection of dermatophytes from skin and hair. *BMC Res. Notes*, 2009, 2, p. 60.
 26. GRÄSER, Y., EL FARI, M., PRESBER, W., STERRY, W., TIETZ, H. J. Identification of common dermatophytes (*Trichophyton*, *Microsporium*, *Epidermophyton*) using polymerase chain reactions. *Brit. J. Dermatol.*, 1998, 138, p. 576–582.
 27. GRÄSER, Y., EL FARI, M., VILGALYS, R., et al. Phylogeny and taxonomy of the family Arthrodermataceae (dermatophytes) using sequence analysis of the ribosomal ITS region. *Med. Mycol.*, 1999, 37, p. 105–114.
 28. GRÄSER, Y., KUIJPERS, A. F. A., PRESBER, W., DE HOOG, G. S. Molecular taxonomy of *Trichophyton mentagrophytes* and *T. tonsurans*. *Med. Mycol.*, 1999, 37, p. 315–330.
 29. GRÄSER, Y., KUIJPERS, A. F. A., PRESBER, W., DE HOOG, G. S. Molecular taxonomy of the *Trichophyton rubrum* complex. *J. Clin. Microbiol.*, 2000, 38, p. 3329–3336.
 30. GRÄSER, Y., DE HOOG, S., SUMMERBELL, R. Dermatophytes: recognizing species of clonal fungi. *Med. Mycol.*, 2006, 44, p. 199–209.
 31. GRÄSER, Y., FRÖHLICH, J., PRESBER, W., DE HOOG, S. Microsatellite markers reveal geographic population differentiation in *Trichophyton rubrum*. *J. Med. Microbiol.*, 2007, 56, p. 1058–1065.
 32. GRÄSER, Y., SCOTT, J., SUMMERBELL, R. The new species concept in dermatophytes – a polyphasic approach. *Mycopathologia*, 2008, 166, p. 239–256.
 33. GUPTA, A., ZAMAN, M., SINGH, J. Fast and sensitive detection of *Trichophyton rubrum* DNA from the nail samples of patients with onychomycosis by a double-round polymerase chain reaction – based assay. *Brit. J. Dermatol.*, 2007, 157, p. 698–703.
 34. GUTZMER, R., MOMMERT, S., KÜTTLER, U., WERFEL, T., KAPP, A. Rapid identification and differentiation of fungal DNA in dermatological specimens by Light Cycler PCR. *J. Med. Microbiol.*, 2004, 53, p. 1207–1214.
 35. HRYNCEWICZ-GWOZDZ, A., JAGIELSKI, T., DOBROWOLSKA, A., SZEPIETOWSKI, J. C., BARAN, E. Identification and differentiation of *Trichophyton rubrum* clinical isolates using PCR-RFLP and RAPD methods. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 2011, 30, p. 727–731.
 36. HRYNCEWICZ-GWOZDZ, A., JAGIELSKI, T., SADAKIERSKA-CHUDY, A., et al. Molecular typing of *Trichophyton rubrum* clinical isolates from Poland. *Mycoses*, 2011, 54, p. e726–736.
 37. HUBKA, V., KUBATOVA, A., MALLATOVA, N., et al. Rare and new aetiological agents revealed among 178 clinical *Aspergillus* strains obtained from Czech patients and characterised by molecular sequencing. *Med. Mycol.*, 2012, 50, p. 601–610.
 38. HUBKA, V., KOLAŘÍK, M., KUBÁTOVÁ, A., PETERSON, S. W. Taxonomical revision of the genus *Eurotium* and transfer of species to *Aspergillus*. *Mycologia*, 2013, 105, p. 912–937.
 39. HUBKA, V., CMOKOVA, A., SKOREPOVA, M., MIKULA, P., KOLARIK, M. *Trichophyton onychocola* sp. nov. isolated from human nail. *Med. Mycol.*, 2014, 52, p. 285–292.
 40. HUBKA, V., DOBIASOVA, S., DOBIAS, R., KOLARIK, M. *Microsporium aenigmaticum* sp. nov. from *M. gypseum* complex, isolated as a cause of tinea corporis. *Med. Mycol.*, 2014, 52, p. 387–396.
 41. JACKSON, C. J., BARTON, R. C., EVANS, E. G. V. Species identification and strain differentiation of dermatophyte fungi by analysis of ribosomal-DNA intergenic spacer regions. *J. Clin. Microbiol.*, 1999, 37, p. 931–936.
 42. JACKSON, C. J., BARTON, R. C., KELLY, S. L., EVANS, E. G. V. Strain identification of *Trichophyton rubrum* by specific amplification of subrepeat elements in the ribosomal DNA nontranscribed spacer. *J. Clin. Microbiol.*, 2000, 38, p. 4527–4534.
 43. JENSEN, R. H., ARENDRUP, M. C. Molecular diagnosis of dermatophyte infections. *Curr. Opin. Infect. Dis.*, 2012, 25, p. 126–134.
 44. KAC, G., BOUGNOUX, M., FEUILHADE DE CHAUVIN, M., SENE, S., DEROUIN, F. Genetic diversity among *Trichophyton mentagrophytes* isolates using random amplified polymorphic DNA method. *Brit. J. Dermatol.*, 1999, 140, p. 839–844.
 45. KAMIYA, A., KIKUCHI, A., TOMITA, Y., KANBE, T. PCR and PCR-RFLP techniques targeting the DNA topoisomerase II gene for rapid clinical diagnosis of the etiologic agent of dermatophytosis. *J. Dermatol. Sci.*, 2004, 34, p. 35–48.
 46. KANBE, T., SUZUKI, Y., KAMIYA, A., et al. PCR-based identification of common dermatophyte species using primer sets specific for the DNA topoisomerase II genes. *J. Dermatol. Sci.*, 2003, 32, p. 151–161.
 47. KANO, R., NAKAMURA, Y., WATARI, T., et al. Molecular analysis of chitin synthase 1 (CHS1) gene sequences of *Trichophyton mentagrophytes* complex and *T. rubrum*. *Curr. Microbiol.*, 1998, 37, p. 236–239.
 48. KANO, R., HIRAI, A., MURAMATSU, M., WATARI, T.,

- HASEGAWA, A. Direct detection of dermatophytes in skin samples based on sequences of the chitin synthase 1 (CHS1) gene. *J. Vet. Med. Sci.*, 2003, 65, p. 267–270.
49. KARDJEVA, V., SUMMERBELL, R., KANTARDJIEV, T., et al. Forty-eight-hour diagnosis of onychomycosis with subtyping of *Trichophyton rubrum* strains. *J. Clin. Microbiol.*, 2006, 44, p. 1419–1427.
 50. KASZUBIAK, A., KLEIN, S., DE HOOG, G., GRÄSER, Y. Population structure and evolutionary origins of *Microsporum canis*, *M. ferrugineum* and *M. audouinii*. *Infect. Genet. Evol.*, 2004, 4, p. 179–186.
 51. KAWASAKI, M., ANZAWA, K., WAKASA, A., et al. Different genes can result in different phylogenetic relationships in *Trichophyton* species. *Jap. J. Med. Mycol.*, 2008, 49, p. 311–318.
 52. KAWASAKI, M., ANZAWA, K., USHIGAMI, T., KAWANISHI, J., MOCHIZUKI, T. Multiple gene analyses are necessary to understand accurate phylogenetic relationships among *Trichophyton* species. *Med. Mycol. J.*, 2011, 52, p. 245–254.
 53. KHOSRAVI, A., BEHZAD, F., SABOKBAR, A., et al. Molecular typing of *Epidermophyton floccosum* isolated from patients with dermatophytosis by RAPD–PCR. *J Basic Microbiol.*, 2010, 50, p. S68–S73.
 54. KIM, J., TAKAHASHI, Y., TANAKA, R., et al. Identification and subtyping of *Trichophyton mentagrophytes* by random amplified polymorphic DNA. *Mycoses*, 2001, 44, p. 157–165.
 55. KIM, J. Y., CHOE, Y. B., AHN, K. J., LEE, Y. W. Identification of dermatophytes using multiplex polymerase chain reaction. *Ann. Dermatol.*, 2011, 23, p. 304–312.
 56. KONDORI, N., ABRAHAMSSON, A. L., ATAOLLAHY, N., WENNERÅS, C. Comparison of a new commercial test, Dermatophyte-PCR kit, with conventional methods for rapid detection and identification of *Trichophyton rubrum* in nail specimens. *Med. Mycol.*, 2010, 48, p. 1005–1008.
 57. KONDORI, N., TEHRANI, P. A., STRÖMBECK, L., FAERGEMANN, J. Comparison of Dermatophyte PCR kit with conventional methods for detection of dermatophytes in skin specimens. *Mycopathologia*, 2013, 176, p. 237–241.
 58. LI, X.-F., WEI, T., HONG, W., et al. Direct detection and differentiation of causative fungi of onychomycosis by multiplex polymerase chain reaction-based assay. *Eur. J. Dermatol.*, 2011, 21, p. 37–42.
 59. LI, Y. C., KOROL, A. B., FAHIMA, T., BEILES, A., NEVO, E. Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. *Mol. Ecol.*, 2002, 11, p. 2453–2465.
 60. LITZ, C., CAVAGNOLO, R. Polymerase chain reaction in the diagnosis of onychomycosis: a large, single-institute study. *Brit. J. Dermatol.*, 2010, 163, p. 511–514.
 61. LIU, D., COLOE, S., PEDERSEN, J., BAIRD, R. Use of arbitrarily primed polymerase chain reaction to differentiate *Trichophyton* dermatophytes. *FEMS Microbiol. Lett.*, 1996, 136, p. 147–150.
 62. LIU, D., COLOE, S., BAIRD, R., PEDERSEN, J. Rapid mini-preparation of fungal DNA for PCR. *J. Clin. Microbiol.*, 2000, 38, p. 471–471.
 63. LIU, D., COLOE, S., BAIRD, R., PEDERSEN, J. Application of PCR to the identification of dermatophyte fungi. *J. Med. Microbiol.*, 2000, 49, p. 493–497.
 64. LOEFFLER, J., HEBART, H., BIALEK, R., et al. Contaminations occurring in fungal PCR assays. *J. Clin. Microbiol.*, 1999, 37, p. 1200–1202.
 65. MEHLIG, L., GARVE, C., RITSCHHEL, A., et al. Clinical evaluation of a novel commercial multiplex–based PCR diagnostic test for differential diagnosis of dermatomycoses. *Mycoses*, 2014, 57, p. 27–34.
 66. MIYAJIMA, Y., SATOH, K., UCHIDA, T., et al. Rapid real-time diagnostic PCR for *Trichophyton rubrum* and *Trichophyton mentagrophytes* in patients with tinea unguium and tinea pedis using specific fluorescent probes. *J. Dermatol. Sci.*, 2013, 69, p. 229–235.
 67. MOCHIZUKI, T., SUGIE, N., UEHARA, M. Random amplification of polymorphic DNA is useful for the differentiation of several anthropophilic dermatophytes. *Mycoses*, 1997, 40, p. 405–409.
 68. MOCHIZUKI, T., KAWASAKI, M., ISHIZAKI, H., et al. 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.*, 2001, 27, p. 14–20.
 69. MOCHIZUKI, T., ISHIZAKI, H., BARTON, R. C., et al. Restriction fragment length polymorphism analysis of ribosomal DNA intergenic regions is useful for differentiating strains of *Trichophyton mentagrophytes*. *J. Clin. Microbiol.*, 2003, 41, p. 4583–4588.
 70. MOCHIZUKI, T., KAWASAKI, M., TANABE, H., et al. Molecular epidemiology of *Trichophyton tonsurans* isolated in Japan using RFLP analysis of non-transcribed spacer regions of ribosomal RNA genes. *Jpn. J. Infect. Dis.*, 2007, 60, p. 188–192.
 71. NAGAO, K., SUGITA, T., OUCHI, T., NISHIKAWA, T. Identification of *Trichophyton rubrum* by nested PCR analysis from paraffin embedded specimen in trichophytia profunda acuta of the glabrous skin. *Jap. J. Med. Mycol.*, 2005, 46, p. 129–132.
 72. NENOFF, P., ERHARD, M., SIMON, J. C., et al. MALDI-TOF mass spectrometry—a rapid method for the identification of dermatophyte species. *Med. Mycol.*, 2013, 51, p. 17–24.
 73. NINET, B., JAN, I., BONTEMS, O., et al. Identification of dermatophyte species by 28s ribosomal DNA sequencing with a commercial kit. *J. Clin. Microbiol.*, 2003, 41, p. 826–830.
 74. OHST, T., DE HOOG, S., PRESBER, W., STAVRAKIEVA, V., GRÄSER, Y. Origins of microsatellite diversity in the *Trichophyton rubrum*-*T. violaceum* clade (dermatophytes). *J. Clin. Microbiol.*, 2004, 42, p. 4444–4448.
 75. OKEKE, C. N., TSUBOI, R., KAWAI, M., HIRUMA, M., OGAWA, H. 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.*, 2001, 39, p. 101–106.
 76. PASQUETTI, M., PEANO, A., SOGLIA, D., et al. Development and validation of a microsatellite marker-based method for tracing infections by *Microsporum canis*. *J. Dermatol. Sci.*, 2013, 70, p. 123–129.
 77. REZAEI-MATEHKOLAEI, A., MAKIMURA, K., DE HOOG, G. S., et al. Discrimination of *Trichophyton tonsurans* and *Trichophyton equinum* by PCR-RFLP and by beta-tubulin and translation elongation factor 1-alpha sequencing. *Med. Mycol.*, 2012, 50, p. 760–764.
 78. REZAEI-MATEHKOLAEI, A., MAKIMURA, K., DE HOOG, G. S., et al. Multilocus differentiation of the related dermatophytes *Microsporum canis*, *Microsporum ferrugineum* and *Microsporum audouinii*. *J. Med. Microbiol.*, 2012, 61, p. 57–63.

79. REZAEI-MATEHKOLAEI, A., MAKIMURA, K., SHIDFAR, M., et al. Use of single-enzyme PCR-restriction digestion barcode targeting the internal transcribed spacers (ITS rDNA) to identify dermatophyte species. *Iran J. Public Health*, 2012, 41, p. 82–94.
80. REZAEI-MATEHKOLAEI, A., MAKIMURA, K., DE HOOG, S., et al. Molecular epidemiology of dermatophytosis in Tehran, Iran, a clinical and microbial survey. *Med. Mycol.*, 2013, 51, p. 203–207.
81. SATO, T., TAKAYANAGI, A., NAGAO, K., et al. Simple PCR-based DNA microarray system to identify human pathogenic fungi in skin. *J. Clin. Microbiol.*, 2010, 48, p. 2357–2364.
82. SHARMA, R., DE HOOG, S., PRESBER, W., GRASER, Y. A virulent genotype of *Microsporum canis* is responsible for the majority of human infections. *J. Med. Microbiol.*, 2007, 56, p. 1377–1385.
83. SHARMA, R., PRESBER, W., RAJAK, R. C., GRÄSER, Y. Molecular detection of *Microsporum persicolor* in soil suggesting widespread dispersal in central India. *Med. Mycol.*, 2008, 46, p. 67–73.
84. SPESSO, M., NUNCIRA, C., BURSTEIN, V., et al. Microsatellite-primed PCR and random primer amplification polymorphic DNA for the identification and epidemiology of dermatophytes. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 2013, 32, p. 1009–1015.
85. SUMMERBELL, R. C., MOORE, M. K., STARINK-WILLEMSE, M., VAN IPEREN, A. ITS barcodes for *Trichophyton tonsurans* and *T. equinum*. *Med. Mycol.*, 2007, 45, p. 193–200.
86. TAKEDA, K., NISHIBU, A., ANZAWA, K., MOCHIZUKI, T. Molecular epidemiology of a major subgroup of *Arthroderma benhamiae* isolated in Japan by restriction fragment length polymorphism analysis of the non-transcribed spacer region of ribosomal RNA gene. *Jpn. J. Infect. Dis.*, 2012, 65, p. 233–239.
87. UCHIDA, T., MAKIMURA, K., ISHIHARA, K., et al. Comparative study of direct polymerase chain reaction, microscopic examination and culture-based morphological methods for detection and identification of dermatophytes in nail and skin samples. *J. Dermatol.*, 2009, 36, p. 202–208.
88. VERRIER, J., KRÄHENBÜHL, L., BONTEMS, O., et al. Dermatophyte identification in skin and hair samples using a simple and reliable nested polymerase chain reaction assay. *Brit. J. Dermatol.*, 2013, 168, p. 295–301.
89. WAKASA, A., ANZAWA, K., KAWASAKI, M., MOCHIZUKI, T. 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.*, 2010, 37, p. 431–440.
90. WHITE, T. C., OLIVER, B. G., GRÄSER, Y., HENN, M. R. Generating and testing molecular hypotheses in the dermatophytes. *Eukaryot Cell*, 2008, 7, p. 1238–1245.
91. WISSELINK, G., VAN ZANTEN, E., KOOISTRA-SMID, A. Trapped in keratin; a comparison of dermatophyte detection in nail, skin and hair samples directly from clinical samples using culture and real-time PCR. *J. Microbiol. Methods*, 2011, 85, p. 62–66.
92. YANG, X., SUGITA, T., TAKASHIMA, M., et al. 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.*, 2009, 54, p. 38–42.
93. YAZDANPARAST, A., JACKSON, C. J., BARTON, R. C., EVANS, E. Molecular strain typing of *Trichophyton rubrum* indicates multiple strain involvement in onychomycosis. *Brit. J. Dermatol.*, 2003, 148, p. 51–54.
94. YU, J., WAN, Z., CHEN, W., WANG, W., LI, R. Molecular typing study of the *Microsporum canis* strains isolated from an outbreak of tinea capitis in school. *Mycopathologia*, 2004, 157, p. 37–41.
95. YÜKSEL, T., ?LKIT, M. Identification of rare macroconidia-producing dermatophytic fungi by real-time PCR. *Med. Mycol.*, 2012, 50, p. 346–352.
96. ZHONG, Z., LI, R., LI, D., WANG, D. Typing of common dermatophytes by random amplification of polymorphic DNA. *Jap. J. Med. Mycol.*, 1997, 38, p. 239–246.

Poděkování: Tato práce byla podpořena projekty GAUK 1344214 a IGA_LF_2014_021.

Do redakce došlo dne 8. 7. 2014.

Adresa pro korespondenci:

Mgr. Vít Hubka

Katedra botaniky, Přírodovědecká fakulta,

Univerzita Karlova v Praze

Benátská 2

128 01 Praha 2

e-mail: hubka@biomed.cas.cz

Článek 2

Molekulární epidemiologie dermatofytóz v České republice – výsledky dvouleté studie

Hubka V.^{1,2}, Větrovský T.³, Dobiášová S.⁴, Skořepová M.⁵, Lysková P.⁶, Mencl K.⁷, Mallátová N.⁸, Janouškovcová H.⁹, Hanzlíčková J.⁹, Dobiáš R.⁴, Čmoková A.¹, Stará J.⁵, Hamal P.¹⁰, Svobodová L.¹⁰, Kolařík M.^{1,2}

¹Katedra botaniky, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova v Praze
vedoucí katedry doc. RNDr. Yvonne Němcová, Ph.D.

²Laboratoř genetiky a metabolismu hub, Mikrobiologický ústav, Akademie věd České republiky, v. v. i., Praha
vedoucí laboratoře Mgr. Miroslav Kolařík, Ph.D.

³Laboratoř environmentální mikrobiologie, Mikrobiologický ústav, Akademie věd České republiky, v. v. i., Praha
vedoucí laboratoře: RNDr. Petr Baldrian, Ph.D.

⁴Oddělení bakteriologie a mykologie, Centrum klinických laboratoří, Zdravotní ústav se sídlem v Ostravě
vedoucí oddělení RNDr. Vladislav Holec

⁵Centrum pro dermatomykózy, Dermatovenerologická klinika 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy
a Všeobecné fakultní nemocnice v Praze, přednosta kliniky prof. MUDr. Jiří Štork, CSc.

⁶Laboratoř lékařské mykologie, oddělení parazitologie, mykologie a mykobakteriologie Praha, Zdravotní ústav
se sídlem v Ústí nad Labem, Praha, vedoucí oddělení RNDr. Zuzana Hůzová

⁷Oddělení klinické mikrobiologie, Pardubická krajská nemocnice, a. s., Pardubice
primář oddělení MUDr. et Mgr. Eva Zálabská, Ph.D.

⁸Pracoviště parazitologie a mykologie, Centrální laboratoře Nemocnice České Budějovice, a. s.
ředitel MUDr. Břetislav Šon

⁹Ústav mikrobiologie, Fakultní nemocnice Plzeň-Lochotín
přednosta ústavu RNDr. Karel Fajfrlík Ph.D.

¹⁰Ústav mikrobiologie, Lékařská fakulta Univerzity Palackého v Olomouci
přednosta ústavu prof. MUDr. Milan Kolář, Ph.D.

SOUHRN

Cílem práce bylo zhodnotit molekulárně genetickými metodami (MGM) spektrum původců dermatofytóz na území České republiky s rozdělením podle hlavních klinických forem. Během dvou let (červenec 2011 až červen 2013) bylo na šesti regionálních pracovištích zachyceno 3235 kulturačně pozitivních vzorků s dermatofyty. Nejvyšší počet izolátů pocházel z případů tinea unguium (55,5 %), dále t. corporis (29,2 %), t. pedis (14,6 %) a t. capitis (0,7 %). Druhová identifikace izolátů všech druhů (n = 672) s výjimkou *Trichophyton rubrum* (n = 2 563) byla provedena MGM (PCR-fingerprinting nebo sekvenace ITS oblasti rDNA). Pro *T. rubrum* byla molekulárně ověřena jen identifikace morfologicky nejednoznačných izolátů (n = 189). Celkem bylo identifikováno 14 druhů dermatofytů, přičemž nejvýznamnější změnou oproti minulosti bylo vysoké zastoupení zoofilního druhu *Arthroderma benhamiae*, který působil velkou část případů t. corporis (22,9 %) a t. capitis (29,2 %). Geofilní druhy působily jen 1,3 % všech infekcí, přestože se jednalo o druhově nejpočetnější skupinu, ve které byly odhaleny dva nepopsané druhy a také přehlížené druhy *Microsporum persicolor* a *M. fulvum*.

Klíčová slova: *Arthroderma benhamiae* – DNA sekvenace – geofilní dermatofyty – ITS oblast rDNA – PCR-fingerprinting – tinea capitis – tinea corporis – tinea pedis – tinea unguium – zoofilní dermatofyty

SUMMARY

Molecular Epidemiology of Dermatophytoses in the Czech Republic – Two-Year-Study Results

The aim of the study was to evaluate the spectrum of causative agents of the main clinical forms of dermatophytoses in the Czech Republic by molecular genetic methods (MGM). During two years (from July 2011 to June 2013), 3255 cultivation specimens were positive for dermatophytes. The highest number of specimens was isolated from tinea unguinum (55,5%), then tinea corporis (29,2%), tinea pedis (14,6%) and tinea capitis (0,7%). The identification of isolated species (n = 672) except for *Trichophyton rubrum* (n = 2563) was performed by MGM (PCR fingerprinting or sequencing of ITS segments of rDNA). For *T. rubrum* only morphologically non-clear isolates were identified (n = 189). In total, 14 species of dermatophytes were identified. The most important change noticed compared to previous results was an increased detection of *Arthroderma benhamiae* in the cases of tinea corporis (22,9%) and tinea capitis (29,2%). Geophilic species caused only 1,3% of all infections even if this group comprised the highest number of species with two newly described ones and also *Microsporum persicolor* and *M. fulvum* which are usually overlooked in the morphological examination.

Key words: *Arthroderma benhamiae* – DNA sequencing – geophilic dermatophytes – ITS region of rDNA – PCR-fingerprinting – tinea capitis – tinea corporis – tinea pedis – tinea unguinum – zoophilic dermatophytes

Čes-slov Derm, 89, 2014, No. 4, p. 167–174

ÚVOD

Dermatofyty jsou skupina ekologicky, morfologicky a fylogeneticky příbuzných mikroskopických hub zahrnující původce infekcí kůže a kožních adnex lidí a zvířat. Dermatofytózy patří celosvětově mezi nejběžnější infekční onemocnění člověka s prevalencí mezi 20–25 % [10]. Na léčbu těchto onemocnění je po celém světě ročně vynaloženo značné množství finančních prostředků [4, 9].

Pro efektivitu léčby a prevenci šíření nálezů je důležité správné druhové určení původce infekce, které umožňuje předepsat cílenou léčbu a zároveň poměrně přesně zacílit zdroj infekce. Spektrum původců dermatofytóz vykazuje velké geografické rozdíly a dynamicky se mění v čase [10, 23]. Nestálá taxonomie skupiny dermatofytů a problematické určování druhů na základě morfologických a fyziologických znaků, činí často výsledky epidemiologických studií z minulosti jen omezeně porovnatelné mezi sebou a s nejnovějšími daty získanými za pomoci molekulárně genetických metod (MGM).

Tato dvouletá studie přináší aktuální přehled původců dermatofytóz v České republice s rozdělením podle hlavních klinických jednotek. Identifikace kultivačně pozitivních vzorků zachycených ve dvouletém období na šesti pracovištích napříč ČR byla ověřena MGM, což umožnilo odhalit široké spektrum druhů, včetně kryptických (obtížně identifikovatelných na základě morfologie) a dosud nepopsaných druhů. Jedná se vůbec o první rozsáhlou, epidemiologickou studii užívající k identifikaci izolátů dermatofytů MGM na našem území a v Evropě vůbec.

MATERIÁL A METODY

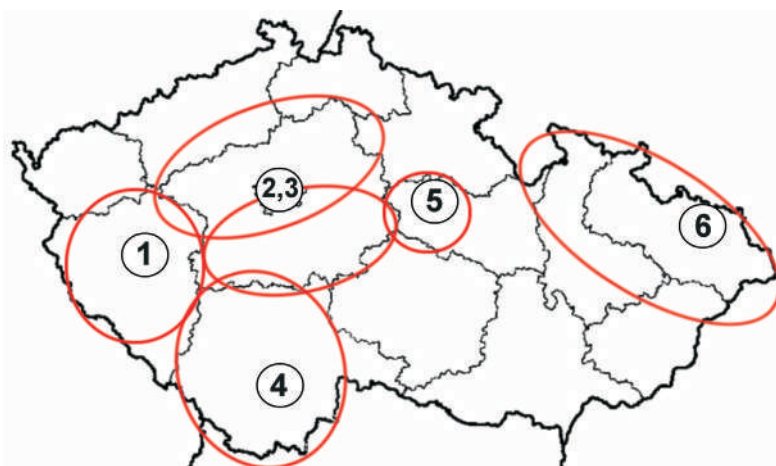
Pacienti

Do studie bylo zapojeno celkem šest regionálních mikrobiologických pracovišť (Zdravotní ústav se sídlem v Os-

travě; Dermatovenerologická klinika 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Všeobecné fakultní nemocnice v Praze; Nemocnice Pardubice; Nemocnice České Budějovice; Zdravotní ústav se sídlem v Ústí nad Labem, pracoviště Praha; a Fakultní nemocnice Plzeň), jejichž přibližné spádové oblasti jsou znázorněny na obrázku 1. Na uvedených pracovištích byly evidovány a shromažďovány všechny kultivačně pozitivní vzorky patřící dermatofytickým houbám přijaté v období 1. 7. 2011 až 31. 6. 2013. Vyšetřovaný materiál zahrnoval nehtové šupiny a podnehtovou drť, kožní šupiny a vlasy. Od pacientů, jejichž odebraný materiál byl kultivačně pozitivní na dermatofyty, byly formou dotazníku získávány anamnestické údaje, které se lišily pro *T. rubrum* a ostatní druhy dermatofytů. U pacientů, jejichž odebraný materiál byl kultivačně pozitivní na *T. rubrum*, byla zaznamenána informace o lokalizaci infekce, pohlaví a věk pacienta. Detailnější údaje byly shromažďovány od pacientů se vzorky pozitivními na jiné druhy dermatofytů a ty byly ukládány anonymně do internetové databáze (<http://www.biomed.cas.cz/mbu/lbwrf/dermatofyta>). Tyto údaje navíc zahrnovaly informace o rizikových faktorech z hlediska získání dermatofytózy, jako např. kontakt se zvířaty, půdou, rizikové koníčky a povolání, úrazy a onemocnění zvyšující riziko získání dermatofytózy, předchozí mykotická onemocnění a jejich léčba, a další informace, které nebyly hodnoceny v této studii. Tyto izoláty byly následně odesílány do Laboratoře genetiky a metabolismu hub v Mikrobiologickém ústavu AV ČR k molekulární identifikaci.

Molekulárně genetické metody

DNA byla izolována ze 14 dní starých kultur (u pomalu rostoucích druhů, např. *T. verrucosum* po delší době) za použití kitu ArchivePure DNA yeast and Gram2+ kit (5 PRIME Inc., Gaithersburg, Maryland) podle pokynů výrobce. Izoláty nejběžnějších původců byly identifikovány na základě vzoru PCR fragmentů získaného metodou PCR-fingerprintingu s primerem M13-core (5'-



Obr. 1. Přibližné spádové oblasti pracovišť zapojených do studie Fakultní nemocnice Plzeň (1); Dermatovenerologická klinika 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Všeobecné fakultní nemocnice v Praze (2); Zdravotní ústav se sídlem v Ústí nad Labem, pracoviště Praha (3); Nemocnice České Budějovice (4); Nemocnice Pardubice (5); Zdravotní ústav se sídlem v Ostravě (6).

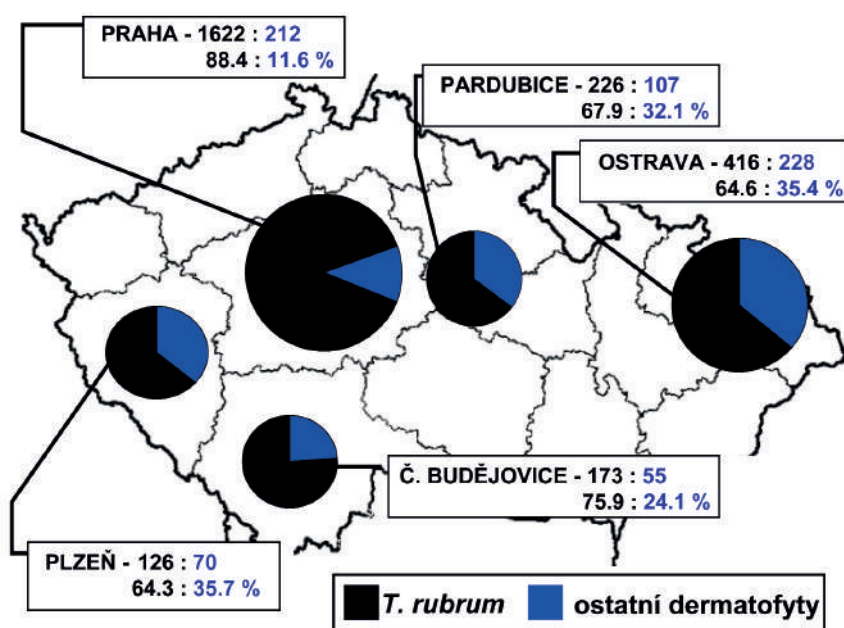
GAGG-GTGGCGGTTCT). PCR reakční směsi byly připraveny v objemech 18,5 µl. Každá směs obsahovala 100 ng DNA, 25 mmol MgCl₂ (Promega Corp., Madison, USA), 0,4 mmol dNTPs (Promega Corp.), 1 U PerfectTaq DNA polymerázy (5Prime, Gaithersburg, USA) s odpovídajícím pufrům a 20 pmol M13-core primeru. Reakce probíhala ve 32 cyklech v následujícím režimu: 94 °C/3 min, 52 °C/1 min, a 65 °C/3 min (1x); 45 °C/40 s, 52 °C/1 min, a 65 °C/3 min (35x); a 94 °C/40 s, 52 °C/1 min, a 65 °C/10 min (1x). Výsledné PCR produkty byly vizualizovány na gelové elektroforóze (agaróza 2 %). Identifikace na úrovni druhu byla uskutečněna porovnáním vzoru PCR fragmentů s izolátem dříve určeným na základě ITS rDNA sekvence (standard).

U izolátů, jejichž vzor proužků neodpovídal standardům, nebo neprodukovaly dostatečně kvalitní vzory, byla provedena sekvenace ITS oblasti rDNA. Reakční směs byla připravena v objemech 25 µl a obsahovala 50 ng DNA, 20 pmol každého primeru, 0,2 mmol dNTPs, a 1 U PerfectTaq DNA polymerázy s odpovídajícím pufrům. K amplifikaci úseku byly použity primery ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG) a ITS4S (5'-CCTCCGCTTATTGATATGCTTAAG), nebo ITS1F (5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA) a NL4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG). Reakce probíhala ve 32 cyklech v následujícím režimu: 95 °C/3 min, 55 °C/30 s, a 72 °C/1 min (1x); 95 °C/30 s, 55 °C/30 s, a 72 °C/1 min (30x); a 95 °C/30 s, 55 °C/30 s, a 72 °C/10 min (1x). Koncové primery byly použity k servisní sekvenaci (Macrogen, Amsterdam, Holansko). Identifikace byla provedena na základě shody ITS sekvence s exotypovým kmenem [1, 3] při použití serveru BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Geofilní druhy, které se vyskytovaly s nízkou frekvencí, byly sekvenovány buď přímo, nebo po předchozím zařazení podle fingerprintu. Také izoláty určené na základě fingerprintu

jako *T. tonsurans* byly sekvenovány kvůli odlišení od příbuzného druhu *T. equinum*. Rozlišovací schopnosti námi použité fingerprintové metody a možnosti kombinace s dalšími metodami byly schematicky znázorněny v práci Čmuková et al. [3].

Trichophyton rubrum

Většina izolátů *T. rubrum* byla identifikována na základě morfologických znaků. Ověření identifikace MGM bylo provedeno v případech, kdy morfologické charakteristiky nebyly jednoznačné. To bylo učiněno u 189 izolátů určených jako *T. rubrum* s netypickou morfologií. Identifikace byla potvrzena ve 182 případech, jeden izolát byl určen jako *T. onychocola*, zbývajících šest izolátů bylo identifikováno jako nedermatofytické houby (*Arthrographis*, *Auxarthron*, *Onychocola*, *Myxotrichum*, aj.). Naopak 44 izolátů, které byly morfologicky identifikovány jako jiné druhy dermatofytů než *T. rubrum*, bylo později MGM reidentifikováno jako *T. rubrum*. Před zahájením studie byla MGM ověřena identifikace 68 izolátů *T. rubrum*, které byly laboratořemi na základě morfologických charakteristik určeny jako „typické“ *T. rubrum*. Identifikace byla potvrzena ve 100 % případech. Tato čísla ukazují, že morfologická identifikace *T. rubrum* na zúčastněných pracovištích, dokonce i atypických izolátů, měla vysokou úspěšnost, a dá se proto očekávat poměrně malá chybovost. Z uvedených čísel je možné zhruba spočítat specifitu a senzitivitu identifikace *T. rubrum* na základě morfologických znaků, které byly 99,0 % a 85,2 %, v uvedeném pořadí. Nižší senzitivita identifikace *T. rubrum* pomocí morfologie neměla vliv na výsledky naší studie, protože všechny nesprávně určené izoláty *T. rubrum*, byly prověřeny MGM. Námi očekávaná chybovost při identifikaci kmenů *T. rubrum* by se tedy měla pohybovat kolem 1 %.



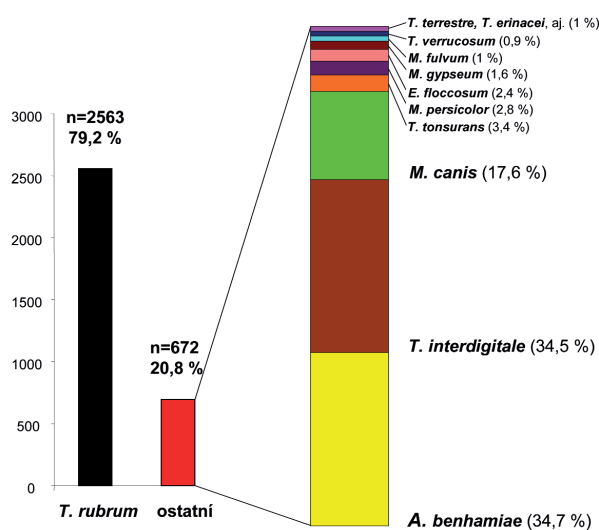
Obr. 2. Poměr izolátů *T. rubrum* v porovnání s ostatními druhy dermatofytů na jednotlivých pracovištích

VÝSLEDKY

Druhové spektrum

V období mezi 1. 7. 2011 a 31. 6. 2013 bylo na šesti zúčastněných pracovištích získáno 3 235 izolátů dermatofytických hub. Nejvyšší počet izolátů pocházel z případů tinea unguium (n = 1794; 55,5 %), dále z t. corporis (n = 945; 29,2 %), t. pedis (n = 472; 14,6 %) a t. capitis (n = 24; 0,7 %).

Celkem 2 563 izolátů (79,2 %) bylo identifikováno jako *T. rubrum*, převážně na základě morfologie. Zastoupení *T. rubrum* v klinickém materiálu se mezi pracovišti výrazně lišilo a pohybovalo se od 64,3 % (Plzeň) do 88,4 % (Praha) – obrázek 2. Mezi zbývajících izolátů (n = 672; 20,8 %) bylo pomocí MGM identifikováno celkem 13



Obr. 3. Druhová identifikace a relativní procentuální zastoupení non-*T. rubrum* dermatofytů (n = 672)

druhů dermatofytů. Přehled druhů a jejich četností v celém souboru i na jednotlivých pracovištích je uveden v tabulce 1. Relativní četnosti non-*T. rubrum* druhů jsou uvedeny na obrázku 3. Nejvíce zastoupeny byly druhy *Arthroderma benhamiae* (n = 233; 7,2 %), *T. interdigitale* (n = 232; 7,2 %) a *M. canis* (n = 118; 3,7 %), které dohromady tvořily 86,8 % non-*T. rubrum* izolátů (viz obr. 3) a v jejich zastoupení byly významné regionální odlišnosti (tab. 1).

Druhově nejpočetnější, ale v procentuálním vyjádření málo významnou skupinou byly geofilní dermatofyty (1,3 % dermatofytóz). Infekce způsobené geofilními dermatofyty byly vzácné v Praze a okolí (0,2 %), naproti tomu na plzeňském pracovišti tvořily 4,1 % (viz tab. 1). Nejvýznamnějším druhem, často zaměňovaným za *T. interdigitale*, byl *M. persicolor* (n = 19; 0,6 %). Dalším kryptickým druhem byl *M. fulvum*, který byl morfologicky zaměňován za *M. gypseum*. Zbývajících geofilními druhy byly identifikovány jako *T. terrestre* (teleomorfa *A. quadrifidum*), *T. onychocola* a *M. aenigmaticum*.

Tinea unguium a tinea pedis

Hlavními původci t. unguium a t. pedis byly druhy *T. rubrum* a *T. interdigitale* (tab. 2 a tab. 3). Z celkového počtu 1 794 případů t. unguium byl *T. rubrum* identifikován v 1 670 případech (93,1 %) a ve 104 případech *T. interdigitale* (5,8 %), zbývajících infekce byly způsobeny hlavně zoofilními druhy *A. benhamiae* a *M. canis*. Ostatní antropofilní nebo geofilní druhy byly zastoupeny jen v 1–2 případech (viz tab. 2). Tinea unguium vyvolaná zoofilními druhy je obecně málo běžná a v našem souboru postihovala s podobnou frekvencí nehty rukou a nohou (7 : 6). Případy infekcí vyvolané *A. benhamiae* byly zjištěny převážně u žen (8 : 2) a věk pacientů se pohyboval v rozmezí 10–76 let. Tinea unguium vyvolaná *M. canis* byla zjištěna u 2 mužů (34 a 38 let) a 1 ženy (46 let).

Tabulka 1. Původci dermatofytóz v ČR v období červenec 2011 až červen 2013

Druh	Celá ČR		Podle pracoviště									
			Praha (VFN+ZÚ)*		Ostrava		Pardubice		České Budějovice		Plzeň	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
<i>Trichophyton rubrum</i>	2563	79,23	1622	88,44	416	64,60	226	67,87	173	75,88	126	64,29
<i>Arthroderma benhamiae</i>	233	7,20	66	3,60	91	14,13	28	8,41	19	8,33	29	14,80
<i>Trichophyton interdigitale</i>	232	7,17	70	3,82	77	11,96	36	10,81	30	13,16	19	9,69
<i>Microsporium canis</i>	118	3,65	45	2,45	32	4,97	29	8,71	3	1,32	9	4,59
<i>Trichophyton tonsurans</i>	23	0,71	17	0,93	4	0,62	0	0	0	0	2	1,02
<i>Microsporium persicolor</i>	19	0,59	2	0,11	7	1,09	3	0,90	2	0,88	5	2,55
<i>Epidermophyton floccosum</i>	16	0,49	9	0,49	5	0,78	1	0,30	0	0	1	0,51
<i>Microsporium gypseum</i>	11	0,34	1	0,05	7	1,09	2	0,60	0	0	1	0,51
<i>Microsporium fulvum</i>	7	0,22	0	0	1	0,16	4	1,20	0	0	2	1,02
<i>Trichophyton verrucosum</i>	6	0,19	1	0,05	0	0	4	1,20	1	0,44	0	0
<i>Trichophyton terrestre (Arthroderma quadrifidum)</i>	3	0,09	0	0	3	0,47	0	0	0	0	0	0
<i>Trichophyton erinacei</i>	2	0,06	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1,02
<i>Microsporium aenigmaticum</i>	1	0,03	0	0	1	0,16	0	0	0	0	0	0
<i>Trichophyton onychocola</i>	1	0,03	1	0,05	0	0	0	0	0	0	0	0
celkem	3235		1834		644		333		228		196	

*celé názvy pracovišť viz Materiál a metody, spádové oblasti viz obrázek 1

Tabulka 2. Původci tinea unguium v ČR v období červenec 2011 až červen 2013

Původce	n	%
<i>Trichophyton rubrum</i>	1670	93,09
<i>Trichophyton interdigitale</i>	104	5,80
<i>Arthroderma benhamiae</i>	10	0,56
<i>Microsporum canis</i>	3	0,17
<i>Epidermophyton floccosum</i>	2	0,11
<i>Microsporum gypseum</i>	1	0,06
<i>Microsporum persicolor</i>	1	0,06
<i>Trichophyton onychocola</i>	1	0,06
<i>Trichophyton terrestre</i> (<i>Arthroderma quadrifidum</i>)	1	0,06
<i>Trichophyton tonsurans</i>	1	0,06
Celkem	1794	

Tabulka 3. Původci tinea pedis v ČR v období červenec 2011 až červen 2013

Původce	n	%
<i>Trichophyton rubrum</i>	419	88,77
<i>Trichophyton interdigitale</i>	41	8,69
<i>Epidermophyton floccosum</i>	10	2,12
<i>Microsporum gypseum</i>	2	0,42
Celkem	472	

Z celkového počtu 472 případů t. pedis, byl *T. rubrum* identifikován jako původce ve 419 (88,8 %) a *T. interdigitale* ve 41 případech (8,7 %). Ve zbývajících případech byly izolovány druhy *Epidermophyton floccosum* (n = 10) a *M. gypseum* (n = 2) (viz tab. 3).

Tinea corporis

Spektrum původců t. corporis bylo ze všech forem dermatofytózy nejširší a dominance *T. rubrum* zde nebyla tak

výrazná jako u t. unguium a t. pedis. Současné zastoupení druhů se výrazně lišilo od údajů uváděných na našem území v minulosti, a proto uvádíme detailnější rozbor pacientů podle věku a pohlaví (tab. 4, obr. 4). Subtypy t. corporis (t. cruris, t. faciei a t. gladiatorum) nebylo možné podle dostupných dat přesně strukturovat a jsou zahrnuty pod t. corporis. Během sledovaného období nebyl evidován žádný případ t. barbae.

Tabulka 4. Původci tinea corporis¹ v ČR v období červenec 2011 až červen 2013

Druh	n	%	Věkový medián	Muži : ženy	Muži (%)
Antropofilní dermatofyty	499	52,8	52	347:152	69,5
<i>Trichophyton rubrum</i>	474	50,16	53	327:147	69
<i>Trichophyton tonsurans</i>	21	2,22	25	18:3	85,7
<i>Epidermophyton floccosum</i>	4	0,42	56,5	2:2	50
Zoofilní dermatofyty	411	43,49	17	112:299	27,3
<i>Arthroderma benhamiae</i>	216	22,86	10	66:150	30,6
<i>Microsporum canis</i>	101	10,69	24	19:82	18,8
<i>Trichophyton interdigitale</i> ²	86	9,1	29	24:62	27,9
<i>Trichophyton verrucosum</i>	6	0,63	44,5	3:3	50
<i>Trichophyton erinacei</i>	2	0,21	15	0:2	0
Geofilní dermatofyty	35	3,7	36	11:24	31,4
<i>Microsporum persicolor</i>	18	1,9	32	8:10	44,4
<i>Microsporum fulvum</i>	7	0,74	55	0:7	0
<i>Microsporum gypseum</i>	7	0,74	35	2:5	28,6
<i>Trichophyton terrestre</i> (<i>Arthroderma quadrifidum</i>)	2	0,21	35	1:1	50
<i>Microsporum aenigmaticum</i>	1	0,11	46	0:1	0
Celkem	945		37	470:475	49,7

¹včetně t. faciei, t. gladiatorum a t. cruris

²tinea corporis je působena hlavně zoofilními kmeny *T. interdigitale* [11, 19]

Tabulka 5. Původci tinea capitis v ČR v období červenec 2011 až červen 2013

Původce	n	%
<i>Microsporum canis</i>	14	58,33
<i>Arthroderma benhamiae</i>	7	29,17
<i>Microsporum gypseum</i>	1	4,17
<i>Trichophyton interdigitale</i>	1	4,17
<i>Trichophyton tonsurans</i>	1	4,17
Celkem	24	

V průběhu studie bylo zachyceno 945 kultivačně pozitivních případů t. corporis. Antropofilní druhy byly identifikovány ze 499 vzorků (52,8 %), zoofilní druhy ze 411 (43,5 %) a geofilní ze 35 (3,7 %). Antropofilní druhy *T. rubrum* a *T. tonsurans* byly výrazně častěji zastoupeny u mužů (69 %, respektive 85,7 % infekcí), ale výrazně se lišil věkový medián pacientů (viz tab. 4). Významná část infekcí způsobených *T. rubrum* odpovídala subtypu t. cruris a počet pacientů v populaci výrazně rostl se zvyšujícím se věkem (obr. 4). Infekce působené *T. tonsurans* odpovídaly zejména subtypu t. gladiatorum a vyskytovaly se hlavně u mužů ve věku 21–30 let (viz obr. 4). Zoofilní druhy výrazně převažovaly u mladých žen (72,7 %; věkový medián 17 let) a nejvíce zastoupený byl druh *A. benhamiae* (n = 216, věkový medián 10 let), který působil 66,9 % případů t. corporis u pacientů do 10 let a 46,8 % případů u pacientů ve věku 11–20 let (viz obr. 4). Další významní zoofilní původci, *M. canis* (n = 101) a zoofilní forma *T. interdigitale* (n = 86), byli také výrazně častější u žen, ale infekce byly rovnoměrněji zastoupeny v populaci i u vyšších věkových skupin (viz obr. 4). Ze zbývajících zoofilních druhů dermatofytů byly zjištěny *T. verrucosum* (n = 6; přenesené ze skotu) a *T. erinacei* (n = 2; přenesené pravděpodobně z králíka).

Geofilní druhy byly původci 3,7 % případů t. corporis (n = 35) a byly izolovány s podobnou frekvencí z pacientů ve všech věkových skupinách (viz obr. 4). Polovina pří-

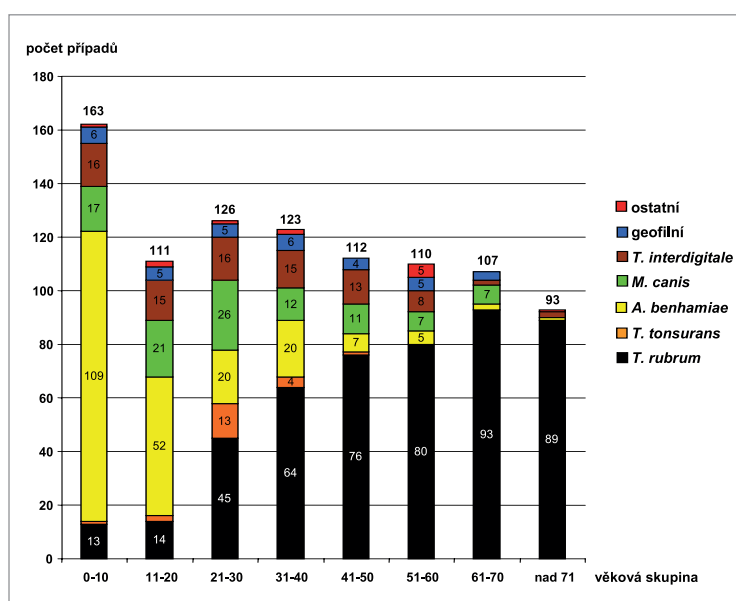
padů byla vyvolána *M. persicolor* (viz tab. 4) bez rozdílu ve frekvenci mezi muži a ženami. Naproti tomu všechny infekce vyvolané *M. fulvum* (n = 7) byly zjištěny u žen (viz tab. 4) ve věku 37–63 let a časově, ani místně spolu nesouvisely.

Tinea capitis

Tinea capitis byla jen zřídka zastoupená klinická forma dermatofytózy. Během studie bylo zaznamenáno 24 případů a z toho 22 (91,7 %) bylo způsobeno zoofilními druhy *M. canis* (n = 14), *A. benhamiae* (n = 7) a zoofilním kmenem *T. interdigitale* (n = 1). Jediný případ byl shodně vyvolán *T. tonsurans* a *M. gypseum* (tab. 5). Všichni pacienti byli ve věku 1–12 let (věkový medián 6 let), počet chlapců byl 14 a dívek bylo 10.

DISKUSE

Správná identifikace původců infekcí je předpokladem pro sledování změn v četnostech jednotlivých druhů, napomáhá hodnotit výsledky preventivních opatření a intervencí, a je základním požadavkem pro přípravu epidemiologických studií. V minulosti byla publikována řada MGM, které s větší či menší mírou přesnosti dovedou identifikovat druhy dermatofytů [2, 3]. Sekvence oblasti ITS rDNA je uznávána jako zlatý standard při molekulár-



Obr. 4. Původci tinea corporis a věková struktura pacientů (analýza 945 případů)

ně genetické identifikaci dermatofytů, protože dovede rozlišit většinu známých druhů a je snadno dostupná [7, 8]. Některé PCR-fingerprintové metody představují vhodnou a levnější alternativu k sekvenování a také dovedou spolehlivě identifikovat dermatofyty [6, 17, 22]. PCR-fingerprintová metoda s primerem M13-core, použitá k určení většiny izolátů v této studii, byla dříve úspěšně použita k druhové identifikaci dermatofytů [6] i jiných skupin hub [12, 21, 25, 26]. Metoda produkovala druhově specifické vzory proužků u všech 14 druhů dermatofytů zaznamenaných v této studii a je schopná rozlišit i některé vzácné izolované druhy, které nebyly v této studii zachyceny [6, 14]. Spolehlivost metody demonstruje i záchyt dvou dosud nepopsaných druhů v průběhu této studie, které byly popsány jako *T. onychocola* [13] a *M. aenigmaticum* [14] a byly zprvu odhaleny na základě unikátního PCR fingerprintu. Z naší studie, ani z předchozích prací nebylo známo, zda je metoda schopná rozlišit fylogeneticky blízké druhy *T. tonsurans* a *T. equinum*, proto byly všechny izoláty určené fingerprintem jako *T. tonsurans* sekvenovány. Rozlišení zoofilních a antropofilních izolátů *T. interdigitale*, které je možné na základě sekvenace ITS rDNA [11] bylo nad rozlišovací schopností fingerprintové metody, ale velmi dobrou představu o tomto rozdělení může dát klinická manifestace infekcí a fenotyp izolátů. Infekce typu *t. corporis* jsou silně zánětlivé a působené zpravidla zoofilními kmeny *T. interdigitale*, kdežto *t. pedis* a *t. unguium* jsou nejčastěji působeny antropofilními kmeny [19].

Hlavní původci a jejich zastoupení se u *t. pedis* a *t. unguium* v podstatě nezměnilo od doby epidemiologické studie na území Prahy a okolí provedené mezi lety 1987 a 1998 [16], kdy byli ve více než 99 % případů izolováni jako původci *T. rubrum* a *T. interdigitale*, zbývající případy byly vyvolány *E. floccosum*. V této práci byly druhy *T. rubrum* a *T. interdigitale* izolovány v 98,9 % případů, *t. unguium* a 97,5 % případů *t. pedis*. U *t. unguium* se navíc kromě *E. floccosum* podařilo identifikovat dalších sedm málo běžných původců (viz tab. 2), u *t. pedis* pouze *M. gypseum* (viz tab. 3).

Významné změny v druhovém spektru a v procentuálním zastoupení hlavních původců oproti minulosti byly nalezeny hlavně u klinických forem *t. corporis* a *t. capitis*. Nejvýznamnější změnou je bezpochyby výrazné rozšíření druhu *A. benhamiae*, který byl v této studii druhým nejběžnějším původcem dermatofytóz hned po *T. rubrum* (viz tab. 1, obr. 3) a je s ním spojena významná část infekcí *t. corporis* a *t. capitis* (viz tab. 4 a 5), především u dětských pacientů (viz obr. 4). Infekce u člověka způsobené tímto druhem se u nás začaly objevovat souběžně s počátkem této studie v roce 2011 [18, 24] a velmi rychle se na našem území rozšířily. Podobné infekce jsou známy hlavně z Německa, Švýcarska a Japonska [5, 15, 20] a v evropském regionu jsou na člověka přenášeny hlavně z morčat. *Arthroderma benhamiae* je velmi univerzálním patogenem a klinická manifestace zahrnuje kromě *t. corporis* a *t. capitis* také *t. unguium* (viz tab. 2). Údaje o záchytu tohoto druhu zcela chybí ve všech epidemiologických studiích provedených v posledních desetiletích [10, 22, 23]

a intenzivní výskyt je zřejmě lokální a časově jasně ohraničenou záležitostí. Tato studie přináší vůbec první ucelené informace o distribuci tohoto patogenu mezi pacienty podle věku, pohlaví a klinické formy onemocnění (viz tab. 2, 4, 5, obr. 4).

Čistě taxonomická je změna v pojmenovávání některých variet *T. mentagrophytes*, kterým byly v minulosti přisuzovány případy *t. corporis* přenesené ze zvířat a dnes jsou tyto izoláty řazeny do druhu *T. interdigitale* [19] (viz tab. 4). Přínosem molekulární identifikace bylo také odhalení druhů *M. persicolor*, *M. fulvum* a *T. erinacei*, které se vyskytují s nízkou četností a jsou na základě morfologie obtížně identifikovatelné.

LITERATURA

- BRASCH, J., GRÄSER, Y. *Trichophyton eboreum* sp. nov. isolated from human skin. *J. Clin. Microbiol.*, 2005, 43, p. 5230–5237.
- CAFARCHIA, C., IATTA, R., LATROFA, M. S., GRÄSER, Y., OTRANTO, D. Molecular epidemiology, phylogeny and evolution of dermatophytes. *Infect. Genet. Evol.*, 2013, 20, p. 336–351.
- ČMOKOVÁ, A., HAMAL, P., SVOBODOVÁ, L., HUBKA, V. Detekce, identifikace a typizace dermatofytů molekulárně genetickými metodami. *Čes.-slov. Derm.*, 2014, 89, 4, p. 175–186.
- DRAKE, L. A., DINEHART, S. M., FARMER, E. R., et al. Guidelines of care for superficial mycotic infections of the skin: tinea corporis, tinea cruris, tinea faciei, tinea manuum, and tinea pedis. *J. Am. Acad. Dermatol.*, 1996, 34, p. 282–286.
- FUMEAUX, J., MOCK, M., NINET, B., et al. First report of *Arthroderma benhamiae* in Switzerland. *Dermatology*, 2004, 208, p. 244–250.
- GRÄSER, Y., KUIJPERS, A. F. A., PRESBER, W., DE HOOG, G. S. Molecular taxonomy of *Trichophyton mentagrophytes* and *T. tonsurans*. *Med. Mycol.*, 1999, 37, p. 315–330.
- GRÄSER, Y., DE HOOG, S., SUMMERBELL, R. Dermatophytes: recognizing species of clonal fungi. *Med. Mycol.*, 2006, 44, p. 199–209.
- GRÄSER, Y., SCOTT, J., SUMMERBELL, R. The new species concept in dermatophytes – a polyphasic approach. *Mycopathologia*, 2008, 166, p. 239–256.
- GUPTA, A. K. Pharmaco-economic analysis of oral antifungal therapies used to treat dermatophyte onychomycosis of the toenails. *Pharmacoeconomics*, 1998, 13, p. 243–256.
- HAVLICKOVA, B., CZAIKA, V., FRIEDRICH, M. Epidemiological trends in skin mycoses worldwide. *Mycoses*, 2008, 51, p. 2–15.
- HEIDEMANN, S., MONOD, M., GRÄSER, Y. 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.*, 2010, 162, p. 282–295.
- HUBKA, V., KOLAŘÍK, M., KUBÁTOVÁ, A., PETERSON, S. W. Taxonomical revision of *Eurotium* and transfer of species to *Aspergillus*. *Mycologia*, 2013, 105, p. 912–937.
- HUBKA, V., ČMOKOVÁ, A., SKOREPOVA, M., MIKULA,

- P., KOLARIK, M. *Trichophyton onychocola* sp. nov. isolated from human nail. *Med. Mycol.*, 2014, 52, p. 285–292.
14. HUBKA, V., DOBIASOVA, S., DOBIAS, R., KOLARIK, M. *Microsporium aenigmaticum* sp. nov. from *M. gypseum* complex, isolated as a cause of tinea corporis. *Med. Mycol.*, 2014, 52, p. 387–396.
 15. KAWASAKI, M., ASO, M., INOUE, T., et al. Two cases of tinea corporis by infection from a rabbit with *Arthroderma benhamiae*. *Jap. J. Med. Mycol.*, 1999, 41, p. 263–267.
 16. KUKLOVÁ, I., KUČEROVÁ, H. Dermatophytoses in Prague, Czech Republic, between 1987 and 1998. *Mycoses*, 2001, 44, p. 493–496.
 17. LIU, D., COLOE, S., BAIRD, R., PEDERSEN, J. Application of PCR to the identification of dermatophyte fungi. *J. Med. Microbiol.*, 2000, 49, p. 493–497.
 18. MALLÁTOVÁ, N., JANATOVÁ, H., KOCOURKOVÁ, K., et al. *Arthroderma benhamiae* jako původce tinea capitis profunda a tinea corporis u dětských pacientů. *Čes.-slov. Derm.*, 2014, 89, 4, p. 199–204.
 19. NENOFF, P., HERRMANN, J., GRÄSER, Y. *Trichophyton mentagrophytes sive interdigitale*? A dermatophyte in the course of time. *J. Dtsch. Dermatol. Ges.*, 2007, 5, p. 198–202.
 20. NENOFF, P., SCHULZE, I., UHRLAß, S., KRÜGER, C. Kerion Celsi durch den zoophilen Dermatophyten *Trichophyton* species von *Arthroderma benhamiae* bei einem Kind. *Hautarzt*, 2013, 64, p. 846–850.
 21. NOVÁKOVÁ, A., HUBKA, V., DUDOVÁ, Z., et al. New species in *Aspergillus* section *Fumigati* from reclamation sites in Wyoming (USA) and revision of *A. viridinutans* complex. *Fungal Divers*, 2014, 64, p. 253–274.
 22. REZAEI-MATEHKOLAEI, A., MAKIMURA, K., DE HOOG, S., et al. Molecular epidemiology of dermatophytosis in Tehran, Iran, a clinical and microbial survey. *Med. Mycol.*, 2013, 51, p. 203–207.
 23. SEEBACHER, C., BOUCHARA, J.-P., MIGNON, B. Updates on the epidemiology of dermatophyte infections. *Mycopathologia*, 2008, 166, p. 335–352.
 24. SKOŘEPOVÁ, M., HUBKA, V., POLÁŠKOVÁ, S., STARÁ, J., ČMOKOVÁ, A. Naše první zkušenosti s infekcemi vyvolanými *Arthroderma benhamiae* (*Trichophyton* sp.). *Čes.-slov. Derm.*, 2014, 89, 4, p. 192–198.
 25. TUTHILL, D. E. Genetic variation and recombination in *Penicillium miczynskii* and *Eupenicillium* species. *Mycol. Prog.*, 2004, 3, p. 3–12.
 26. ZHOU, S., SMITH, D. R., STANOSZ, G. R. Differentiation of *Botryosphaeria* species and related anamorphic fungi using Inter Simple or Short Sequence Repeat (ISSR) fingerprinting. *Mycol. Res.*, 2001, 105, p. 919–926.

Poděkování

Děkujeme Dr. Miladě Chudíčkové a Aleně Gabrielové za jejich asistenci v laboratoři (MBÚ AVČR) a Bc. Andree Macurové (ZÚ Ostrava) za pomoc se zpracováním údajů. Děkujeme nadaci Nadání Josefa, Marie a Zdeňky Hlávkových za poskytnutí finančního příspěvku na uhrazení části cestovních nákladů spojených s prezentací výsledků studie na kongresu IUMS 2014 (Montreal, Kanada, prezentující – V. Hubka).

Grantové podpory: GAUK 1344214, IGA_LF_2014_021.

Do redakce došlo dne 3. 7. 2014.

Adresa pro korespondenci:

Mgr. Vít Hubka

Katedra botaniky, Přírodovědecká fakulta,

Univerzita Karlova v Praze

Benátská 2

128 01 Praha 2

e-mail: hubkova@biomed.cas.cz

Článek 3

Naše první zkušenosti s infekcemi vyvolanými *Arthroderma benhamiae* (*Trichophyton* sp.)

Skořepová M.¹, Hubka V.^{2,3}, Polášková S.¹, Stará J.¹, Čmoková A.²

¹ Dermatovenerologická klinika 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Všeobecné fakultní nemocnice v Praze přednosta prof. MUDr. Jiří Štork, CSc.

² Katedra botaniky, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova v Praze vedoucí doc. RNDr. Yvonne Němcová, Ph.D.

³ Laboratoř genetiky a metabolismu hub, Mikrobiologický ústav, Akademie věd České republiky, v. v. i., Praha vedoucí Mgr. Miroslav Kolařík, Ph.D.

SOUHRN

Trichophyton sp. anamorfa od *Arthroderma benhamiae* je relativně nový původce dermatofytóz na našem území. V období od 1. 1. 2012 do 31. 12. 2013 byl tento zoofilní dermatofyt izolován v laboratoři Dermatovenerologické kliniky u 25 pacientů. Určení druhu bylo potvrzeno molekulárně genetickou analýzou. U 15 pacientů byl sledován také klinický průběh a efekt léčby. Šlo o 12 dětí ve věku 2–10 let a jen 3 dospělé. Zdrojem infekce bylo v 9 případech morče, ve 2 případech přicházeli v úvahu jiní hlodavci a ve 3 případech pes. Inkubační doba byla 3–4 týdny. Klinický obraz nejevil odlišnosti oproti jiným infekcím vyvolaným zoofilními dermatofyty, až fluorescenci lézí ve Woodově světle, což je jinak charakteristické pro rod *Microsporum*, nikoli pro *Trichophyton*. V lokální léčbě se nejlépe uplatnily naftifin a ciklopiroxolamin. Klotrimazol se ukázal jako neúčinný. Léze ve křtici se zhojily po 4–8 týdnech léčby perorálním terbinafinem.

Klíčová slova: dermatofytózy – *Arthroderma benhamiae* – diagnóza – terapie

SUMMARY

Our first Experiences with Infections Caused by *Arthroderma benhamiae* (*Trichophyton* sp.)

Trichophyton sp. anamorph of *Arthroderma benhamiae* is an emerging agent of dermatophytoses. During the period from 1. 1. 2012 to 31. 12. 2013 this zoophilic dermatophyte was isolated from 25 patients in the laboratory of the Clinic of Dermatology and Venereology. The identification of the species was confirmed by molecular methods. Clinical data and therapeutic outcome were available for 15 patients, 12 of them were children aged 2–10 years, only 3 were adults. Guinea pigs were the source of the infection in 9 cases, other rodents in 2 cases. In 3 cases infection from a dog was also possible. The incubation period ranged from 3 to 4 weeks. The clinical appearance of the lesions showed no particular difference from other infections by zoophilic dermatophytes, with the exception of green fluorescence in Wood's light which is otherwise characteristic for *Microsporum* (not *Trichophyton*) lesions. Naftifine or ciclopiroxolamine were effective in topical therapy of the lesions on the glabrous skin, whereas topical clotrimazole was ineffective. Scalp lesions healed after 4–8 weeks of oral terbinafine.

Key words: dermatophytoses – *Arthroderma benhamiae* – diagnosis – therapy

Čes-slov Derm, 89, 2014, No. 4, p. 192–198

ÚVOD

Do roku 1999 jsme byli zvyklí, že komplex *Trichophyton mentagrophytes* se dělil na řadu variet, z nichž jedna (*T. mentagrophytes* var. *interdigitale*) byla čistě antropofilní, další (*T. mentagrophytes* var. *mentagrophytes*, *T. mentagrophytes* var. *asteroides*, *T. mentagrophytes* var. *granulosum*, *T. mentagrophytes* var. *quinckeanum*, *T. mentagrophytes* var. *erinacei*, *T. mentagrophytes* var. *nodulare*, aj.) byly zoofilní. Dále bylo všeobecně přijímáno, že k této nepohlavní (anamorfní, imperfektní) formě, pojmenované *T. mentagrophytes*, existují dvě formy pohlavní (teleomorfní, per-

fektní), které dostaly v minulosti jména *Arthroderma benhamiae* a *Arthroderma vanbreuseghemii* [2].

Původní materiál (použitý původním autorem k popisu druhu) se od většiny dobře známých druhů dermatofyt, včetně *T. mentagrophytes*, nezachoval a bylo nutné nově ustanovit vhodný typový materiál, podle kterého by se mohla taxonomie řídit. V roce 1999 byl takto ustanoven nový typový materiál (neotyp) pro většinu klinicky významných druhů [4]. Podle nového konceptu není *T. mentagrophytes* příbuzný ani s jedním ze svých domnělých pohlavních stadií, tedy ani s *A. benhamiae*, ani s *A. vanbreuseghemii* (nejblíže má k *T. simii* a *T. schoenleinii* – už Sabouraud zařadil *Achorion quinckeanum* do stejného ro-

du s *Achorion schoenleinii*) [4, 5, 14]. Z některých variet se staly samostatné druhy, např. *T. erinacei* a *T. interdigitale* (druhý zmíněný druh má kmeny jak antropofilní, tak zoofilní, které se do značné míry liší morfologicky, hostitelskými preferencemi a klinickou manifestací). Zoofilní kmeny *T. interdigitale* podle dnešního pojetí odpovídají morfologicky i klinickou manifestací infekcí izolátům, které byly dříve označovány jako *T. mentagrophytes* [5, 14], ten je dnes klinicky takřka bezvýznamným druhem. *Arthroderma vanbreuseghemii* je druh považovaný za velmi blízký, ne-li identický druh s *T. interdigitale* [5, 14, 17]. *Arthroderma benhamiae* je také samostatný druh, jméno pro nepohlavní stadium ale po jejím odloučení od *T. mentagrophytes* dosud nebylo vytvořeno, a tak je tento druh nazýván jako „*Trichophyton* sp. anamorfa od *A. benhamiae*“, nebo jen „*A. benhamiae*“ [5, 14, 18].

V období od 1. 1. 2012 do 31. 12. 2013 jsme v mykologické laboratoři Dermatovenerologické kliniky 1. LF UK a VFN v Praze zachytili celkem 25 pacientů infikovaných tímto druhem. Z toho 15 pacientů se na naší klinice i léčilo, takže se můžeme podělit o zkušenosti s diagnostikou a léčbou infekcí vyvolaných *A. benhamiae*.

MATERIÁL A METODY

Soubor pacientů

Soubor pacientů léčených na klinice zahrnoval 15 pacientů, 5 mužského a 10 ženského pohlaví ve věku 2–76 let. Šlo o děti staré 2–10 let a tři dospělé ženy ve věku 30, 65 a 76 let.

Vyšetření

Vedle běžné anamnézy a aspexe byli čtyři pacienti vyšetřeni také ve Woodově světle. Ode všech pacientů byly odebrány šupiny nebo vlasy na mykologické vyšetření. Pro mikroskopické vyšetření byl zhotoven louhový preparát s 20% KOH. Další část materiálu byla určena ke kultivaci.

Kultivace, morfologie a uchovávání izolátů

Část materiálu byla přímo při odběru naočkována na Sabouraudův glukózový agar s chloramfenikolem (SGAC; Sabouraud Chloramphenicol Agar, Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France). Kultivace probíhala při pokojové teplotě po dobu 3 týdnů. Druhová identifikace probíhala na základě makromorfologických a mikromorfologických charakteristik a později byla potvrzena molekulárně genetickými metodami. U izolátu od pacienta č. 15 byla vyzkoušena diferenciací na chromogenním agaru (CandiSelect 4, Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) navrhovaná Maysereem et al. [13].

Kultivace za účelem popisu makromorfologie kolonií probíhala při 25 °C ve tmě na následujících médiích: Sabouraudův glukózový agar s chloramfenikolem a cykloheximidem (SGACC; TRIOS, Praha, ČR), Sabouraudův glukózový agar (SGA; Himedia, Milano, Itálie), malt extrakt agar (MEA; Oxoid, Basingstoke, UK) a Takashio médium (TAK; 1 g peptonu, 2 g glukózy, 1 g MgSO₄ × 7 H₂O, 1 g KH₂PO₄ a 20 g agaru a 1 litr destilované vody).

Mikromorfologie byla sledována na MEA. Většina izolátů zkoumaných v této studii byla uložena do Sbírký kultur hub (CCF; Culture Collection of Fungi) na katedře botaniky Přírodovědecké fakulty University Karlovy v Praze.

Molekulárně genetické metody

DNA byla izolována ze 7–14 dní starých kultur za použití komerčního kitu ArchivePure DNA yeast and Gram2+ kit (5 PRIME Inc., Gaithersburg, Maryland) podle pokynů výrobce, ale s modifikovanými časy inkubace („lytic enzyme solution“, 2 h, 37 °C; „cell lysis solution“, 4 h, 64 °C). Izoláty byly identifikovány na základě vzoru proužků získaného metodou PCR-fingerprintingu s primerem M13-core (5'-GAGGGTGGCGGTTCT) podle dříve popsané metodiky [7] a následovalo porovnání tohoto vzoru s izolátem dříve určeným na základě ITS rDNA sekvence. U části izolátů byla provedena sekvenace ITS oblasti rDNA za použití primerů ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG) a ITS4S (5'-CCTCCGCTTATTGATATGCTTAAG). Úsek byl namnožen primery za podmínek popsaných dříve [8]. Oba koncové primery byly použité k sekvenaci. Tyto izoláty byly identifikovány na základě shody ITS sekvence s ex-typovým kmenem *A. benhamiae* CBS 623.66 (Z98015) při použití serveru BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Sekvence reprezentativního kmenu CCF 4800 byla uložena do EMBL databáze (European Molecular Biology Laboratory) pod přístupovým číslem LK054798.

Terapie

První volbou byla léčba lokální, při postižení kůže nebo při nedostatečném účinku lokálních antimykotik byla nasazena perorální terapie terbinafinem v dávce 125 mg/den u dětí, 250 mg/den u dospělých. Před léčbou a po 4 týdnech léčby byly vyšetřeny jaterní testy.

VÝSLEDKY

Klinické vyšetření

Klinické údaje o pacientech jsou shrnuty v tabulce 1. Dvanáct pacientů mělo léze jen na hladké kůži, dva na kůži i ve kštici, jeden pouze ve kštici. U 5 pacientů byl postižen obličej. Léze ve kštici nabyly ve dvou případech formu kerionu (obr. 1). Ložiska na hladké kůži byla erytematoskvamózní s infiltrovaným, živě červeným lemem. Ve dvou případech jsme na lemu pozorovali pustuly, v jednom vezikuly (obr. 2). Fluorescence lézí ve Woodově světle byla pozitivní u 3 ze 4 vyšetřovaných případů. Při pátrání po predispozičních faktorech jsme u všech tří dospělých pacientek zjistili, že trpěly chronickou dermatózou léčenou intermitentně kortikoidními externy (pacient č. 2 dermatitis seborrhoica capillitii, č. 4 eczema nummular, č. 8 lichen ruber planus). Z 12 dětí byly 4 atopické, což je jen lehce nad hranici udávaného výskytu atopie v běžné populaci (25–30 %).

Epidemiologické šetření

V devíti případech bylo zdrojem infekce morče, ve 2 případech byli v rodině ještě další hlodavci. Ve 2 přípa-

Tabulka 1. Klinické a epidemiologické údaje o pacientech infikovaných *Arthroderma benhamiae*

Pořadové číslo	Vzorek	Pohlaví	Věk	Lokalizace	Klinický obraz	Zdroj	Predispozice
1	CCF 4847	žena	9	předloktí	erytém, krusty	nezjišťován	žádná
2	CCF 4848	žena	76	obličej, kštice, předloktí	erytém, infiltrace okrajů, kerion	morče	dermatitis seborrhoica
3	CCF 4849	muž	8	obličej	erytém, skvamy	morče	atopie
4	CCF 4850	žena	30	stehno	erytém, krusty, pustuly	morče	eczema nummulare
5	CCF 4851	žena	9	hrudník, záda	erytém, infiltrace okrajů	různí hlodavci, pes	žádná
6	CCF 4852	žena	6	obličej	erytém, pustuly	morče	atopie
7	CCF 4853	muž	6	krk, záda	erytém, skvamy	babička? pes?	žádná
8	SK 317	žena	65	ruka	erytém, papuly	neudává	lichen planus
9	CCF 4854	muž	4	obličej, kštice, břicho	erytém, infiltrace okrajů, skvamy	morče	žádná
10	SK 337	žena	6	šíje	erytém, infiltrace okrajů	morče	atopie
11	SK 813	žena	10	obličej, záda	erytém, skvamy	morče	žádná
12	SK 2533	žena	8	hrudník	erytém, infiltrace okrajů, skvamy	nezjišťován	žádná
13	CCF 4855	muž	10	hrudník	erytém, infiltrace okrajů, skvamy, vesikuly	morče, křeček, pes	žádná
14	CCF 4800	muž	6	kštice	kerion	pes?	žádné
15	CCF 4856	žena	2	předloktí	erytém, infiltrace okrajů, skvamy	morče	atopik



Obr. 1. Tinea capitis vyvolaná *A. benhamiae* (kerion Celsi)

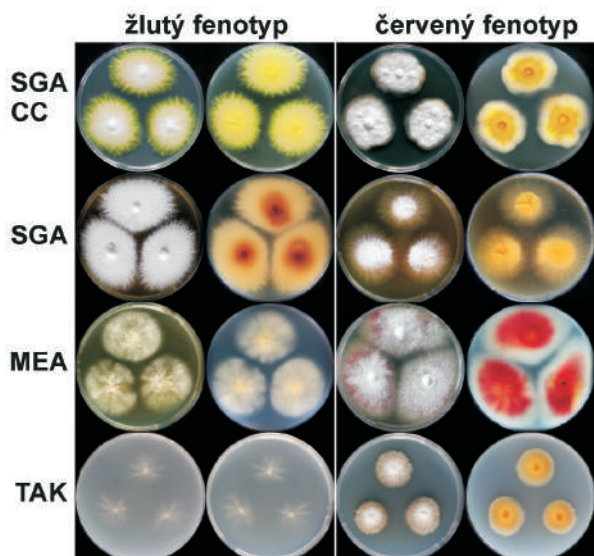


Obr. 2. Tinea faciei vyvolaná *A. benhamiae*

dech mohl být zdrojem infekce i pes, laboratorně jsme si to však nemohli ověřit. U pacienta č. 7 přichází v úvahu pes jako jediný známý zdroj – asi 3 týdny před propuknutím nemoci byla v rodině na návštěvě babička se psem, kterého si měsíc předtím pořídila z útulku. Babička měla rovněž erytematoskvamózní lézi na bradě. Interhumánní přenos v rodinách jsme nepozorovali. Ve 2 případech bylo možno z anamnézy stanovit i inkubační dobu – 3 až 4 týdny.

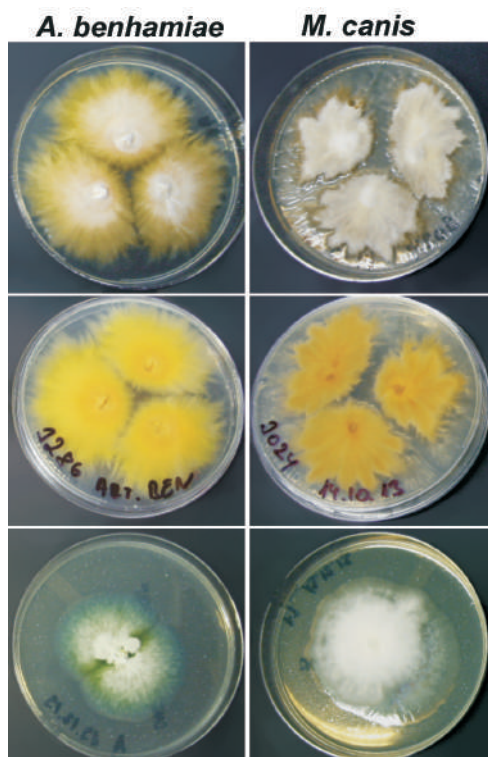
Morfologie

Mezi izoláty *A. benhamiae* se dají rozeznat dvě velmi odlišné fenotypové varianty, které jsou v literatuře nazývány jako žlutý a červený (případně bílý) fenotyp [11, 18]. Názvy pramení z produkce žlutého nebo červeného pigmentu. Rozdílné pigmenty mohou být u obou fenotypů současně pozorovány na MEA, žlutý pigment je nejvýraznější na SGAC nebo na SGACC (obr. 3). Obě varianty se podstatně liší ve svém makroskopickém vzhledu na všech

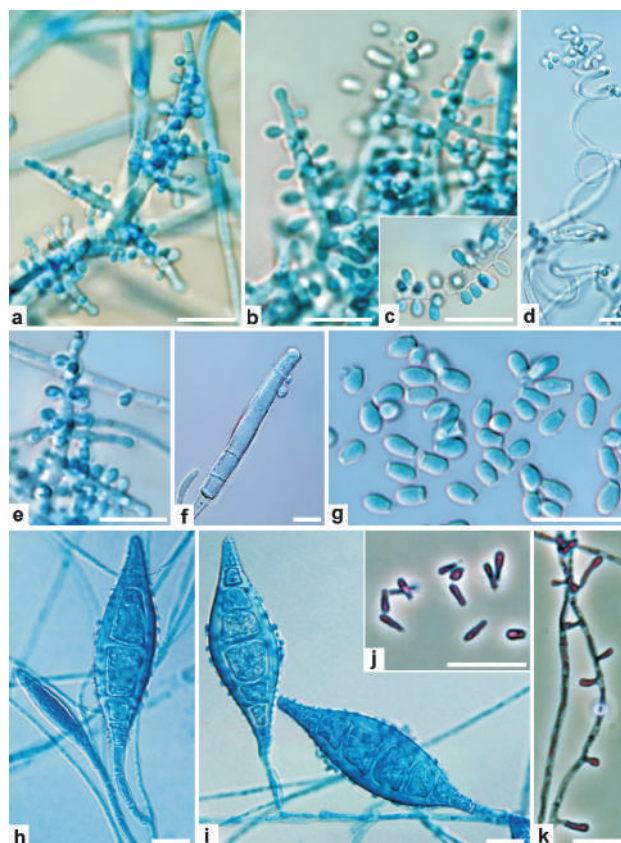


Obr. 3. Kolonie žlutého a červeného fenotypu *A. benhamiae* po 3 týdnech kultivace při 25 °C na různých médiích SGACC, Sabouraudův glukózový agar s chloramfenikolem a cykloheximidem; SGA, Sabouraudův glukózový agar; MEA, malt extrakt agar; TAK, Takashio médium.

zkoumaných médiích (viz obr. 3). Zatím nebyl popsán, a ani my jsme nezaznamenali, žádný vztah mezi fenotypem a genotypem ITS rDNA. Oba fenotypy mají i identický profil proužků při PCR-fingerprintingu s M13-core



Obr. 4. Srovnání kolonií *M. canis* a *A. benhamiae* První řada: kolonie na Sabouraudově glukózovém agaru s chloramfenikolem po 3 týdnech kultivace při 25 °C; druhá řada: reverz kolonií; třetí řada: zabarvení na chromogenním agaru Candiselect 4.



Obr. 5. Mikromorfologie *A. benhamiae* (a–g) a *M. canis* (h–k) *A. benhamiae*: (a–c, e) konidiofory, (d) spirální vlákna, (f) makrokonidie, (g) mikrokonidie. *M. canis*: (h–i) makrokonidie, (j) mikrokonidie, (k) konidiofor nesoucí mikrokonidie.

primerem. Mezi českými pacienty je zastoupený s výraznou převahou žlutý fenotyp (zhruba 4–5 : 1).

Třítýdenní kolonie žlutého fenotypu na SGAC a na SGACC jsou ploché, v centru chmýřité, bílé, na okraji roste kolonie převážně pod povrchem agaru a je žlutá s paprscitým okrajem, spodní strana je zářivě žlutá až zlatožlutá (viz obr. 3 a 4). Makromorfologie může silně připomínat *Microsporum canis* (obr. 4). Morfologie kolonií na SGA bez přidaných antibiotik se podstatně mění a kolonie jsou u obou fenotypů bělavé a výrazně granulární (viz obr. 3). Kolonie na MEA jsou bílé, jemně až hrubě granulární, spodní strana je žlutě, nebo červeně zabarvená. Na Takashio médiu rostou oba fenotypy velmi odlišně, žlutý fenotyp roste paprscitě a převážně pod povrchem agaru, kdežto kolonie červeného fenotypu jsou granulární (viz obr. 3). Na agaru CandiSelect 4 jsme po 3 dnech pozorovali stopy modrého zbarvení na spodině kolonie *A. benhamiae*, po týdnu je rozdíl oproti *M. canis* naprosto zřetelný. Kolonie *A. benhamiae* je světle modrá, kolonie *M. canis* zůstává bílá (viz obr. 4).

V mikrokultuře jsou patrné četné kulaté, kapkovité, hruškovité, z menší části též cylindrické mikrokonidie (obr. 5g) uspořádané hroznovitě na spoje větvených konidioforech. Terminální hyfy konidioforů se zužují a působí zašpičatělým vzhledem (obr. 5a,b,e), na vrcholu každé takové větve bývá terminální konidie. V kultuře jsou pří-

Tabulka 2. Výsledky lokální léčby

Pacient	Věk	Klinický obraz	Lokalizace	Lék	Zhojení	Poznámka
2	76	erytém, infiltrace okrajů	obličej, předloktí, kštica	ekonazol	za 5 týdnů	kůže zhojena, kštica kerion
3	8	erytém, skvamy	obličej	ciklopiroxolamin	za 6 týdnů	klotrimazol bez efektu
6	6	erytém, pustuly	obličej	naftifin	za 3 týdny	
7	6	erytém, skvamy	krk, záda	ciklopiroxolamin	za 10 týdnů	
8	65	erytém, papuly	ruka	ciklopiroxolamin	za 6 týdnů	
10	6	erytém, infiltrace okrajů	šije	ciklopiroxolamin	za 8 týdnů	
11	10	erytém, skvamy	obličej, záda	naftifin	za 2 týdny	záda zhojena, obličej nikoli
13	10	erytém, infiltrace okrajů, skvamy, vezikuly	hrudník	ciklopiroxolamin	za 5 týdnů	
15	2	erytém, infiltrace okrajů, skvamy	předloktí	ciklopiroxolamin	za 7 týdnů	

Tabulka 3. Výsledky perorální léčby

Pacient	Věk	Klinický obraz	Lokalizace	Lék	Efekt	Poznámka
1	9	erytém, krusty	předloktí	TER 1 týden 125 mg/d	po 8 týdnech zhojena	TER po týdnu vysazen pro NÚ
2	76	erytém, infiltrace okrajů, kerion	kštica	TER 4 týdny 250 mg/d	po 4 týdnech zhojena	
4	30	erytém, krusty, pustuly	stehno	TER 2 týdny 250 mg/d	po 8 týdnech zhojena	mykid?, exantém?
5	9	erytém, infiltrace okrajů	hrudník, záda	TER 8 týdnů 125 mg/d	po 8 týdnech zhojena	klotrimazol bez efektu, mykid
9	4	erytém, infiltrace okrajů, skvamy	obličej, kštica, břicho	TER 8 týdnů 125 mg/d	po 8 týdnech zhojena	
11	10	erytém, skvamy	obličej	TER 2 týdny 250 mg/d	po 3 týdnech zhojena	
14	6	kerion	kštica	TER 8 týdnů 125 mg/d	po 8 týdnech zhojen	reziduální alopecie

Vysvětlivky: TER = terbinafin, NÚ = nežádoucí účinky

tomna i spirální vlákna (obr. 5d) a u některých kmenů také doutníkovité makrokonidie s tenkou hladkou stěnou (obr. 5f). Naproti tomu většina kmenů *M. canis* produkuje velké množství vřetenovitých, tlustostěnných, bradavčitých makrokonidií (obr. 5h,i), mikrokonidie jsou produkovány obvykle v menších množstvích, jsou přisedlé na nediferencovaných hyfách (konidioforech) a protáhlejší (obr. 5j,k) než u *A. benhamiae*.

Terapie

Výsledky lokální léčby jsou shrnuty v tabulce 2. Většina pacientů byla léčena 2% ciklopiroxolaminem, ke zhojení došlo po 5–10 týdnech. Rychlejší hojení bylo pozorováno u dvou pacientů léčených 1% naftifinem – 2–3 týdny. Za povšimnutí stojí, že pacienti č. 3 a 5 byli ještě před mykologickým vyšetřením léčeni 1% klotrimazolem. Klotrimazol nejenže neнавodil hojení, ale ani neovlivnil životaschopnost *A. benhamiae* při kultivaci.

Výsledky celkové léčby terbinafinem jsou shrnuty v tabulce 3. Doba podávání byla u ložisek na hladké kůži 1–2 týdny, u jedné pacientky 8 týdnů, ke klinickému zhojení kožních lézí došlo po 3–8 týdnech. Při postižení kštica byl terbinafin podáván 4–8 týdnů, ke klinickému zhojení došlo po 4–8 týdnech. Zvýšení jaterních testů nebylo pozorováno. U pacientky č. 1 musel být terbinafin vysazen po týdnu pro bolesti hlavy. Tato pacientka byla však ještě 4

měsíce po vysazení terbinafinu opakovaně vyšetřována na neurologii pro chronickou cefaleu, souvislost s terbinafinem je proto nejasná. U pacientky č. 4 se po 10 dnech užívání terbinafinu objevil svědivý výsev charakteru pityriasis rosea. Přetrvával i po ukončení léčby a po zhojení mykózy, kdy plynule přešel do podoby numulárního ekzému, kterým pacientka trpěla již před mykózou. Z kliniky nevyplývá, zda šlo o lékový exantém nebo o mykid. Pacientka č. 5. měla makulozní mykid na pažích, dlaních a ploskách ještě před nasazením léčby.

DISKUSE

Arthroderma benhamiae je pro klinické mykology u nás novým druhem. Přitom chov morčat má v ČR dlouhou tradici a druh *A. benhamiae* byl mezi morčaty u nás v minulosti dokumentován [6], ale jeho izolace z lidského klinického materiálu je zcela nová a v ČR zatím nepublikovaná. V našich kulturách se první žlutě pigmentující izoláty, které makroskopicky vypadaly jako *M. canis*, ale infekce byla získána od morčete, začaly objevovat v roce 2011.

Zprávy o vysokém výskytu zoonózy způsobené *A. benhamiae* přichází zejména z Německa [12]. Časovou ohraničenost výskytu zoonózy v Evropě dobře dokumentuje

Tabulka 4. Shody a rozdíly mezi *Arthroderma benhamiae* a *Microsporium canis*

Znak	<i>Microsporium canis</i>	<i>Arthroderma benhamiae</i>
Fluorescence lézí ve Woodově světle	ano	ano
Zdroj infekce	kočka, pes	morče, králík, činčila, (pes)
Žlutý pigment na spodině kolonií (SGAC+chl., nebo SGACC+chl.+cyc.)	ano	ano (většina kmenů; červený fenotyp ne)
Makrokonidie	vřetenovité, s hrubou a tlustou stěnou; většinou hojně	doutníkovité (cyklindrické), hladké; jen zřídka
Mikrokonidie	hlavně cyklindrické a kyjovité; poměrně málo	kapkovité, méně často cyklindrické; velmi hojně
Konidiofory (s mikrokonidii)	mikrokonidie přisedlé na nediferencovaných hyfách	slabě větvené, konidie hroznovitě uspořádané, terminální větve se zužují k vrcholu
Spirální vlákna	ne	ano
Zabarvení na Candiselect agar 4	bezbarvé nebo fialové	tyrkysově modré

popis vůbec prvního případů ve Švýcarsku v roce 2004 [3]. Velmi pečlivé epidemiologické studie z Japonska [19] ukazují, že v této zemi v roce 1980 nebyla *A. benhamiae* ještě přítomna. Poprvé byl druh *A. benhamiae* v Japonsku popsán u králíka v roce 1997 [9], v návaznosti na to se objevily i první případy tinea corporis u lidí [10]. Jako zdroj infekce se v německé literatuře uvádějí morčata, v japonské hlavně králíci [1, 10, 15]. V našem souboru se jako možné zdroje objevili i psi. Nejnovější veterinární studie zjistila, že u psů s dermatofytózou se *A. benhamiae* nachází poměrně často [16]. Většinou jde o psy loveckých plemen, kteří se často pohybují venku.

Braun et al. [1] se zmiňují o tom, že *A. benhamiae* může být v kultuře snadno zaměněna za jiné žlutě pigmentující druhy dermatofyt – *M. canis* nebo *T. erinacei*. K záměně s *M. canis* může přispět i skutečnost, že léze fluoreskují ve Woodově světle. K odlišení od *M. canis* je třeba hodnotit nejen makroskopický vzhled, ale ověřit si i mikroskopický obraz kultury. Naštěstí většina kmenů *A. benhamiae* ochotně sporuluje už v primokultuře. U nesporelujících kmenů nastává problém, protože ověření identifikace molekulárními metodami není u nás v dermatomykologii běžná praxe. Jako slibná a pro rutinní laboratoř dostupná metoda se jeví diferenciací na chromogenním agaru CandiSelect 4, kde se *A. benhamiae* barví tyrkysově modře, kdežto *M. canis* se barví růžově až fialově [13]. Shody a rozdíly mezi *A. benhamiae* a *M. canis* jsou shrnuty v tabulce 4.

Správná identifikace původce není důležitá jen z hlediska epidemiologického, ale i z hlediska terapeutického. Podle německých autorů je druh *M. canis* málo citlivý na terbinafin a doporučují k léčbě spíše griseofulvin, flukonazol nebo itraconazol, kdežto pro léčbu infekcí *A. benhamiae* doporučují terbinafin v kombinaci s externí aplikací ciklopiroxolaminu [1]. U nás je k léčbě tinea capitis u dětí povolen pouze terbinafin, takže možnost volby odpadá. V našem souboru byl terbinafin podáván po dobu 1–2 týdnů u infekcí hladké kůže, po dobu 4–8 týdnů u infekce kštice. U pacientů jsme ale pozorovali rozdíly v délce léčby u antimykotických extern v rozmezí 5–8 týdnů při aplikaci ciklopiroxolaminu, kdežto jen 2–3 týdny při aplikaci naftifinu.

Klotrimazol aplikovaný u dvou pacientů ještě před mykologickým vyšetřením byl zjevně neúčinný.

Léze na hladké kůži nebyly mimořádně zánětlivé ve srovnání s infekcemi *M. canis* nebo *T. interdigitale*. Ve kštici však *A. benhamiae* vyvolává často silně zánětlivé keriony [1, 15] (viz obr. 1). Na rozdíl od mikrosporíe, kde ložiska prakticky vždy zarůstají *ad integrum*, se po infekci *A. benhamiae* může objevit jizevnatá alopecie [15], v našem souboru u pacienta č. 14. Včasná stanovení správné diagnózy a původce je tedy důležité i jako prevence trvalých následků. V průběhu infekce jsme pozorovali výskyt mykoidu, který může být těžko odlišitelný od lékového exantému.

Závěrem lze shrnout důležitá fakta:

1. *A. benhamiae* může být v laboratoři snadno zaměněna za *M. canis*.
2. Zdrojem infekce je zpravidla morče, ale může jím být i králík, činčila, nebo pes.
3. Léze fluoreskují ve Woodově světle žlutozeleně.
4. Na hladké kůži klinický obraz odpovídá běžné tinea corporis, ve kštici je tendence k tvorbě kerionů.
5. K lokální léčbě doporučujeme naftifin nebo ciklopiroxolamin; klotrimazol je zřejmě neúčinný.
6. U kerionu je potřeba celková terapie terbinafinem v délce 4–8 týdnů.

LITERATURA

1. BRAUN, S., JAHN, K., WESTERMANN, A., BRUCHGERHARZ, D., REIFENBERGER, P. D. J. Tinea barbae profunda durch *Arthroderma benhamiae*. *Hautarzt*, 2013, 64, p. 720–722.
2. FRAGNER, P., HEJTMÁNEK, M. *Určování dermatofytů*. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 1990, 190 p.
3. FUMEAUX, J., MOCK, M., NINET, B., et al. First report of *Arthroderma benhamiae* in Switzerland. *Dermatology*, 2004, 208, p. 244–250.
4. GRÄSER, Y., KUIJPERS, A. F. A., PRESBER, W., DE HOOG, G. S. Molecular taxonomy of *Trichophyton mentagrophytes* and *T. tonsurans*. *Med. Mycol.*, 1999, 37, p. 315–330.

5. GRÄSER, Y., SCOTT, J., SUMMERBELL, R. The new species concept in dermatophytes – a polyphasic approach. *Mycopathologia*, 2008, 166, p. 239–256.
6. HEJTMÁNEK, M., HEJTMÁNKOVÁ, N. Hybridization and sexual stimulation in *Trichophyton mentagrophytes*. *Folia Microbiol.*, 1989, 34, p. 77–79.
7. HUBKA, V., KOLAŘÍK, M. β -tubulin paralogue *tubC* is frequently misidentified as the *benA* gene in *Aspergillus* section *Nigri* taxonomy: primer specificity testing and taxonomic consequences. *Persoonia*, 2012, 29, p. 1–10.
8. HUBKA, V., KUBATOVA, A., MALLATOVA, N. et al. Rare and new aetiological agents revealed among 178 clinical *Aspergillus* strains obtained from Czech patients and characterised by molecular sequencing. *Med. Mycol.*, 2012, 50, p. 601–610.
9. KANO, R., NAKAMURA, Y., YASUDA, K., et al. The first isolation of *Arthroderma benhamiae* in Japan. *Microbiol. Immunol.*, 1998, 42, p. 575–578.
10. KAWASAKI, M., ASO, M., INOUE, T., et al. Two cases of tinea corporis by infection from a rabbit with *Arthroderma benhamiae*. *Jap. J. Med. Mycol.*, 1999, 41, p. 263–267.
11. KAWASAKI, M., ANZAWA, K., TAKEDA, K., et al. Genetic and phenotypic variations among F1 progenies of *Arthroderma benhamiae*. *Jap. J. Med. Mycol.*, 2008, 49, p. 103–110.
12. KRAEMER, A., HEIN, J., HEUSINGER, A., MUELLER, R. Clinical signs, therapy and zoonotic risk of pet guinea pigs with dermatophytosis. *Mycoses*, 2013, 56, p. 168–172.
13. MAYSER, P., BUDIARDJA, D. A simple and rapid method to differentiate *Arthroderma benhamiae* from *Microsporum canis*. *J. Dtsch. Dermatol. Ges.*, 2013, 11, p. 322–327.
14. NENOFF, P., HERRMANN, J., GRÄSER, Y. *Trichophyton mentagrophytes sive interdigitale*? A dermatophyte in the course of time. *J. Dtsch. Dermatol. Ges.*, 2007, 5, p. 198–202.
15. NENOFF, P., SCHULZE, I., UHRLASS, S., KRÜGER, C. Kerion Celsi durch den zoophilen Dermatophyten *Trichophyton* species von *Arthroderma benhamiae* bei einem Kind. *Hautarzt*, 2013, 64, p. 846–850.
16. SIEKLUCKI, U., OH, S. H., HOYER, L. L. Frequent isolation of *Arthroderma benhamiae* from dogs with dermatophytosis. *Vet. Dermatol.*, 2014, 25, p. 39–41.
17. SYMOENS, F., JOUSSON, O., PLANARD, C., et al. Molecular analysis and mating behaviour of the *Trichophyton mentagrophytes* species complex. *Int. J. Med. Microbiol.*, 2011, 301, p. 260–266.
18. SYMOENS, F., JOUSSON, O., PACKEU, A., et al. The dermatophyte species *Arthroderma benhamiae*: intraspecies variability and mating behaviour. *J. Med. Microbiol.*, 2013, 62, p. 377–385.
19. TAKEDA, K., NISHIBU, A., ANZAWA, K., MOCHIZUKI, T. Molecular epidemiology of a major subgroup of *Arthroderma benhamiae* isolated in Japan by restriction fragment length polymorphism analysis of the non-transcribed spacer region of ribosomal RNA gene. *Jpn. J. Infect. Dis.*, 2012, 65, p. 233–239.

Poděkování: Molekulárně genetická část byla podpořena projektem GAUK1344214.

Do redakce došlo dne 16. 7. 2014.

Adresa pro korespondenci:
 Doc. MUDr. Magdalena Skořepová, CSc.
 Dermatovenerologická klinika I. LF UK a VFN v Praze
 U Nemocnice 2
 128 08 Praha 2
 e-mail: mykologie.vfn@seznam.cz

Článek 4

Současný vývoj v taxonomii dermatofytů a doporučení pro pojmenovávání klinicky významných druhů

Hubka V.^{1,2}, Čmoková A.¹, Skořepová M.³, Mallátová N.⁴, Dobiášová S.⁵, Lysková P.⁶, Mencl K.⁷, Janouškovcová H.⁸, Buchta V.⁹, Větrovský T.¹⁰, Kolařík M.^{1,2}

¹Katedra botaniky, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova v Praze
vedoucí katedry doc. RNDr. Yvonne Němcová, Ph.D.

²Laboratoř genetiky a metabolismu hub, Mikrobiologický ústav, Akademie věd České republiky, v. v. i., Praha,
vedoucí laboratoře Mgr. Miroslav Kolařík, Ph.D.

³Centrum pro dermatomykózy, Dermatovenerologická klinika 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy
a Všeobecné fakultní nemocnice v Praze, přednosta kliniky prof. MUDr. Jiří Štork, CSc.

⁴Pracoviště parazitologie a mykologie, Centrální laboratoře Nemocnice České Budějovice, a. s., České Budějovice
ředitel nemocnice MUDr. Břetislav. Šhon

⁵Oddělení bakteriologie a mykologie, Centrum klinických laboratoří, Zdravotní ústav se sídlem v Ostravě
vedoucí oddělení RNDr. Vladislav Holec

⁶Laboratoř lékařské mykologie, oddělení parazitologie, mykologie a mykobakteriologie Praha,
Zdravotní ústav se sídlem v Ústí nad Labem, Praha, vedoucí oddělení RNDr. Zuzana Hůzová

⁷Oddělení klinické mikrobiologie, Pardubická krajská nemocnice, a. s., Pardubice
primář oddělení MUDr. et Mgr. Eva Zálabská, Ph.D.

⁸Ústav mikrobiologie, Fakultní nemocnice Plzeň, přednosta ústavu RNDr. Karel Fajfrlík Ph.D.

⁹Ústav klinické mikrobiologie Fakultní nemocnice a Lékařské fakulty Univerzity Karlovy, Hradec Králové
přednosta ústavu doc. RNDr. Vladimír Buchta, CSc.

¹⁰Laboratoř environmentální mikrobiologie, Mikrobiologický ústav, Akademie věd České republiky, v. v. i., Praha
vedoucí laboratoře RNDr. Petr Baldrian, Ph.D.

SOUHRN

Taxonomie dermatofytů prošla v minulosti řadou výrazných změn a nikdy nebyla příliš stabilní. Poslední rozsáhlejší změny proběhly v souvislosti s revizí skupiny molekulárně genetickými metodami. Hlavním cílem této práce je seznámit čtenáře s pokroky v taxonomii dermatofytů a prostřednictvím seznamu doporučených jmen sjednotit pojmenovávání druhů napříč českými pracovišti. To by mělo nejen usnadnit komunikaci, ale také porovnávání výsledků se zahraniční literaturou. Jedním z doporučení je například ukončení používání jména *Trichophyton mentagrophytes* v klinické praxi. V úvodu textu se diskutuje o problematickém konceptu druhu u dermatofytů, jehož rozdílná aplikace může mít velký vliv na počet uznávaných druhů. Závěrečná část je věnována budoucím změnám souvisejícím s novým vydáním Mezinárodního kódu nomenklatury řas, hub a rostlin. Jedná se především o ukončení duální nomenklatury hub a vybrání jediného správného jména pro každý druh. Obecně se dá říci, že je vhodné preferovat jméno nepohlavního stadia (*Trichophyton*, *Microsporum*, *Epidermophyton*), s výjimkou případů, kde toto jméno není k dispozici (např. *Arthroderma benhamiae*).

Klíčová slova: *Arthroderma* – druhový koncept – fylogeneze – Mezinárodní nomenklatorický kód – jedna houba, jedno jméno – polyfázický přístup – *Trichophyton interdigitale* – *Trichophyton mentagrophytes*

SUMMARY

Recent Advances in Taxonomy of Dermatophytes and Recommendations for Using Names of Clinically Important Species

Taxonomy of dermatophytes has changed significantly in the past and it has never been stable.

Last extensive changes appeared after revision of the group by molecular genetic methods. This paper introduces the advances in taxonomy of dermatophytes and helps to unify the species names in use among the Czech laboratories to simplify their communication and comparison of the results with foreign literature. The complicated species concept of dermatophytes that might be applied differently and might influence the number of accepted species is discussed in the beginning. The last part is dedicated to future changes related to a new edition of the International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants namely to termination of a dual nomenclature of fungi and choosing the one correct name for each species.

Key words: *Arthroderma* – species concept – phylogeny – the International Code of Nomenclature – one fungus one name – polyphasic approach – *Trichophyton interdigitale* – *Trichophyton mentagrophytes*

Čes-slov Derm, 89, 2014, No. 4, p. 151–165

ÚVOD A HISTORICKÉ SOUVISLOSTI

Taxonomie dermatofytů byla od svých počátků ve středu zájmu mikrobiologů, protože se zabývá významnými původci povrchových infekcí člověka a zvířat. Jako dermatofyty se tradičně označují rody *Trichophyton*, *Microsporum* a *Epidermophyton*. Zmíněná rodová jména se v duálním názvosloví (pohlavní a nepohlavní stadium nese odlišné jméno) používají pro nepohlavní stadium (anamorfu). Pro pohlavní stadium (teleomorfu) je dnes všeobecně přijímáno rodové jméno *Arthroderma* [113]. V průběhu svého formování prošla taxonomie dermatofytů velkými změnami a nikdy nebyla příliš stabilní. Z velké části se na tom podílela morfologická variabilita některých druhů a neúspěšná snaha vymezit základní příbuzenské vztahy uvnitř skupiny, dokonce i na rodové úrovni, kde molekulární fylogeneze přináší jiné výsledky než morfologie [34]. Koncept druhu u dermatofytů měl vždy svá specifika, zejména díky zohlednění klinického a epidemiologického aspektu. Taxonomie je totiž stále tvořena především pro její uživatele, kterým záleží na stabilitě a srozumitelnosti.

Většina klinicky významných druhů dermatofytů byla popsána v poměrně dávné minulosti, kdy ještě neexistovala pravidla a doporučení pro popis druhů zakotvená v Mezinárodním kódu nomenklatury řas, hub a rostlin (dále jen Kód), poprvé uveřejněném v roce 1905. Řada dnes dobře známých jmen je podložených jen velmi stručným popisem bez obrazové a herbářové dokumentace. Popis některých druhů (zvláště jmen navržených kolem poloviny 19. století) nebyl navíc založen ani na kultuře houby, ale jen na klinickém obrazu a vzorku přímé mikroskopie z postiženého pacienta (např. *T. tonsurans*). Z těchto důvodů se často nezachoval žádný původní materiál, dokonce ani kresby znázorňující typické znaky rodů a druhů dermatofytů, jak je známe dnes. Velkým milníkem v taxonomii dermatofytů proto byla kultivace původců dermatomycóz na agarových médiích, s možností sledovat makro- a mikromorfologii subkultur [87], která byla základem dalšího rozvoje taxonomie této skupiny hub.

Pro dermatofyty bylo v minulosti navrženo více než 500 nadbytečných jmen (viz databáze MycoBank; www.mycobank.org), která dnes nejsou používána. Velká část z nich však byla opuštěna ještě před érou molekulární biologie. Kvůli neexistujícímu původnímu materiálu, bylo nutné při revizi dermatofytů stanovit pro velkou část druhů nový typový materiál (neotyp), který zafixoval používání jmen a zamezil jiným výkladům v budoucnosti [29, 30, 27]. Některá rozhodnutí o synonymizaci druhů na základě prvních molekulárně genetických studií byla ale ukvapená (např. synonymizace *T. equinum* a *T. tonsurans*) a podtrhují význam polyfázického přístupu, tj. nutnosti brát v úvahu výsledky několika nezávislých metod před učiněním definitivního rozhodnutí.

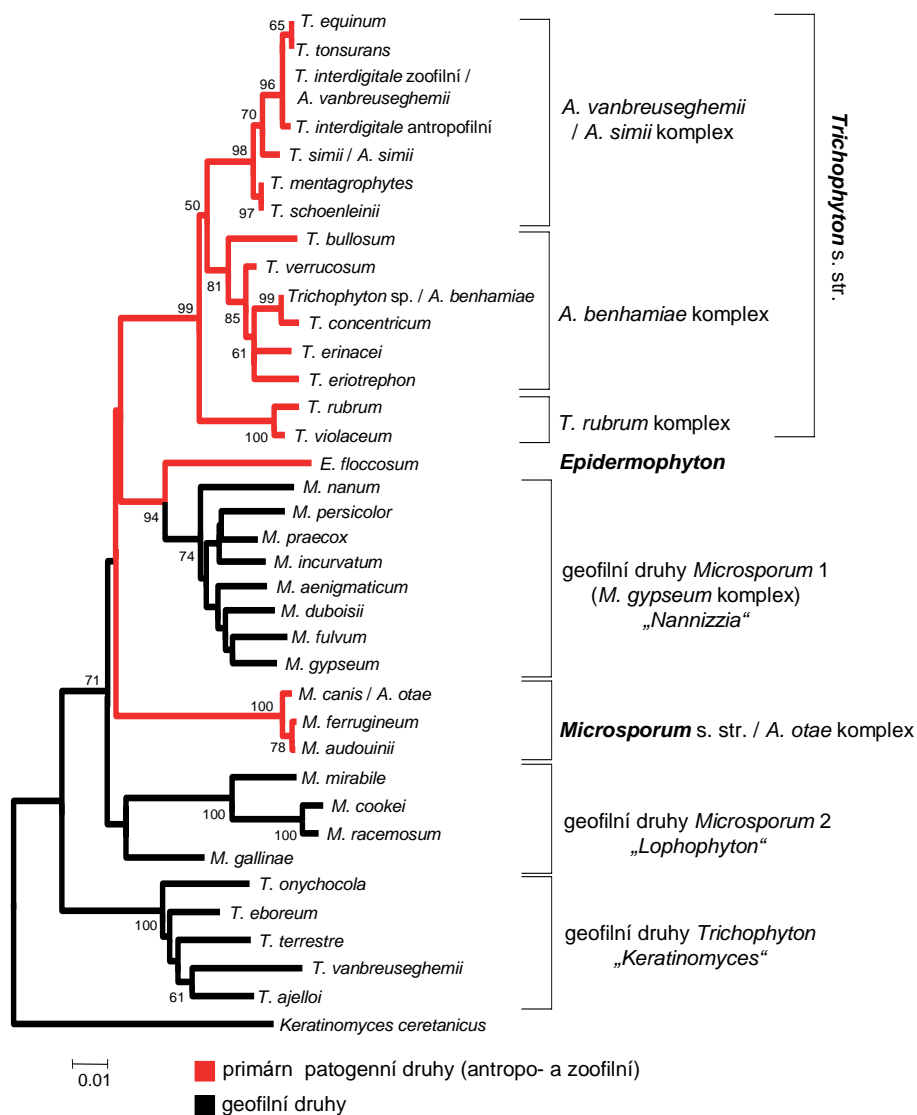
Navzdory tomu, jak je medicína konzervativním oborem, je třeba s určitým časovým odstupem reflektovat změny, které v taxonomii hub probíhají. U kontroverzních a rozsáhlých změn by měl být časový odstup dostatečný

(např. 10 let a více), aby byl dostatek času pro diskusi a obhájení změn ve vědecké a uživatelské komunitě, a nedocházelo tak k nadměrnému zatěžování uživatelů (např. klinických mikrobiologů) změnami. Většina zásadních taxonomických změn u dermatofytů byla učiněna již v letech 1999 a 2000. Tyto změny byly z velké části potvrzeny, zavrženy, či upřesněny v dalších nezávislých studiích, a mohou tedy být bez významnějšího rizika dalších brzkých změn začleněny do praxe. Stále ale existuje několik klinicky významných druhů, či druhových komplexů, kde zbývá taxonomické otázky dořešit. Velké změny v pojmenovávání druhů jsou nyní spojeny se zaváděním aktuálních pravidel uveřejněných v novém Kódu, které se dotkly nejcitlivěji právě hub [74]. Jde hlavně o ukončení používání duální nomenklatury a zvolení jediného platného jména, které v sobě obsáhne celý životní cyklus houby. Cílem této práce je shrnout vývoj v taxonomii dermatofytů během posledních zhruba dvou desetiletí a nastínit budoucí změny související se zaváděním jediného jména pro jednu houbu. Práce předkládá přehled v současnosti uznávaných jmen dermatofytů a sjednocuje jejich užívání napříč českými mykologickými a klinickými pracovišti, což by mělo přispět k jednoduššímu dorozumění a také snadnějšímu porovnání výsledků mezi publikacemi.

CO JE DRUH U DERMATOFYTŮ?

Definice druhu je jednou ze základních, ale zároveň nejvíce problematických otázek taxonomie dermatofytů a aplikace různých přístupů má velký dopad na počet uznávaných druhů. Pravděpodobný model evoluce dermatofytů předpokládá, že geofilní dermatofyty s rezervoárem v půdě jsou nejpůvodnější. Dlouhodobým kontaktem dermatofytů rozkládajících keratin v příbytcích živočichů s jejich obyvateli se vysvětluje adaptace těchto druhů na zvířecího hostitele (zoofilní dermatofyty) [26]. Pohlavní proces geofilních druhů a omezeného počtu zoofilních druhů probíhá často přímo v norách a hnízdech živočichů, kde je stálý dostatek keratinu [41, 109]. Dalším krokem ve vývoji dermatofytů, byla možnost přenosu zoofilních (převážně synantropních) druhů na člověka a jejich přizpůsobení se na člověka jako hlavního hostitele (antropofilní dermatofyty). Přejechod k parazitickému způsobu života u antropofilních a některých zoofilních druhů (hlavně patogenů domestikovaných zvířat), vedl ke ztrátě, nebo výraznému omezení pohlavního rozmnožování [32], protože druhy ztratily prostředí vhodné k pohlavnímu procesu, který nikdy nebyl prokázán přímo na živém hostiteli [109]. Tyto druhy se navíc vyvinuly v evolučně nedávné době, genetické mezidruhové rozdíly jsou často nevýrazné [32] a také reprodukční bariéra mezi některými druhy nemusí být ještě zcela vytvořena.

Morfologický koncept druhu zahrnující makro- a mikromorfologii kultur dal tradiční, ale hrubý základ systému dermatofytů, jak ho známe dnes [19]. Postupně byly přidávány různé fyziologické testy jako perforace vlasu [2], nutriční testy [23], ureázový test [81] a další [100]. Tyto testy dále zpřesnily rozlišení některých druhů, zároveň



Obr. 1. Fylogenetický strom znázorňující vztahy mezi klinicky významnými druhy dermatofytů

Větve s primárně patogenními druhy (zoo- a antropofilními) jsou zbarveny červeně, s geofilními druhy černě. Úvozovkami jsou označeny pravděpodobné změny rodových jmen v budoucnu. Strom byl konstruován na základě sekvencí ITS rDNA získaných z databáze GenBank podle přístupových čísel uveřejněných dříve [10, 34, 43]. Alignment byl vytvořen v programu MAFFT vs. 7 [58] za použití základního nastavení a FFT-NS-i strategie. Finální alignment obsahoval 666 pozic, 301 variabilních a 235 parsimonně informativních. Pro výpočet byla zvolena metoda Maximum Likelihood v programu MEGA6 [108], evoluční model TN93+G, 1000 bootstrapových výběrů, zobrazeny jsou jen statistické podpory větvi přesahující 50 % bootstrapové podpory. *Keratinomyces ceretanicus* byl použit jako outgroup.

však podpořily popsání některých nadbytečných druhů. Problematické jsou z hlediska tohoto konceptu atypické izoláty (nesporulující, s degenerovanou morfologií), které se u dermatofytů poměrně běžně vyskytují (v dnešní době často v souvislosti s léčbou předcházející odběru na kultivaci).

Ekologický koncept bere v úvahu především přirozený rezervoár druhů, a dělí tak dermatofyty na druhy geofilní a primárně patogenní (antropofilní a zoofilní) [24]. Zohlednění tohoto dělení je výhodné také pro klinickou praxi, kde již sama identifikace druhu napovídá o možných zdrojích infekce. Navíc ekologie mnohem lépe než morfologie odráží fylogenezi dermatofytů a druhy s obdobnou ekologií jsou až na výjimky fylogeneticky příbuz-

né (obr. 1) [34]. Spektrum hostitelů některých dermatofytů může být poměrně široké, jiné druhy jsou naopak specializované na jediného hostitele. U některých druhů je ale třeba hostitelské spektrum ještě detailněji zmapovat podle nově revidované taxonomie (viz dále). Řada hostitelsky specializovaných druhů navíc na hostiteli preferenčně napadá jen určité anatomické lokalizace a infekce se projevují různými klinickými formami (tinea capitis, t. corporis, t. pedis, apod.).

Biologický koncept chápe druh jako skupinu jedinců, kteří jsou schopni se potenciálně křížit a zároveň vykazují reprodukční izolaci od zástupců ostatních biologických druhů [73]. Pokud vznikají mezidruhová hybridy, pak mají sníženou životaschopnost, nebo nejsou fertillní (může se

projevit až u potomků vyšších generací [12]. Většina dermatofytů je heterotalických (strategie rozmnožování dvěma oddělenými pohlavími) a opačně ladění jedinci jsou nositeli různého párovacího typu, který se arbitrárně značí + nebo -, či MAT1-1 a MAT1-2 podle přítomnosti konkrétního genu zapojeného v pohlavním procesu. Při vytvoření vhodných podmínek může být při párovacích pokusech se dvěma opačně laděnými izoláty indukována tvorba pohlavního stadia in vitro.

Biologický koncept je dobře aplikovatelný na geofilní dermatofyty [15, 79, 98, 99], u kterých odpovídá výsledkům fylogenetických studií [14, 46] a zohledňuje i morfologické rozdíly mezi druhy. Obtížněji použitelný je u některých primárně patogenních druhů, které se až na výjimky pohlavního rozmnožování „vzdaly“ kvůli patogenímu způsobu života. Genetická struktura těchto druhů je často klonální a najdeme u nich pouze jediný párovací typ, jak bylo zjištěno např. u *T. rubrum* [116], antropofilních kmenů *T. interdigitale* [102], *T. tonsurans* [96], *T. equinum* [96] a *T. verrucosum* [56]. Výjimkami jsou některé druhy uvnitř někdejšího komplexu *T. mentagrophytes*, jejichž pohlavní stadia jsou nazývána jako *Arthroderma vanbreuseghemii* (anamorfa *T. interdigitale*), *A. benhamiae* (*Trichophyton* sp.) a *A. simii* (*T. simii*). Tyto druhy si zřejmě zachovávají saprofytický cyklus v norách zvířat, kde dochází k pohlavnímu procesu. Napovídá tomu jejich neklonální genetická struktura, rovnoměrné rozložení párovacích typů a ochotná tvorba plodnic v párovacích pokusech in vitro [60, 61, 96, 106, 105].

Při velkém úsilí se při párovacích experimentech in vitro daří vytvářet mezidruhové hybridy mezi výše zmíněnými pohlavními druhy navzájem [64, 62, 63], nebo dokonce mezi některým z klonálních druhů a druhem sexuálním (např. *T. rubrum* a *T. simii*) [4]. Pokud by byl biologický koncept druhu striktně aplikován podle výsledků těchto experimentů, byl by zcela destruován koncept zoofilních a antropofilních druhů *Trichophyton*, jak ho dnes známe. U řady klonálních druhů je ale téměř jisté, že v přirozeném prostředí pohlavní proces neprobíhá a jednotlivé druhy si udržují svá specifika i přes teoretickou možnost křížení, která může být úspěšná v laboratorních podmínkách [32].

Fylogenetický koncept druhu vychází z monofylie, tedy ze situace, kdy druh zahrnuje všechny potomky společného předka. Druhy jsou dnes vymezovány nejčastěji na základě výsledků fylogenetických analýz počítaných z molekulárně genetických dat. Jednou z nejpoužívanější aplikací tohoto přístupu u hub je v současnosti tzv. GCPSR koncept (genealogical concordance phylogenetic species recognition) [5], který k vymezení druhu využívá DNA sekvence několika nezávislých genů. Konstrukce několika fylogenezí ze sekvencí různých genů v praxi umožní odhalit rekombinaci uvnitř pohlavně se rozmnožujících populací a určit hranice druhů. Hlavní omezení v použití tohoto konceptu u dermatofytů tedy opět nacházíme u asexuálních druhů, kde k rekombinaci nedochází [32] a každá genetická změna nalezená u některé linie by mohla být rozpoznána jako samostatný druh.

Všechny výše zmíněné koncepty mají určité výhody i nevýhody, a proto je při určování mezidruhových hranic

výhodné používat kombinované přístupy. Již v minulosti se často užíval přístup kombinující morfologii, fyziologii a křížící experimenty [52, 83]. Dnes prosazovaný **polyfázický přístup**, bere v úvahu nejen výsledky fylogenetických studií, ale i morfologii, fyziologii a ekologii druhů. Navržení nového druhu u geofilních druhů by mělo být doplněno i křížícími experimenty s nejbližšími příbuznými druhy [10, 34, 42, 43, 46].

SOUČASNÝ POHLED NA TAXONOMII DERMATOFYTŮ A DUÁLNI NÁZVOSLOVÍ

Již první fylogenetické studie na skupině dermatofytů potvrdily, že se jedná o jednotnou a dobře podpořenou skupinu (monofyletickou) uvnitř čeledi *Arthrodermataceae* [26, 36, 68]. Morfologický koncept anamorfních rodů *Trichophyton*, *Microsporum* a *Epidermophyton* však neodpovídá fylogenetickým datům (viz obr. 1) [26] a druhy klasifikované jako *Trichophyton* a *Microsporum* tvoří několik oddělených linií (polyfyletické). Rod *Trichophyton* v užším slova smyslu (*Trichophyton* s. str.) zahrnuje všechny primárně patogenní druhy *Trichophyton* (viz obr. 1), naopak všechny ostatní druhy *Trichophyton* jsou geofilní a klinicky významný je jen malý počet z nich (tab. 1). Podobně i patogenní druhy *Microsporum* (*Microsporum* s. str.) tvoří oddělenou skupinu od druhů geofilních, které navíc tvoří dvě fylogeneticky oddělené skupiny (viz obr. 1) [28, 34]. Jak je zřejmé z obrázku 1, jednotlivé skupiny podpořené fylogenetickou analýzou sdílí i stejnou ekologii.

Současná taxonomie dermatofytů stále používá tzv. duální názvosloví, které bylo zakotveno i v několika předchozích vydáních Kódu, zatímco nová verze již duální názvosloví nepodporuje [74]. V praxi se duální názvosloví týká hub s komplexním životním cyklem, který zahrnuje jak pohlavní, tak nepohlavní stadium (pleomorfní houby). V tomto systému musela mít obě stadia odlišné jméno. Duální systém byl vytvořen před érou molekulární genetiky a měl nesporné výhody pro tehdejší taxonomii, která byla založená především na morfologii a ekologii. Významná část hub (např. rostlinných patogenů) tvoří pohlavní i nepohlavní stadium oddělené na různých substrátech a za různých podmínek, a proto v minulosti nebylo spojení mezi oběma stadii známo, a tak byla popsána pod různými rodovými jmény. Duální systém se stal nadbytečným s všeobecnou dostupností molekulárních metod, protože pomocí nich může být téměř jakákoliv houba (včetně druhů sterilních in vitro) zařazena na správnou pozici ve fylogenetickém systému a tedy mohou být správně určeny vztahy mezi různými stadii životního cyklu. Současný Kód proto podporuje již pouze jediné jméno pro jeden druh houby, které obsáhne celý její životní cyklus [74].

Konkrétní kroky směřující k používání jediného jména pro každý druh zatím u dermatofytů nebyly učiněny a stále je tedy aktuální duální názvosloví. Pro druhy dermatofytů, kde je známo jen nepohlavní stadium, většinou není zapotřebí žádných doporučení ohledně používání konkrétních jmen. U druhů, kde je známo pohlavní stadium, exi-

Tabulka 1. Přehled doporučených a alternativních jmen pro druhy dermatofytů známých z lidského klinického materiálu

!¹	DOPORUČENÉ JMÉNO A SYNONYMA²	ALTERNATIVNÍ JMÉNO³	ZDROJE⁴	BUDOUCÍ ZMĚNY⁵
	ANTROPOFILNÍ DRUHY			
!	<i>Epidermophyton floccosum</i> (Harz) Langeron et Miloch.		[26, 54]	
	<i>Microsporum audouinii</i> Gruby = <i>M. langeronii</i> (Vanbreus.) Cif. = <i>M. rivalieri</i> Vanbreus		[29, 57, 85]	
	<i>Microsporum ferrugineum</i> M. Ota		[29, 57, 85]	
	<i>Trichophyton concentricum</i> R. Blanch = <i>T. indicum</i> (Castell.) Nann.		[27]	
!	<i>Trichophyton interdigitale</i> Priestley (antropofilní) = <i>T. batonrougei</i> Castell. = <i>T. candelabrum</i> Listemann = <i>T. krajdennii</i> J. Kane, et al. = <i>T. mentagrophytes</i> var. <i>goetzii</i> Hantschke = <i>T. mentagrophytes</i> var. <i>interdigitale</i> (Priestley) Georg = <i>T. mentagrophytes</i> var. <i>nodulare</i> Georg et Meachling		[6, 27, 84, 105]	
!	<i>Trichophyton rubrum</i> (Castell.) Sabour = <i>T. circonvolutum</i> Sabour. = <i>T. fischeri</i> J. Kane = <i>T. fluviumuniense</i> Pereiro = <i>T. gourvilii</i> Catanei = <i>T. kanei</i> Summerb = <i>T. kuryangei</i> Vanbreus. et S. A. Rosenthal = <i>T. megninii</i> R. Blanch = <i>T. pedis</i> M. Ota = <i>T. pervesii</i> Catanei = <i>T. raubitschekii</i> J. Kane et al. = <i>T. rodhaini</i> Vanbreus. = <i>T. rubrum</i> var. <i>nigricans</i> Frágner = <i>T. soudanense</i> Joyeux		[30, 34, 78]	
	<i>Trichophyton schoenleinii</i> (Lebert) Langeron et Miloch		[18, 82]	
!	<i>Trichophyton tonsurans</i> Malmsten = <i>T. areolatum</i> Negroni = <i>T. floriforme</i> Beintema = <i>T. spadiceum</i> (Pollacci & Nann) Nann = <i>T. sulfureum</i> Sabour. et Fox = všechny variety <i>T. tonsurans</i>		[1, 31, 27, 84]	
	<i>Trichophyton violaceum</i> Sabour = <i>T. glabrum</i> Sabour = <i>T. yaoundei</i> G. Cochet et Doby-Dub = všechny variety <i>T. violaceum</i>		[30, 34, 78]	
	ZOOFILNÍ DRUHY			
!	<i>Arthroderma benhamiae</i> Ajello et S. L. Cheng	<i>Trichophyton</i> sp. anamorfa od <i>Arthroderma benhamiae</i>	[27, 40, 106]	<i>Trichophyton benhamiae</i>
!	<i>Microsporum canis</i> E. Bodin ex Guég = <i>M. distortum</i> Di Menna et Marples = <i>M. equinum</i> E. Bodin ex Guég. = všechny variety <i>M. canis</i>	<i>Arthroderma otae</i> (A. Haseg. et Usui) McGinnis et al.	[29, 57, 85]	
	<i>Trichophyton bulbosum</i> Lebasque		[40, 94]	
	<i>Trichophyton equinum</i> Gedoelst = <i>T. equinum</i> var. <i>autotrophicum</i> J. M. B. Sm. et al.		[1, 84, 103, 115]	
!	<i>Trichophyton erinacei</i> (J. M. B. Sm. et Marples) Quaié = <i>T. mentagrophytes</i> var. <i>erinacei</i> J.M.B. Sm. et Marples = <i>T. proliferans</i> M. P. English et Stockdale		[27, 40]	
	<i>Trichophyton eriotrephon</i> Papegaay		[27, 40]	
!	<i>Trichophyton interdigitale</i> Priestley (zoofilní) = <i>T. abissinicum</i> (A. Agostini) Nann. = <i>Trichophyton balcaneum</i> Castell. = <i>T. granulosum</i> Sabour. = <i>T. immergens</i> Miloch. = <i>T. radicosum</i> Catanei	<i>Arthroderma vanbreuseghemii</i> Takashio	[6, 18, 31, 27, 40, 105]	<i>Trichophyton granulosum?</i>

Pokračování tabulky na straně 156

	= <i>T. rotundum</i> MacCarthy = <i>T. mentagrophytes</i> var. <i>asteroides</i> (Sabour.) Neveu-Lem. = <i>T. mentagrophytes</i> var. <i>granulosum</i> (Sabour.) Neveu-Lem. = <i>T. verrucosum</i> var. <i>autotrophicum</i> D. B. Scott			
	Trichophyton mentagrophytes (C. P. Robin) R. Blanch. = <i>T. depressum</i> MacCarthy = <i>T. langeronii</i> (E.A. Baudet) Nann. = <i>T. mentagrophytes</i> var. <i>mentagrophytes</i> = <i>T. mentagrophytes</i> var. <i>quinckeanum</i> (Zopf) J. M. B. Sm. et Austwick = <i>T. papillosum</i> Lebasque = <i>T. quinckeanum</i> (Zopf) D.M. MacLeod et Muende = <i>T. sarkisovii</i> L.G. Ivanova et I.D. Poljakov		[6, 27, 34, 82, 105]	
	Trichophyton simii (Pinoy) Stockdale et al.	<i>Arthroderma simii</i> Stockdale et al.	[7, 27]	
!	Trichophyton verrucosum E. Bodin = <i>T. verrucosum</i> var. <i>album</i> (Sabour.) Georg = <i>T. verrucosum</i> var. <i>discoides</i> (Sabour.) Georg = <i>T. verrucosum</i> var. <i>ochraceum</i> (Sabour.) Georg		[31, 40, 56, 65]	
GEOFILNÍ DRUHY				
!	Microsporium aenigmaticum Hubka et al.		[43]	<i>Nannizzia</i>
	Microsporium cookei Ajello	<i>Arthroderma cajetanum</i> (Ajello) Ajello et al.	[10, 46]	<i>Lophophyton</i>
	Microsporium duboisii (Vanbreus.) Cif.		[43, 90]	<i>Nannizzia</i>
!	Microsporium fulvum Uriburu = <i>M. boullardii</i> Dominik et Majchr. = <i>M. ripariae</i> Hubálek et Rush-Munro = <i>Keratinomyces longifusus</i> Flórián et Galgoczy	<i>Arthroderma fulvum</i> (Stockdale) Weitzman et al.	[28, 43, 90, 98, 104]	<i>Nannizzia fulva</i>
	Microsporium gallinae (Méglin ex Guég.) Grigoraki = <i>M. vanbreuseghemii</i> Georg et al.	<i>Arthroderma grubyi</i> (Georg et al.) Ajello et al.	[28, 34]	<i>Lophophyton gallinae</i>
!	Microsporium gypseum (E. Bodin) Guiart et Grigoraki = <i>M. appendiculatum</i> Bhat et Miriam	<i>Arthroderma gypseum</i> (Nann.) Weitzman et al.	[43, 90, 98, 104]	<i>Nannizzia gypsea</i>
	Microsporium incurvatum (Stockdale) P. L. Sun et Y.M. Ju	<i>Arthroderma incurvatum</i> (Stockdale) Weitzman et al.	[43, 90, 98, 104]	<i>Nannizzia incurvata</i>
	Microsporium mirabile J. S. Choi et al.	<i>Arthroderma mirabile</i> J. S. Choi et al.	[46]	<i>Lophophyton</i>
	Microsporium nanum C. A. Fuentes	<i>Arthroderma obtusum</i> (C. O. Dawson & Gentles) Weitzman et al.	[43, 90]	<i>Nannizzia obtusa</i>
!	Microsporium persicolor (Sabour.) Guiart et Grigoraki	<i>Arthroderma persicolor</i> (Stockdale) Weitzman et al.	[43, 51, 90, 99]	<i>Nannizzia persicolor</i>
	Microsporium praecox Rivalier ex A. A. Padhye et al.		[43, 90]	<i>Nannizzia</i>
	Microsporium racemosum Borelli	<i>Arthroderma racemosum</i> (Rush-Munro et al.) Weitzman et al.	[10, 46]	<i>Lophophyton</i>
	Trichophyton ajelloi (Vanbreus.) Ajello = <i>Epidermophyton stockdaleae</i> Prochacki et Eng.-Zas. = <i>T. ajelloi</i> var. <i>nanum</i> (J. Kunert et Hejtm.) Ajello	<i>Arthroderma uncinatum</i> C.O. Dawson et Gentles	[10, 15, 26]	<i>Keratinomyces ajelloi</i>
	Trichophyton eboreum Brasch et Gräser	<i>Arthroderma olidum</i> C. K. Campb. et al.	[10, 14]	<i>Keratinomyces</i>
!	Trichophyton onychocola Cmokova et al.		[42]	<i>Keratinomyces</i>
!	Trichophyton terrestre Durie et D. Frey	<i>Arthroderma quadrifidum</i> C. O. Dawson et Gentles	[10, 15, 79]	<i>Keratinomyces</i>
	Trichophyton vanbreuseghemii Rioux et al.	<i>Arthroderma gertleri</i> H. Böhme	[8, 10]	<i>Keratinomyces</i>

¹Vykřičník označuje druhy, které byly odhaleny v klinickém materiálu českých pacientů při poslední epidemiologické studii na našem území [44].

²Uvedena jsou jen jména taxonů podpořených, nebo synonymizovaných na základě molekulárněgenetických dat a jen jejich nejběžnější tvary (kombinace). Další běžná synonyma uvádí např. de Hoog [17].

³Jména, která mají podle současné nomenklatury stejnou váhu jako jména ve sloupci doporučených jmen. Jedná se především o jména pohlavního stadia (teleomorfy). Se jmény se dá setkat zejména v databázi GenBank, kde stále u řady skupin hub převládá klasifikace podle jména pohlavního stadia.

⁴Jen zdroje, které podpořily tento druh a jeho rozlišení od blízkce příbuzných druhů.

⁵Na základě konceptu prezentovaného prof. Yvonne Gräser na kongresu 6th Trends in Medical Mycology (Kodaň, Dánsko) v přednášce "Same fungus, new names?"

stují většinou dvě platná jména, která mají podle duálního systému stejnou váhu. Již nyní ale lze doporučit k běžnému používání jen některá jména, která odpovídají současné taxonomii dermatofytů a jejich užívání navíc redukuje změny provedené v budoucnu na minimum. Těmi jsou u dermatofytů hlavně jména nepohlavních stadií. Z kroků, které již byly podniknuty je zřejmé, že jméno *Arthroderma* vztahující se k pohlavnímu stadiu, nebude nadále užíváno, a proto lze již dnes jeho používání minimalizovat (kromě případů, kde nepohlavní stadium nemá jméno, nebo je jeho název méně přesný, viz dále).

Tabulka 1 obsahuje seznam doporučených jmen a těch, která lze používat jako alternativní. Alternativní jméno je vhodné používat v těch případech, kde několik různých biologických druhů (např. *A. quadrifidum*, *A. lenticulare* a *A. insingulare*) má pro nepohlavní stadium identické jméno (*T. terrestre*). V případě *T. terrestre* se však podle našich výsledků [44] v klinickém materiálu českých pacientů vyskytoval vždy druh *A. quadrifidum*, je ale možné, že v jiných geografických oblastech se mohou vyskytovat i jiné druhy tohoto komplexu. V takovém případě je vhodné uvádět obě jména např. ve formě „*T. terrestre* (*A. quadrifidum*)“, dokud nebude definitivně zvoleno vhodné jméno pro všechny tři druhy podle výsledků fylogenetických studií a nových pravidel Kódu (viz dále).

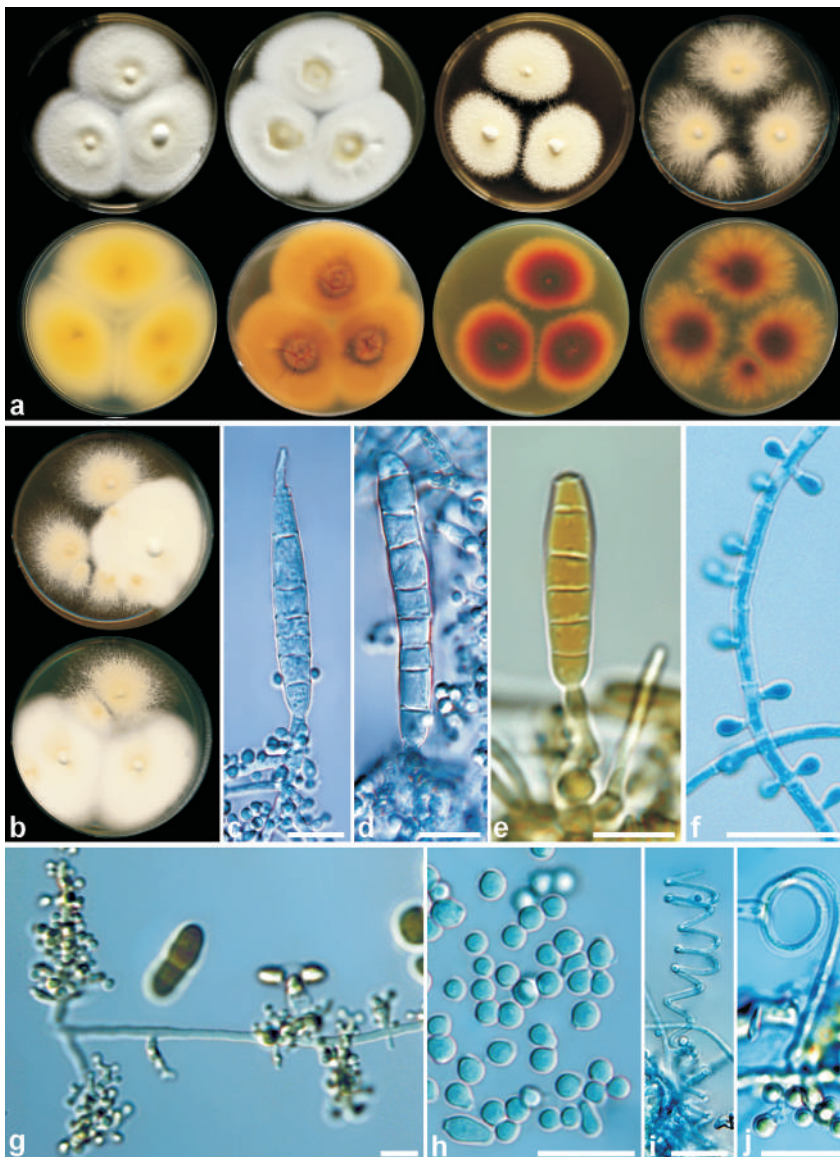
TAXONOMICKÉ ZMĚNY U KLINICKY VÝZNAMNÝCH DRUHŮ

Následující odstavce se týkají především změn, které byly učiněny v posledních dvou desetiletích s významným přispěním molekulárně genetických metod. Pro hrubou orientaci jsou užívána jména druhových komplexů, která v taxonomii dermatofytů nesou název fylogeneticky nejbližšího pohlavního stadia (viz obr. 1), i když pro klinickou praxi nemají tato označení velký význam. Dnes je uznáváno zhruba 50–60 druhů dermatofytů a tento počet je pravděpodobně téměř konečný kvůli velmi intenzivnímu výzkumu trvajícím bezmála dvě století. Z tohoto počtu je zhruba 35 druhů známo z lidského klinického materiálu (viz tab. 1, obr. 1), ale podstatná část je vzácná, někdy známá jen ze specifických endemických oblastí, či několika málo nálezů. Během probíhající epidemiologické studie dermatofytóz v ČR byla v klinickém materiálu od českých pacientů odhalena druhová diverzita čítající 15 druhů [44, 70]. Jedná se pravděpodobně o výčet všech hlavních původců dermatofytóz v ČR, další vzácné druhy mohou být zachyceny při dlouhodobějším výzkumu, nebo jako importované nákazy. Detailnější studie dermatofytóz u zvířat na našem území chybí, ale dá se očekávat, že by spektrum druhů dále obohatily.

Z molekulárně genetických dat jasně vyplynulo, že *T. mentagrophytes* je komplex několika zoofilních druhů (hostitelé všech zoofilních druhů jsou shrnuti v tabulce 2). Pohlavní stadia *A. vanbreusegheimii* a *A. benhamiae*, která byla v minulosti obě přisuzována tomuto druhu, jsou od sebe fylogeneticky vzdálená a reprezentují odlišné druhy (viz obr. 1) [26, 27]. Poměrně překvapivé bylo zjištění, že

A. simii je pro *T. mentagrophytes* s. str. nejpříbuznějším, pohlavně se rozmnožujícím druhem, přestože již v minulosti Weitzman a Padhye [112] diskutovali o blízkosti, či dokonce identitě těchto druhů. Do komplexu *A. simii* patří kromě zoofilního *T. mentagrophytes* také blízcě příbuzný, i když ekologicky a morfologicky odlišný, antropofilní druh *T. schoenleinii* [34, 82]. Endemickými oblastmi výskytu obou druhů jsou dnes především Blízký a Střední východ, Afrika a Austrálie [6, 18, 34, 82]. Příbuznost druhů potvrzuje i podobná klinická manifestace infekcí, oba jsou mimo jiné schopné vyvolat infekce typu favus, *T. schoenleinii* u člověka a *T. mentagrophytes* u myši (kmeny dříve označované jako *T. quinckeanum*) a velbloudů (kmeny dříve označované jako *T. sarkisovii* a *T. langeronii*). Na našem území se *T. mentagrophytes* přirozeně nevyskytuje, a proto není vhodné jméno v klinické praxi nadále používat (možnost importu infekce z endemických oblastí ale samozřejmě existuje). Druhy v minulosti klasifikované morfologicky jako *T. mentagrophytes* a jeho variety (v pojetí jaké navrhoval např. Emmons et al. [20]) byly podle fylogenetických studií rozděleny mezi minimálně tři druhy (*T. mentagrophytes* s. str., *T. interdigitale* a *T. erinacei*). Většinu zoofilních infekcí, které byly i u nás tradičně přisuzovány *T. mentagrophytes*, působí *T. interdigitale* [44], který patří do komplexu *A. vanbreusegheimii* (viz níže). *T. interdigitale* v dnešním pojetí zahrnuje kmeny jak zoofilního, tak lidského původu a je v našich podmínkách velmi běžným druhem. Zoofilní kmeny jsou přitom morfologicky velmi podobné *T. mentagrophytes* s. str. podle nového konceptu (neotyp byl stanoven v roce 1999 [27]), i když se jedná o ekologicky a fylogeneticky odlišné druhy. Zbývající izoláty původem především z ježků, dříve klasifikované jako *T. mentagrophytes* var. *erinacei*, jsou dnes řazeny do samostatného druhu *T. erinacei* uvnitř komplexu *A. benhamiae* (viz dále). Vlastní *T. simii* (teleomorfa *A. simii*), podle kterého je pojmenován celý komplex, je poměrně málo prozkoumaný druh, z minulosti známý hlavně z primátů v Indii a přilehlých státech a také od cestovatelů, kteří navštívili tyto oblasti [52]. Ochotná tvorba pohlavního stadia v křížících experimentech upomíná spíše na některé druhy geofilních dermatofytů nebo dermatofyty napadající savce žijící v norách [101]. Je tedy možné, že primární hostitel tohoto druhu ještě nebyl objeven. Sporadické nálezy *T. simii* jsou známy z celého světa (USA, Brazílie, Egypt, Německo, Írán aj.) [7] a v posledních letech byl druh prokázán také z půdy a u evropských pacientů, kteří nikdy nevycestovali do zahraničí [7, 6], což vzbudilo diskuse o možné geofilní ekologii druhu [7, 34].

Komplex *A. vanbreusegheimii* zahrnuje klinicky významné antropofilní a zoofilní druhy *T. interdigitale*, *T. tonsurans* a *T. equinum* (viz obr. 1). Křížícími pokusy založenými na kmenech identifikovaných molekulárně genetickými metodami bylo zjištěno, že *A. vanbreusegheimii* je pohlavní stadium druhu *T. interdigitale*. Schopnost pohlavně se rozmnožovat si však zachovaly jen izoláty zvířecího původu, kdežto lidské izoláty reprezentují jen klon odvozený od zoofilních kmenů, který ztratil schopnost tvorby pohlavního stadia. Všechny izoláty mají jen jediný párovací typ MT+ a s referenčními párovacími



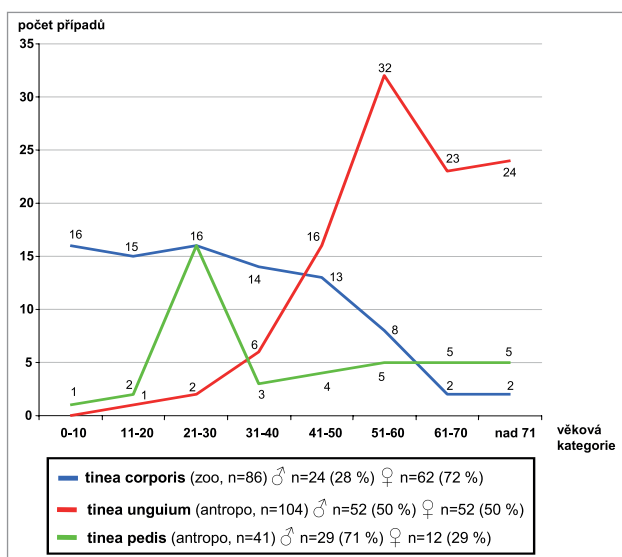
Obr. 2. Morfologie *Trichophyton interdigitale* v současném pojetí
 Kolonie různých kmenů *T. interdigitale* po 14 dnech kultivace ve tmě při 25 °C na SGA (Sabouraudův agar; Himedia, Milano, Itálie), spodina kolonií v dolní řadě (a). Morfologie typická pro antropofilní kmeny v levých dvou sloupcích a pro zoofilní v pravých dvou sloupcích (izoláty zleva: CCF 4825, CCF 4822, CCF 4823 a ME1269/11). Některé kmeny mohou vykazovat oba typy morfologie naráz (b); (c–e) doutníkovité makrokonidie; (f–g) konidiofory nesoucí mikrokonidie; (h) mikrokonidie; (i–j) spirální vlákna; všechna měřítká 10 μm.

kmeny *A. vanbreuseghemii* tvoří plodnice bez askospór [105]. **Antropofilní kmeny *T. interdigitale*** vykazují často typickou morfologii, která odpovídá dřívějšímu konceptu *T. interdigitale*, a zahrnuje následující znaky: bílé, vzdušné kolonie se žlutou spodinou, mikrokonidie jsou kulovité až klavátní, makrokonidie a spirální vlákna většinou chybí, nebo jsou málo časté (obr. 2). **Zoofilní kmeny *T. interdigitale*** mají nejčastěji kolonie granulární, v odstínech okrové a hnědé s hnědou nebo hnědočervenou spodinou, mikrokonidie jsou nejčastěji kulovité, doutníkovité makrokonidie a spirální vlákna jsou většinou přítomna (viz obr. 2). Nežádka se ale vyskytují i přechodné varianty mezi oběma typy a často i jediný kmen produkuje oba typy morfologie v téže kolonii v závislosti na inokulu (viz obr. 2) [40, 76]. Morfologie zoofilních kmenů *T. interdigitale* asi nejlépe odpovídá izolátům dříve určovaným jako *T. mentagrophytes* var. *granulosum* [76]. Pro toto jméno ale neexistuje typový materiál a pojetí různých autorů se výrazně lišilo. Jedná se o jedno z nejvíce kontroverzních jmen vůbec a některými autory byl *T. mentagrophytes* var. *granulosum* označován jako nepohlavní sta-

dium od *A. benhamiae* [3], v pojetí jiných autorů, včetně např. Kuklové et al. [67], se evidentně jednalo o zoofilní *T. interdigitale*. Odlišná je i klinická manifestace a většinou platí, že antropofilní kmeny *T. interdigitale* působí u člověka infekce manifestující se jako t. pedis a t. unguium, které mají tendenci k chronicitě. Naproti tomu zoofilní kmeny *T. interdigitale* působí silně zánětlivé infekce typu t. corporis (obr. 3) a jsou přenesené nejčastěji z hlodavců, psů a koček [40, 76]. Rozdílné je i rozložení těchto infekcí v populaci v závislosti na věku a pohlaví pacientů (obr. 4). Druh *T. interdigitale* má tedy v dnešním pojetí široké hostitelské spektrum zahrnující savce včetně člověka (tab. 2), a vyznačuje se dvěma různými morfologickými typy, jejichž rozeznávání může mít i praktický klinický význam. Vzhledem ke klonální povaze lidských izolátů je možné jejich odlišení od původem zvířecích izolátů např. pomocí sekvence ITS rDNA, které může být přínosné u kmenů s přechodnou morfologií [40]. Odlišení dalšími metodami jako PCR-fingerprinting, nebo MALDI-TOF hmotnostní spektrometrií je obtížné, nebo nemožné kvůli blízké příbuznosti obou forem [44, 77].



Obr. 3. Klinický obraz infekcí působených druhem *T. interdigitale* v současném pojetí
Tinea unguium působená antropofilními kmeny *T. interdigitale* (a) a tinea corporis (b, c) působená zoofilními kmeny *T. interdigitale*.



Obr. 4. Rozložení antropofilních a zoofilních kmenů *T. interdigitale* u českých pacientů podle věku a klinické manifestace
Zoofilní kmeny působí tinea corporis (modrá křivka) s převahou u žen a klesající incidencí s věkem. Antropofilní kmeny jsou původci tinea unguium (červená křivka) a tinea pedis (zelená křivka). Tinea unguium postihuje obě pohlaví ve stejné míře a má stoupající incidenci s věkem. Tinea pedis postihuje hlavně muže ve věku 20–30 let. Data pochází ze studie provedené od července 2011 do června 2013 u českých pacientů [44].

Tabulka 2. Přehled zoofilních dermatofytů a jejich hostitelského spektra

Druh	Hlavní hostitelé (vzácně uvádění hostitelé)
<i>Arthroderma benhamiae</i>	morče, králík (činchila, křeček, pes, kočka)
<i>Microsporum canis</i>	kočka, pes, kůň (králík)
<i>Trichophyton bulbosum</i>	kůň
<i>Trichophyton equinum</i>	kůň
<i>Trichophyton erinacei</i>	ježek (králík)
<i>Trichophyton eriotrephon</i>	hostitelé neznámí ¹
<i>Trichophyton interdigitale</i> (zoofilní)	hlodavci, pes, kočka
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	drobní hlodavci, velbloudi
<i>Trichophyton simii</i>	primáti (pes, kočka, drůbež)
<i>Trichophyton verrucosum</i>	skot

¹Druh je známý jen z několika případů u člověka, zoofilní původ se předpokládá na základě klinické manifestace infekcí a příbuznosti druhu s *A. benhamiae* a dalšími zoofilními druhy

Dalšími klonálními liniemi, které se v minulosti pravděpodobně odštěpily od *A. vanbreuseghemii*, jsou druhy *T. tonsurans* a *T. equinum*. Oba druhy jsou velmi blízce příbuzné a z tohoto důvodu byly brzy po nástupu molekulárních metod poněkud ukvapeně synonymizovány [16, 27]. Synonymizace vzbudila poměrně bouřlivé diskuse [103, 115] a někteří autoři oba druhy obhajovali na základě jejich jedinečné ekologie a fyziologie. *T. tonsurans* je antropofilní druh, původce *t. capitis* (endothrix) a *t. corporis*, a je častý hlavně v méně rozvinutých oblastech světa, výjimkou je Severní Amerika a některé evropské země s velkým podílem přistěhovalců [37, 89]. Pojem *t. gladiatorum* byl vytvořen pro infekce *t. corporis* u zápasníků a dalších sportovců, které se často vyskytují v lokálních epidemiích, s nimiž se dá setkat i na našem území a v okolních státech [21, 44]. Hlavním hostitelem *T. equinum* je naproti tomu kůň a infekce přenesené na člověka jsou vzácné [17]. *T. equinum* na rozdíl od *T. tonsurans* vyžaduje niacin v médiu [23] a všechny kmeny *T. equinum* mají pouze párovací typ MT+, kdežto *T. tonsurans* kmeny jsou typu MT- [96, 103]. Pozdější molekulárně genetické studie potvrdily, že se druhy dají od sebe odlišit i několika záměnami v sekvencích běžně používaných genů, jako např. ITS rDNA a β -tubulinu [84, 103], a jsou rozeznávány i MALDI-TOF hmotnostní spektrometrií [77]. Dnes panuje všeobecná shoda, že se jedná o dva odlišné druhy [17, 34].

Komplex *A. benhamiae* zahrnuje přinejmenším pět zoofilních druhů (viz obr. 1, tab. 2), výjimkou je pouze antropofilní *T. concentricum*, původce *t. imbricata* s hlavními endemickými oblastmi na pacifických ostrovech, v jihovýchodní Asii a Střední a Jižní Americe [9]. Nejvýznamnějším zástupcem komplexu je druh *A. benhamiae*, jehož nepohlavní stadium nemá v současnosti jméno (*Trichophyton* sp.), protože byl tento druh v minulosti spojován s domnělým nepohlavním stadiem *T. mentagrophytes* [3]. Pozdější fylogenetické analýzy [26, 27] i křížící experimenty ale ukázaly [106, 105], že se jedná o odlišné druhy. Rezervoárem *A. benhamiae* jsou hlavně hlodavci (morče, králík, činčila, křeček, apod.), méně často pes nebo kočka [66, 93, 106, 107]. V nedávné minulosti se druh rychle rozšířil v Evropě a Japonsku [11, 22, 53, 107] a v současnosti se jedná o nejvýznamnější zoofilní druh přenášený na člověka v ČR [44, 71, 95]. Stejně jako *A. benhamiae*, také další zoofilní druhy tohoto komplexu působí především silně zánětlivou formu *t. corporis* a *capitis*. Rezervoárem *T. erinacei* (dříve *T. mentagrophytes* var. *erinacei*) jsou hlavně ježci a tento druh je ve zvýšené míře zaznamenáván z Německa [76, 92] a jsou známy i případy z ČR [44]. Hostitelem druhu *T. verrucosum* je skot, ale nikoliv ovce, jak se dříve uvádělo. Jedna z variant druhu (*T. verrucosum* var. *autotrophicum*) uváděná z ovcí [18, 88] byla totiž synonymizována s *T. interdigitale* [27]. Hostitelem vzácného druhu *T. bullosum* jsou koně, ale přenos na člověka je vzácný [94]. Druh morfologicky připomíná *T. verrucosum* a byl zachycen i z léze u koně v ČR (Lysková et al., nepublikovaná data). Přírozený hostitel druhu *T. eriotrephon* není známý a zoofilní původ se jen předpokládá na základě klinické manifestace infekcí a fy-

logenetické pozice druhu (popsány byly jen 3 případy u člověka v Nizozemí a Íránu) [40, 80, 86].

***Trichophyton rubrum* komplex** nezahrnuje žádné známé pohlavní stadium. Na základě molekulárně genetických dat byly všechny druhy a variety tohoto komplexu zahrnuty pod *T. rubrum* a *T. violaceum* (viz tab. 1) [33, 30, 35, 47-50, 55, 69, 78]. *T. rubrum* je tak dnes ve většině rozvinutých zemí, včetně ČR [44, 67], jednoznačně nejvýznamnějším původcem dermatofytóz vůbec [89]. Některé v minulosti popsané druhy komplexu vykazovaly unikátní morfologické (odlišnou pigmentaci kolonií, hyfy větví se v ostrých úhlech proti směru růstu, tzv. „reflexive hyphae“; aj.), nebo fyziologické znaky (požadavky na vitaminy v médiu, pozitivní ureázový test aj.), nebo se vyznačovaly určitou převažující klinickou manifestací, či endemickým rozšířením [34]. Všechny tyto druhy jsou od sebe v podstatě neodlišitelné běžnými molekulárně genetickými metodami a pouze analýza mikrosatelitů umožňuje některé z nich rozpoznat na úrovni populace [33, 78]. To se daří např. u africké populace *T. rubrum* působící hlavně *t. capitis* a odpovídající částečně tradičnímu konceptu *T. soudanense*. Další populace, působící hlavně *t. pedis* a *unguium* v Evropě a Americe, odpovídá klasickému konceptu *T. rubrum*. Asijská populace, která působí hlavně *t. corporis* a *t. cruris*, částečně odpovídá někdejšímu konceptu *T. raubitschekii* [34]. Je doporučeno nadále používat pouze druhová jména *T. rubrum* a *T. violaceum*, ostatní epiteta jako např. „raubitschekii“ a „soudanense“ lze užívat jako neformální variety pro zpřesnění komunikace [34].

Komplex *A. otae* zahrnuje celkem tři blízce příbuzné druhy, *M. canis*, *M. audouinii* a *M. ferrugineum* [25, 29, 57]. Zoofilní a kosmopolitně rozšířený druh *M. canis* je jediným, u kterého je známé pohlavní stadium (*A. otae*) a jeho hostitelské spektrum (viz tab. 2) zahrnuje kočky, psy, koně, méně často i další savce [13]. Antropofilní druhy *M. audouinii* a *M. ferrugineum* jsou klonální druhy, které mají specifické endemické oblasti v Africe, respektive ve východní Asii a východní Evropě [114]. Všechny druhy komplexu jsou od sebe odlišitelné několika záměnami v sekvencích běžně používaných genů, jako jsou ITS rDNA a β -tubulin [85], nebo fingerprintovými metodami [25, 69].

Rod *Epidermophyton* obsahuje podle dnešního konceptu pouze jediný druh, a sice antropofilní *E. floccosum*. Ostatní druhy řazené do rodu byly už v minulosti synonymizovány s *E. floccosum* a jinými druhy dermatofytů. Druh *E. stockdaleae* byl synonymizován s *T. ajelloi* až na základě molekulárně genetických dat [26].

Geofilní druhy se řadí podle nepohlavního stadia do rodů *Trichophyton*, *Microsporium* a *Chrysosporium* (pozn. některé druhy *Chrysosporium* bez většího klinického významu byly zařazeny mezi dermatofyty podle fylogenetických studií). U většiny z nich je známé i pohlavní stadium, které se podle posledních taxonomických změn řadí jednoduše do rodu *Arthroderma* [113, 114]. Dnes je uznáváno zhruba 35 geofilních druhů [34], z nichž asi polovina je známá z lidského klinického materiálu (viz tab. 1). Protože geofilní druhy rodu *Trichophyton* a *Microsporium* re-

prezentují linie vzdálené od primárně patogenních zástupců těchto rodů (viz obr. 1), budou muset být převedeny do jiných rodů (viz dále). Na rozdíl od primárně patogenních dermatofytů nebyla diverzita geofilních dermatofytů ještě zcela vyčerpána a za posledních 10 let byly z klinického materiálu popsány druhy *T. eboreum*, *M. mirabile*, *T. onychochocla* a *M. aenigmaticum* [10, 42, 43, 46]. Všechny druhy byly podpořeny polyfázickým přístupem a zachyceny u pacientů vyšetřovaných v Evropě, poslední 2 zmiňované druhy dokonce u českých pacientů [42, 43].

Také ekologie některých druhů musela být přehodnocena na základě nových poznatků. Například druh *M. persicolor*, dříve klasifikovaný jako zoofilní, je dnes po lepším poznání ekologie považovaný za geofilní. *M. persicolor* působí infekce u zvířat (často psi) a člověka [44, 45, 75] a spolu s *M. gypseum* a *M. fulvum* patří v některých oblastech k nejběžnějším dermatofytům v půdě [91]. Dále byl synonymizován geofilní druh *M. vanbreuseghemii* s *M. gallinae* považovaným za zoofilní (viz tab. 1), a proto je dnes druh *M. gallinae* také většinou řazen mezi geofilní dermatofyty [31, 34, 59].

BUDOUČÍ TAXONOMIE DERMATOFYTŮ: JEDNO JMÉNO PRO JEDEN DRUH

Budoucí změny ve jménech dermatofytů budou souviset nejen s výsledky fylogenetických studií, ale i novými pravidly zavedenými Kódem [74]. Jedná se zejména o ukončení duálního názvosloví u hub. Původní iniciativa *One fungus, one name* (jedno jméno pro jednu houbu) [38, 110], která zrušení duální nomenklatury prosazovala, nakonec dosáhla zavedení tohoto pravidla do Kódu (prakticky šlo hlavně o zrušení článku 59, který ošetřoval pojmenovávání pleomorfních hub). Taxonomie hub se nyní nachází v přechodném období, kdy je třeba přehodnotit jména všech pleomorfních hub podle těchto pravidel. Rodová jména musí být vybrána podle principů priority (datum publikace) bez ohledu na to, jestli se jedná o jméno pro anamorfu, nebo teleomorfu. Jméno teleomorfy nemá automaticky prioritu, jak navrhovaly některé předchozí systémy. Existují ale případy rodů, kde má méně často používané rodové jméno přednost na základě priority a zavedení změn striktně podle pravidel by znamenalo rozsáhlé a z hlediska uživatelů nepříjemné změny. K dispozici jsou ale nástroje, jak dobře zavedená jména udržet, kterými jsou např. konzervace, nebo zamítnutí některých jmen [39, 74]. Podle nových pravidel také není možné od ledna 2013 navrhovat odlišná jména pro anamorfu a teleomorfu při popisu nových druhů, jak bývalo zvykem u pleomorfních hub.

Duální systém nikdy nepřinášel lékařské mykologii jasný profit, na rozdíl např. od fytopatologie. Kliničtí mykologové se v kulturách téměř vždy setkávají s nepohlavním stadiem houby. To platí nejen pro dermatofyty, ale i další primární, či i oportunní patogeny člověka a zvířat [17]. S pohlavním stadiem se lze u dermatofytů až na výjimky setkat jen na přírodním materiálu, nebo je možné jeho tvorbu indukovat cílenými párovacími experimenty in vit-

ro. Duální systém s sebou nesl i některé nejednoznačnosti. Například nebylo jasné, zda se mají vytvářet odlišná jména pro nepohlavní stadia druhů, která od sebe nejdou jasně morfologicky odlišit, i když pohlavní stadium je jednoznačně odlišné. U několika druhů tak vznikla matoucí situace, kdy např. *M. gypseum* bylo zároveň jménem anamorfy dvou biologických druhů, *Arthroderma gypseum* a *A. incurvatum*. Situace byla vyřešena až v nedávné době, kdy bylo vytvořeno nové jméno *M. incurvatum* [104]. Dnes tedy existují jasné dvojice anamorfa-teleomorfa: *M. incurvatum*-*A. incurvatum* a *M. gypseum*-*A. gypseum*. Podobná situace stále přetrvává u *T. terrestre*, který je zároveň anamorfoou tří biologických druhů, a sice *A. quadrifidum*, *A. lenticulare* a *A. insingulare*.

Nový systém jmen u dermatofytů bude muset respektovat především výsledky fylogenetických studií a nová pravidla Kódu. Výsledkem by měl být systém, kde jednotlivé rody budou mít monofyletický status a každému druhu bude přiřazeno pouze jediné správné jméno. O připravovaných změnách odborná veřejnost již několik let diskutuje a tyto změny budou vycházet především z multigenové fylogeneze skupiny dermatofytů, která bude představena v blízké budoucnosti. Shrnutí budoucích změn bylo představeno v přednášce „Same fungus, new names?“ na kongresu 6th Trends in Medical Mycology (2013, Kodaň, Dánsko; prof. Yvonne Gräser). Fylogenetický strom sestrojený na základě několika genů má velmi podobnou topologii jako strom publikovaný dříve na základě sekvencí ITS rDNA [34], a převážně z těchto dat byl sestrojen i strom na obrázku 1. Výraznější změny se v budoucnu vyhnou antropo- a zoofilním dermatofytům, které tvoří monofyletické skupiny (viz obr. 1) a obsahují typové druhy rodů *Trichophyton* (*T. tonsurans*) a *Microsporum* (*M. audouinii*). Pro druh *A. benhamiae* bude třeba vytvořit novou kombinaci *T. benhamiae*, která zatím oficiálně neexistuje, i když je zřejmé, že druh patří do rodu *Trichophyton*. Dále se diskutuje o poměrně kontroverzním zavedení samostatného jména pro zoofilní kmeny *T. interdigitale*, kde je k dispozici např. jméno *T. granulosum*, pro které by ale musel být vhodně zvolen nový typový materiál. Jméno *T. interdigitale* by se pak týkalo již jen antropofilních kmenů, stejně jako v minulosti. Změna by mohla být výhodná pro klinickou praxi, kde by umožnila používat rozdílná jména pro dvě entity s různou ekologií a působící infekce s odlišnou manifestací (viz obr. 3–4). Nevýhodou takového postupu by byla nutnost sekvenace některých přechodných morfologických forem pro správnou identifikaci, protože ani řada molekulárních metod, včetně MALDI-TOF spektrometrie, antropofilní a zoofilní kmeny kvůli genetické blízkosti nerozliší [44, 77].

Na rozdíl od primárně patogenních dermatofytů se dají rozsáhlé změny jmen očekávat u geofilních dermatofytů. Celosvětově však působí geofilní druhy nejčastěji jen kolem 1 % všech dermatofytóz [89], proto tyto změny zásadně práci kliniků neovlivní. Rodová jména se budou měnit pro geofilní druhy rodů *Trichophyton* a *Microsporum*. Pro geofilní zástupce *Trichophyton* je k dispozici rodové jméno *Keratinomyces*, jehož typový druh je *K. ajelloi* (v současnosti *T. ajelloi*) [111]. Složitější situace je

u geofilních druhů *Microsporum*, které tvoří dvě fylogeneticky odlehle skupiny. První skupina obsahuje klinicky významné druhy jako *M. gypseum* a *M. persicolor*, pro které se nabízí v minulosti používané jméno *Nannizzia* (typový druh *N. incurvata*) [97]. Druhá skupina obsahuje jen málo klinicky významných zástupců, a pravděpodobně pro ni bude použito již dříve navržené jméno *Lophophyton* s typovým druhem *L. gallinae* (dnes *Microsporum gallinae*) [72].

Budoucí systém dermatofytů tak bude pravděpodobně obsahovat šest rodů. Klasické rody *Trichophyton*, *Epidermophyton* a *Microsporum* budou zachovány pro primárně patogenní druhy, zbývající tři rody budou obsahovat geofilní druhy. Tyto změny jsou shrnuty v pravém sloupci tabulky 1 a na obrázku 1 (rodová jména v uvozovkách).

LITERATURA

- ABDEL-RAHMAN, S. M., SUGITA, T., GONZÁLEZ, G. M., et al. Divergence among an international population of *Trichophyton tonsurans* isolates. *Mycopathologia*, 2010, 169, p. 1–13.
- AJELLO, L., GEORG, L. K. In vitro hair cultures for differentiating between atypical isolates of *Trichophyton mentagrophytes* and *Trichophyton rubrum*. *Mycopathologia*, 1957, 8, p. 3–17.
- AJELLO, L., CHENG, S. L. The perfect state of *Trichophyton mentagrophytes*. *Sabouraudia*, 1967, 5, p. 230–234.
- ANZAWA, K., KAWASAKI, M., MOCHIZUKI, T., ISHIZAKI, H. Successful mating of *Trichophyton rubrum* with *Arthroderma simii*. *Med. Mycol.*, 2010, 48, p. 629–634.
- AVISE, J. C., BALL, R. M. *Principles of genealogical concordance in species concepts and biological taxonomy*. In Futuyma, D., Antonovics, J., editors. *Oxford Surveys in Evolutionary Biology*. 7. Oxford: Oxford University Press; 1990, p. 45–67.
- BEGUIN, H., PYCK, N., HENDRICKX, M., et al. The taxonomic status of *Trichophyton quinckeanum* and *T. interdigitale* revisited: a multigene phylogenetic approach. *Med. Mycol.*, 2012, 50, p. 871–882.
- BEGUIN, H., GOENS, K., HENDRICKX, M., et al. Is *Trichophyton simii* endemic to the Indian subcontinent? *Med. Mycol.*, 2013, 51, p. 444–448.
- BÖHME, H. *Arthroderma gertleri* sp. nov., die perfekte form von *Trichophyton vanbreuseghemii* Rioux, Jarry et Juminer. *Mycoses*, 1967, 10, p. 247–252.
- BONIFAZ, A., ARCHER-DUBON, C., SAÚL, A. Tinea imbricata or Tokelau. *Int. J. Dermatol.*, 2004, 43, p. 506–510.
- BRASCH, J., GRÄSER, Y. *Trichophyton eboreum* sp. nov. isolated from human skin. *J. Clin. Microbiol.*, 2005, 43, p. 5230–5237.
- BRAUN, S., JAHN, K., WESTERMANN, A., BRUCHGERHARZ, D., REIFENBERGER, P. D. J. Tinea barbae profunda durch *Arthroderma benhamiae*. *Hautarzt*, 2013, 64, p. 720–722.
- BURKE, J. M., ARNOLD, M. L. Genetics and the fitness of hybrids. *Annu. Rev. Genet.*, 2001, 35, p. 31–52.
- CABAÑES, F. J. Dermatophytes in domestic animals. *Rev. Iberoam. Micol.*, 2000, 17, p. 104–108.
- CAMPBELL, C. K., BORMAN, A. M., LINTON, C. J., BRIDGE, P. D., JOHNSON, E. M. *Arthroderma olidum*, sp. nov. A new addition to the *Trichophyton terrestre* complex. *Med. Mycol.*, 2006, 44, p. 451–459.
- DAWSON, C. O., GENTLES, J. The perfect states of *Keratinomyces ajelloi* van-Breuseghem, *Trichophyton terrestre* Durie & Frey and *Microsporum nanum* Fuentes. *Sabouraudia*, 1962, 1, p. 49–57.
- DE HOOG, G. S., GUARRO, J., GENE, J., FIGUERAS, M. *J. Atlas of Clinical Fungi*. 2nd edn. Utrecht: Centraalbureau voor Schimmelcultures, 2000, 1126 p.
- DE HOOG, G. S., GUARRO, J., GENÉ, J., FIGUERAS, M. *J. Atlas of Clinical Fungi*. 3rd. CD-ROM ed. Utrecht: CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, 2009, p.
- DENG, S., BULMER, G., SUMMERBELL, R., et al. Changes in frequency of agents of tinea capitis in school children from Western China suggest slow migration rates in dermatophytes. *Med. Mycol.*, 2008, 46, p. 421–427.
- EMMONS, C. W. Dermatophytes: natural grouping based on the form of the spores and accessory organs. *Arch. Derm. Syphilol.*, 1934, 30, p. 337–362.
- EMMONS, C. W., BINFORD, C. H., UTZ, J. P. *Medical mycology*. Philadelphia: Lea & Febiger, 1970, 508 p.
- FARI, E., GRÄSER, Y. An epidemic of tinea corporis caused by *Trichophyton tonsurans* among children (wrestlers) in Germany. *Mycoses*, 2000, 43, p. 191–196.
- FUMEAUX, J., MOCK, M., NINET, B., et al. First report of *Arthroderma benhamiae* in Switzerland. *Dermatology*, 2004, 208, p. 244–250.
- GEORG, L. K., CAMP, L. B. Routine nutritional tests for the identification of dermatophytes. *J. Bacteriol.*, 1957, 74, p. 113–121.
- GEORG, L. K. Epidemiology of the dermatophytoses sources of infection, modes of transmission and epidemicity. *Ann. N Y Acad. Sci.*, 1960, 89, p. 69–77.
- GRÄSER, Y., EL FARI, M., STERRY, W., PRESBER, W., TIETZ, H. Identification of common dermatophytes (*Trichophyton*, *Microsporum*, *Epidermophyton*) using polymerase chain reactions. *Brit. J. Dermatol.*, 1998, 138, p. 576–582.
- GRÄSER, Y., EL FARI, M., VILGALYS, R., et al. Phylogeny and taxonomy of the family Arthrodermataceae (dermatophytes) using sequence analysis of the ribosomal ITS region. *Med. Mycol.*, 1999, 37, p. 105–114.
- GRÄSER, Y., KUIJPERS, A. F. A., PRESBER, W., DE HOOG, G. S. Molecular taxonomy of *Trichophyton mentagrophytes* and *T. tonsurans*. *Med. Mycol.*, 1999, 37, p. 315–330.
- GRÄSER, Y., DE HOOG, G. S., KUIJPERS, A. F. A. Recent advances in the molecular taxonomy of dermatophytes. *Rev. Iberoam. Micol.*, 2000, 17, p. 17–21.
- GRÄSER, Y., KUIJPERS, A. F. A., EL FARI, M., PRESBER, W., DE HOOG, G. S. Molecular and conventional taxonomy of the *Microsporum canis* complex. *Med. Mycol.*, 2000, 38, p. 143–153.
- GRÄSER, Y., KUIJPERS, A. F. A., PRESBER, W., DE HOOG, G. S. Molecular taxonomy of the *Trichophyton rubrum* complex. *J. Clin. Microbiol.*, 2000, 38, p. 3329–3336.
- GRÄSER, Y. *Molekulare Systematik und Evolution der Spezies der Familie Arthrodermataceae (Dermatophyten)*. Berlin: Humboldt-Universität; 2002.
- GRÄSER, Y., DE HOOG, G. S., SUMMERBELL, R. Dermatophytes: recognizing species of clonal fungi. *Med. Mycol.*, 2006, 44, p. 199–209.
- GRÄSER, Y., FRÖHLICH, J., PRESBER, W., DE HOOG, G. S.

- S. Microsatellite markers reveal geographic population differentiation in *Trichophyton rubrum*. *J. Med. Microbiol.*, 2007, 56, p. 1058–1065.
34. GRÄSER, Y., SCOTT, J., SUMMERBELL, R. The new species concept in dermatophytes – a polyphasic approach. *Mycopathologia*, 2008, 166, p. 239–256.
 35. GUPTA, A., KOHLI, Y., SUMMERBELL, R. Exploratory study of single-copy genes and ribosomal intergenic spacers for rapid distinction of dermatophytes. *Stud. Mycol.*, 2002, p. 87–96.
 36. HARMSSEN, D., SCHWINN, A., WEIG, M., BRÖCKER, E. B., HESESEMAN, J. Phylogeny and dating of some pathogenic keratinophilic fungi using small subunit ribosomal RNA. *J. Med. Vet. Mycol.*, 1995, 33, p. 299–303.
 37. HAVLICKOVA, B., CZAİKA, V., FRIEDRICH, M. Epidemiological trends in skin mycoses worldwide. *Mycoses*, 2008, 51 (Suppl. 4), p. 2–15.
 38. HAWKSWORTH, D. L., CROUS, P. W., REDHEAD, S. A., et al. The Amsterdam declaration on fungal nomenclature. *IMA Fungus*, 2011, 2, p. 105–112.
 39. HAWKSWORTH, D. L. Managing and coping with names of pleomorphic fungi in a period of transition. *IMA Fungus*, 2012, 3, p. 15–24.
 40. HEIDEMANN, S., MONOD, M., GRÄSER, Y. 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.*, 2010, 162, p. 282–295.
 41. HUBÁLEK, Z. Keratinophilic fungi associated with free-living mammals and birds. In: Kushwaha, R.K.S., GUARRO, J, editors. *Biology of Dermatophytes*. Bilbao: Revista Iberoamericana de Micología; 2000, p. 93–103.
 42. HUBKA, V., CMOKOVA, A., SKOREPOVA, M., MIKULA, P., KOLARIK, M. *Trichophyton onychocola* sp. nov. isolated from human nail. *Med. Mycol.*, 2014, 52, p. 285–292.
 43. HUBKA, V., DOBIASOVA, S., DOBIAS, R., KOLARIK, M. *Microsporium aenigmaticum* sp. nov. from *M. gypseum* complex, isolated as a cause of tinea corporis. *Med. Mycol.*, 2014, 52, p. 387–396.
 44. HUBKA, V., VĚTROVSKÝ, T., DOBIÁŠOVÁ, S., et al. Molekulární epidemiologie dermatofytóz v České republice: výsledky dvouleté studie. *Čes.-slov. Derm.*, 2014, 89, 4, p. 167–174.
 45. CHEN, W., SEIDL, H. P., RING, J., SCHNOPP, C. Two pediatric cases of *Microsporium persicolor* infection. *Int. J. Dermatol.*, 2012, 51, p. 204–206.
 46. CHOI, J. S., GRÄSER, Y., WALTHER, G., et al. *Microsporium mirabile* and its teleomorph *Arthroderma mirabile*, a new dermatophyte species in the *M. cookei* clade. *Med. Mycol.*, 2012, 50, p. 161–169.
 47. JACKSON, C. J., BARTON, R. C., EVANS, E. G. V. Species identification and strain differentiation of dermatophyte fungi by analysis of ribosomal-DNA intergenic spacer regions. *J. Clin. Microbiol.*, 1999, 37, p. 931–936.
 48. JACKSON, C. J., BARTON, R. C., KELLY, S. L., EVANS, E. G. V. Strain identification of *Trichophyton rubrum* by specific amplification of subrepeat elements in the ribosomal DNA nontranscribed spacer. *J. Clin. Microbiol.*, 2000, 38, p. 4527–4534.
 49. KANBE, T., SUZUKI, Y., KAMIYA, A., et al. PCR-based identification of common dermatophyte species using primer sets specific for the DNA topoisomerase II genes. *J. Dermatol. Sci.*, 2003, 32, p. 151–161.
 50. KANBE, T., SUZUKI, Y., KAMIYA, A., et al. Species-identification of dermatophytes *Trichophyton*, *Microsporium* and *Epidermophyton* by PCR and PCR-RFLP targeting of the DNA topoisomerase II genes. *J. Dermatol. Sci.*, 2003, 33, p. 41–54.
 51. KANE, J., SIGLER, L., SUMMERBELL, R. C. Improved procedures for differentiating *Microsporium persicolor* from *Trichophyton mentagrophytes*. *J. Clin. Microbiol.*, 1987, 25, p. 2449–2452.
 52. KANE, J., SUMMERBELL, R., SIGLER, L., KRAJDEN, S., LAND, G. *Laboratory handbook of dermatophytes: a clinical guide and laboratory handbook of dermatophytes and other filamentous fungi from skin, hair, and nails*. Belmont, California: Star Publishing, 1997, 344 p.
 53. KANO, R., NAKAMURA, Y., YASUDA, K., et al. The first isolation of *Arthroderma benhamiae* in Japan. *Microbiol. Immunol.*, 1998, 42, p. 575–578.
 54. KANO, R., NAKAMURA, Y., WATANABE, S., TSUJIMOTO, H., HASEGAWA, A. Phylogenetic relation of *Epidermophyton floccosum* to the species of *Microsporium* and *Trichophyton* in chitin synthase I (CHS1) gene sequences. *Mycopathologia*, 1999, 146, p. 111–113.
 55. KANO, R., OKABAYASHI, K., NAKAMURA, Y., et al. Differences among chitin synthase I gene sequences in *Trichophyton rubrum* and *T. violaceum*. *Med. Mycol.*, 2000, 38, p. 47–50.
 56. KANO, R., YOSHIDA, E., YAGUCHI, T., et al. Mating type gene (MAT1-2) of *Trichophyton verrucosum*. *Mycopathologia*, 2014, 177, p. 103–112.
 57. KASZUBIAK, A., KLEIN, S., DE HOOG, G. S., GRÄSER, Y. Population structure and evolutionary origins of *Microsporium canis*, *M. ferrugineum* and *M. audouinii*. *Infect. Genet. Evol.*, 2004, 4, p. 179–186.
 58. KATOH, K., STANDLEY, D. M. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Mol. Biol. Evol.*, 2013, 30, p. 772–780.
 59. KAWASAKI, M., AOKI, M., ISHIZAKI, H. Phylogenetic relationships of some *Microsporium* and *Arthroderma* species inferred from mitochondrial DNA analysis. *Mycopathologia*, 1995, 130, p. 11–21.
 60. KAWASAKI, M., ANZAWA, K., TAKEDA, K., et al. Genetic and phenotypic variations among F1 progenies of *Arthroderma benhamiae*. *Jap. J. Med. Mycol.*, 2008, 49, p. 103–110.
 61. KAWASAKI, M., ANZAWA, K., WAKASA, A., et al. Different genes can result in different phylogenetic relationships in *Trichophyton* species. *Jap. J. Med. Mycol.*, 2008, 49, p. 311–318.
 62. KAWASAKI, M., ANZAWA, K., MOCHIZUKI, T., ISHIZAKI, H., M. HEMASHETTAR, B. Successful mating of a human isolate of *Arthroderma simii* with a tester strain of *A. vanbreuseghemii*. *Med. Mycol. J.*, 2009, 50, p. 15–18.
 63. KAWASAKI, M., ANZAWA, K., WAKASA, A., et al. Matings among three teleomorphs of *Trichophyton mentagrophytes*. *Jap. J. Med. Mycol.*, 2010, 51, p. 143–152.
 64. KAWASAKI, M. Verification of a taxonomy of dermatophytes based on mating results and phylogenetic analyses. *Med. Mycol. J.*, 2011, 52, p. 291–295.
 65. KIELSTEIN, P., WOLF, H., GRÄSER, Y., BUZINA, W., BLANZ, P. On the variability of *Trichophyton verrucosum* isolates from vaccinated herds with ringworm of cattle. *Mycoses*, 1998, 41 (Suppl. 2), p. 58–64.
 66. KRAEMER, A., HEIN, J., HEUSINGER, A., MUELLER,

- R. Clinical signs, therapy and zoonotic risk of pet guinea pigs with dermatophytosis. *Mycoses*, 2013, 56, p. 168–172.
67. KUKLOVÁ, I., KUČEROVÁ, H. Dermatophytoses in Prague, Czech Republic, between 1987 and 1998. *Mycoses*, 2001, 44, p. 493–496.
 68. LECLERC, M., PHILIPPE, H., GUEHO, E. Phylogeny of dermatophytes and dimorphic fungi based on large subunit ribosomal RNA sequence comparisons. *J. Med. Vet. Mycol.*, 1994, 32, p. 331–341.
 69. LIU, D., COLOE, S., BAIRD, R., PEDERSEN, J. Application of PCR to the identification of dermatophyte fungi. *J. Med. Microbiol.*, 2000, 49, p. 493–497.
 70. LYSKOVÁ, P., HUBKA, V., BODNÁROVÁ, J. Případ tinea corporis vyvolaný *Microsporum incurvatum*, geofilním druhem příbuzným *M. gypseum*. *Čes.-slov. Derm.*, 2014, 89, 4, p. 187–191.
 71. MALLÁTOVÁ, N., JANATOVÁ, H., KOCOURKOVÁ, K., et al. Arthroderma benhamiae jako původce tinea capitis profunda a tinea corporis u dětských pacientů. *Čes.-slov. Derm.*, 2014, 89, 4, p. 199–204.
 72. MATRUCHOT, L., DASSONVILLE, C. Recherches expérimentales sur une dermatomycose des poules et sur son parasite. *Rev. Gen. Bot.*, 1899, 11, p. 429–444.
 73. MAYR, E. *Systematics and the origin of species, from the viewpoint of a zoologist*. Cambridge: Harvard University Press, 1942, 334 p.
 74. MCNEILL, J., BARRIE, F. R., BUCK, W. R., et al. *International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants (Melbourne Code) adopted by the Eighteenth International Botanical Congress Melbourne, Australia, July 2011*. Königstein: Regnum Vegetabile 154, Koeltz Scientific Books, 2012, 240 p.
 75. MULLER, A., GUAGUŕRE, E., DEGORCE-RUBIALES, F., BOURDOISEAU, G. Dermatophytosis due to *Microsporum persicolor*: a retrospective study of 16 cases. *Can. Vet. J.*, 2011, 52, p. 385–388.
 76. NENOFF, P., HERRMANN, J., GRÄSER, Y. *Trichophyton mentagrophytes sive interdigitale?* A dermatophyte in the course of time. *J. Dtsch. Dermatol. Ges.*, 2007, 5, p. 198–202.
 77. NENOFF, P., ERHARD, M., SIMON, J. C., et al. MALDI-TOF mass spectrometry—a rapid method for the identification of dermatophyte species. *Med. Mycol.*, 2013, 51, p. 17–24.
 78. OHST, T., DE HOOG, S., PRESBER, W., STAVRAKIEVA, V., GRÄSER, Y. Origins of microsatellite diversity in the *Trichophyton rubrum*-*T. violaceum* clade (dermatophytes). *J. Clin. Microbiol.*, 2004, 42, p. 4444–4448.
 79. PADHYE, A., CARMICHAEL, J. Mating reactions in the *Trichophyton terrestre* complex. *Med. Mycol.*, 1973, 11, p. 64–69.
 80. PAPEGAAY, J. Over pathogene huidschimmels in Amsterdam voorkomend bij den mensch. *Ned. Tijdschr. Geneeskd.*, 1925, 69, p. 879–890.
 81. PHILPOT, C. The differentiation of *Trichophyton mentagrophytes* from *T. rubrum* by a simple urease test. *Med. Mycol.*, 1967, 5, p. 189–193.
 82. PROBST, S., DE HOOG, G. S., GRÄSER, Y. Development of DNA markers to explore host shifts in dermatophytes. *Stud. Mycol.*, 2002, p. 57–74.
 83. REBELL, G., TAPLIN, D. *Dermatophytes. Their recognition and identification*. 2nd ed. Miami: University of Miami Press, 1970, 124 p.
 84. REZAEI-MATEHKOLAEI, A., MAKIMURA, K., DE HOOG, G. S., et al. Discrimination of *Trichophyton tonsurans* and *Trichophyton equinum* PCR-RFLP and by beta-tubulin and translation elongation factor 1-alpha sequencing. *Med. Mycol.*, 2012, 50, p. 760–764.
 85. REZAEI-MATEHKOLAEI, A., MAKIMURA, K., DE HOOG, G. S., et al. Multilocus differentiation of the related dermatophytes *Microsporum canis*, *Microsporum ferrugineum* and *Microsporum audouinii*. *J. Med. Microbiol.*, 2012, 61, p. 57–63.
 86. REZAEI-MATEHKOLAEI, A., MAKIMURA, K., DE HOOG, S., et al. Molecular epidemiology of dermatophytosis in Tehran, Iran, a clinical and microbial survey. *Med. Mycol.*, 2013, 51, p. 203–207.
 87. SABOURAUD, R. J. A. *Les teignes*. Paris: Masson & Co., 1910, 855 p.
 88. SCOTT, D. An outbreak of ringworm in karakul sheep caused by a physiological variant of *Trichophyton verrucosum* Bodin. *Onderstepoort J. Vet. Res.*, 1975, 42, p. 49–52.
 89. SEEBACHER, C., BOUCHARA, J.-P., MIGNON, B. Updates on the epidemiology of dermatophyte infections. *Mycopathologia*, 2008, 166, p. 335–352.
 90. SHARMA, R., RAJAK, R. C., PANDEY, A. K., GRÄSER, Y. Internal Transcribed Spacer (ITS) of rDNA of appendaged and non-appendaged strains of *Microsporum gypseum* reveals *Microsporum appendiculatum* as its synonym. *Antonie Leeuwenhoek*, 2006, 89, p. 197–202.
 91. SHARMA, R., PRESBER, W., RAJAK, R. C., GRÄSER, Y. Molecular detection of *Microsporum persicolor* in soil suggesting widespread dispersal in central India. *Med. Mycol.*, 2008, 46, p. 67–73.
 92. SCHAUDER, S., KIRSCH-NIETZKI, M., WEGENER, S., SWITZER, E., QADRIPUR, S. Von Igel auf Menschen. Zoophile Dermatomykose durch *Trichophyton erinacei* bei 8 Patienten. *Hautarzt*, 2007, 58, p. 62–67.
 93. SIEKLUCKI, U., OH, S. H., HOYER, L. L. Frequent isolation of *Arthroderma benhamiae* from dogs with dermatophytosis. *Vet. Dermatol.*, 2014, 25, p. 39–41.
 94. SITTERLE, E., FREALLE, E., FOULET, F., et al. *Trichophyton bulbosum*: a new zoonotic dermatophyte species. *Med. Mycol.*, 2012, 50, p. 305–309.
 95. SKOŘEPOVÁ, M., HUBKA, V., POLÁŠKOVÁ, S., STARÁ, J., ČMOKOVÁ, A. Naše první zkušenosti s infekcemi vyvolanými *Arthroderma benhamiae* (*Trichophyton sp.*). *Čes.-slov. Derm.*, 2014, 89, 4, p. 192–198.
 96. STOCKDALE, P. *Sexual stimulation between Arthroderma simii and other dermatophytes*. In: Vanbreuseghem, R. R., De Droey, C., editors. Sexuality and pathogenicity of fungi. New York: Masson; 1981, p. 57–68.
 97. STOCKDALE, P. M. *Nannizzia incurvata* gen. nov., sp. nov., a perfect state of *Microsporum gypseum* (Bodin) Guirart et Grigorakis. *Sabouraudia*, 1962, 1, p. 41–48.
 98. STOCKDALE, P. M. The *Microsporum gypseum* complex (*Nannizzia incurvata* Stockd., *N. gypsea* (Nann.) comb. nov., *N. fulva* sp. nov.). *Sabouraudia*, 1964, 3, p. 114–126.
 99. STOCKDALE, P. M. *Nannizzia persicolor* sp. nov., the perfect state of *Trichophyton persicolor* Sabouraud. *Med. Mycol.*, 1967, 5, p. 355–359.
 100. SUMMERBELL, R. C., ROSENTHAL, S. A., KANE, J. Rapid method for differentiation of *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes*, and related dermatophyte species. *J. Clin. Microbiol.*, 1988, 26, p. 2279–2282.
 101. SUMMERBELL, R. C. Form and function in the evolution of dermatophytes. *Rev. Iberoam. Micol.*, 2000, 17, p. 30–43.
 102. SUMMERBELL, R. C., WEITZMAN, I., PADHYE,

- A. A. The *Trichophyton mentagrophytes* complex: biological species and mating type prevalences of North American isolates, and a review of the worldwide distribution and host associations of species and mating types. *Stud. Mycol.*, 2002, 47, p. 75–86.
103. SUMMERBELL, R. C., MOORE, M. K., STARINK-WILLEMSE, M., VAN IPEREN, A. ITS barcodes for *Trichophyton tonsurans* and *T. equinum*. *Med. Mycol.*, 2007, 45, p. 193–200.
104. SUN, P. L., MU, C.-A., FAN, C. C., et al. Cat favus caused by *Microsporum incurvatum* comb. nov.: The clinical and histopathological features and molecular phylogeny. *Med. Mycol.*, 2014, 52, p. 276–284.
105. SYMOENS, F., JOUSSON, O., PLANARD, C., et al. Molecular analysis and mating behaviour of the *Trichophyton mentagrophytes* species complex. *Int. J. Med. Microbiol.*, 2011, 301, p. 260–266.
106. SYMOENS, F., JOUSSON, O., PACKEU, A., et al. The dermatophyte species *Arthroderma benhamiae*: intraspecific variability and mating behaviour. *J. Med. Microbiol.*, 2013, 62, p. 377–385.
107. TAKEDA, K., NISHIBU, A., ANZAWA, K., MOCHIZUKI, T. Molecular epidemiology of a major subgroup of *Arthroderma benhamiae* isolated in Japan by restriction fragment length polymorphism analysis of the non-transcribed spacer region of ribosomal RNA gene. *Jpn. J. Infect. Dis.*, 2012, 65, p. 233–239.
108. TAMURA, K., STECHER, G., PETERSON, D., FILIPSKI, A., KUMAR, S. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.*, 2013, 30, p. 2725–2729.
109. TANAKA, S., SUMMERBELL, R. C., TSUBOI, R., et al. Advances in dermatophytes and dermatophytosis. *J. Med. Vet. Mycol.*, 1992, 30, p. 29–39.
110. TAYLOR, J. W. One fungus = one name: DNA and fungal nomenclature twenty years after PCR. *IMA fungus*, 2011, 2, p. 113–120.
111. VANBREUSEGHEM, R. Interzít theorique et pratique d'un nouveau dermatophyte isolée du sol: *Keratinomyces ajelloi* gen. nov., sp. nov. *Bull. Acad. R. Sci. Belg., Cl. Sci.*, 1952, 38, p. 1068–1077.
112. WEITZMAN, I., PADHYE, A. Is *Arthroderma simii* the perfect state of *Trichophyton quinckeanum*? *Sabouraudia*, 1976, 14, p. 65–74.
113. WEITZMAN, I., MCGINNIS, M., PADHYE, A., AJELLO, L. The genus *Arthroderma* and its later synonym *Nannizzia*. *Mycotaxon*, 1986, 25, p. 505–518.
114. WEITZMAN, I., SUMMERBELL, R. C. The dermatophytes. *Clin. Microbiol. Rev.*, 1995, 8, p. 240–259.
115. WOODGYER, A. The curious adventures of *Trichophyton equinum* in the realm of molecular biology: a modern fairy tale. *Med. Mycol.*, 2004, 42, p. 397–403.
116. YOUNG, C. N. Pseudo-cleistothecia in *Trichophyton rubrum*. *Sabouraudia*, 1968, 6, p. 160–162.

Poděkování: Projekt byl podpořen projektem GAUK1344214.

Do redakce došlo dne 14. 7. 2014.

Adresa pro korespondenci:

Mgr. Vít Hubka

Katedra botaniky, Přírodovědecká fakulta

Univerzita Karlova v Praze

Benátská 2

128 01 Praha 2

e-mail: hubka@biomed.cas.cz

EDIČNÍ PLÁN

Česko-slovenská dermatologie, 89. ročník, rok 2014

Číslo 5: Potní žlázy

Číslo 6: Fytofotodermatózy

Česko-slovenská dermatologie, 90. ročník, rok 2015

Číslo 1: Autoinflamatorní onemocnění

Číslo 2: Edukace

Číslo 3: Kandidózy

DOŠKOLOVÁNÍ LÉKAŘŮ

KONTROLNÍ TEST

1. Mezi zoofilní dermatofyty nepatří:

- a) *Microsporum canis*
- b) *Microsporum persicolor*
- c) *Trichophyton verrucosum*
- d) *Trichophyton erinacei*

2. Nejdůležitějším zdrojem infekcí způsobených

A. benhamiae v Evropě je:

- a) půda
- b) morčata a jiní hlodavci
- c) kočky
- d) bazény, sauny a sprchy

3. Duálním názvoslovím (dual nomenclature) u hub se rozumí:

- a) dvouslovné vědecké názvy druhů hub (rodové a druhové jméno)
- b) navržení stejného druhového jména nezávisle na sobě různými autory
- c) odlišný systém jmen používaný lékařskými mykology
- d) používání odlišného jména pro pohlavní a nepohlavní stadium téhož druhu

4. Které tvrzení o druhu *Trichophyton mentagrophytes* v jeho novém pojetí je nepravdivé:

- a) je původcem infekcí typu favus u myší a velbloudů
- b) jeho endemickými oblastmi jsou především Blízký a Střední východ a Afrika
- c) izoláty dříve určované jako *T. mentagrophytes* patří dnes hlavně do *T. interdigitale*
- d) jedná se o běžný druh na našem území

5. Nejčastěji na člověka přenášeným zoofilním dermatofytem je v současnosti v ČR:

- a) *Arthroderma benhamiae*
- b) *Trichophyton mentagrophytes*
- c) *Microsporum canis*
- d) *Trichophyton interdigitale*

6. Infekce způsobené antropofilními kmeny *Trichophyton interdigitale* se nejčastěji manifestují jako:

- a) tinea faciei a tinea barbae
- d) tinea pedis a tinea unguium
- b) tinea corporis a tinea cruris
- c) tinea capitis (endothrix)

7. Zoofilní kmeny *Trichophyton interdigitale*:

- a) tvoří v kultuře nejčastěji bílé, vzdušné kolonie se žlutou spodinou
- b) působí infekce typu tinea pedis a tinea unguium
- c) působí infekce typu tinea corporis, jejichž incidence výrazně roste s věkem pacientů
- d) mají široké hostitelské spektrum zahrnující mimo jiné hlodavce, psy a kočky

8. Které tvrzení platí o současném pohledu na druhy *Trichophyton tonsurans* a *T. equinum*:

- a) *T. equinum* je synonymem *T. tonsurans*
- b) *T. tonsurans* je synonymem *T. equinum*
- c) jedná se o samostatné druhy s odlišnými primárními hostiteli
- d) jedná se o samostatné druhy se stejnými primárními hostiteli

9. Geofilní dermatofyty:

- a) působí v rozvinutých zemích jen asi 1 % všech dermatofytóz
- b) jsou druhově málo početnou skupinou ve srovnání s antropofilními dermatofyty
- c) nečekají v budoucnu výrazné taxonomické změny
- d) se běžně přenáší i mezilidským kontaktem

10. Iniciativa *One fungus, one name* (jedno jméno pro jednu houbu):

- a) dosáhla oficiálního zrušení duální nomenklatury u hub
- b) se snažila o zavedení jednoslovného pojmenovávání hub
- c) prosazovala systém založený na jménech nepohlavního stadia
- d) prosazovala systém založený na jménech pohlavního stadia

Pozn. Správným zodpovězením otázek kontrolního testu získáte 2 kredity kontinuálního vzdělávání lékařů ČLK, které budou zasílány redakci jedenkrát ročně po uzavření ročníku časopisu. Správné odpovědi na otázky kontrolního testu budou uveřejněny v příštím čísle časopisu. Odpovědi pošlete na e-mailovou adresu: kozni@lf1.cuni.cz vždy nejpozději do jednoho měsíce od vydání daného čísla.

Odpovědi na otázky kontrolního testu publikovaném v č. 2/2014:

Pánková R.: Psychofarmaka v dermatologii

Správné odpovědi: 1a, 2a, 3d, 4c, 5d, 6d, 7b, 8d, 9a, 10d.

Článek 5



Original Article

Trichophyton onychocola sp. nov. isolated from human nail

Vit Hubka^{1,2,*}, Adela Cmokova¹, Magdalena Skorepova³, Peter Mikula⁴ and Miroslav Kolarik^{1,2}

¹Department of Botany, Faculty of Science, Charles University in Prague, ²Laboratory of Fungal Genetics and Metabolism, Institute of Microbiology of the AS CR, v.v.i., Vídeňská 1083, 142 20 Praha 4, ³Dermatology and Venerology, First Faculty of Medicine, Charles University in Prague and General University Hospital in Prague and ⁴Department of Zoology, Faculty of Science, Charles University in Prague, Viničná 7, 128 43 Praha 2, Czech Republic

*To whom correspondence should be addressed. Vit Hubka, Department of Botany, Faculty of Science, Charles University in Prague, Benatska 2, 128 01 Prague 2, Czech Republic. Tel: (+420) 739663218; Fax: (+420) 29644 2347; E-mail: hubka@biomed.cas.cz

Received 5 May 2013; Revised 9 August 2013; Accepted 21 August 2013

Abstract

A previously undescribed *Trichophyton* species was isolated from the nail of a 33-year-old man with a history of probable distal lateral subungual onychomycosis (without confirmation by mycological examination). The infection occurred for the first time five years earlier (in 2006) and affected the right great toenail, with complete clinical remission after treatment with ciclopirox olamine. This undescribed species was isolated during probable relapse in 2011, but its etiological significance was not confirmed, that is, direct microscopy was negative and additional clinical samples were not collected. The species is probably geophilic based on phylogenetic analysis (internal transcribed spacer [ITS] rDNA) and is most closely related to the anamorphic *T. thuringiense*, homothallic *Arthroderma ciferrii* (anamorph *T. georgiae*), and heterothallic *A. melis*. The new species is characterized by yellowish colonies, red reverse on several media, positive urease test, negative hair-perforation test, absence of growth at 34°C, absence of macroconidia, formation of one-celled clavate microconidia, and spiral hyphae. The species grows well on sterilized human hairs placed on agar medium without any additional nutrients and forms gymnothecium-like structures covered by peridial hyphae. The combination of unique micro- and macromorphological features and physiological and sequence data from four unlinked loci (ITS, *benA*, *RPB2*, and *act1* gene) justified the proposal of a new species *T. onychocola* sp. nov.

Key words: *Arthroderma*, geophilic dermatophytes, keratinophilic fungi, onychomycosis, Onygenales, tinea unguinum.

The European Molecular Biology Laboratory (EMBL) database accession numbers for the internal transcribed spacer rDNA, *benA*, *RPB2*, and *act1* of the ex-type strain of *Trichophyton onychocola* sp. nov. are

HF937405, HF937401, HF937393, and HF937400, respectively.

The MycoBank (<http://www.mycobank.org>) accession number for *Trichophyton onychocola* sp. nov. is MB804199.

Introduction

Dermatophytes are members of the order Onygenales and are one of the most common human and animal pathogens. In the last two decades, substantial changes have been made in the taxonomy of dermatophytes based on data derived using molecular methods [1,2]. Numerous names of well-recognized species have been synonymized, some of them then reappraised and their separate species status again justified. The species concept in anthropophilic and zoophilic dermatophytes is especially problematic as they represent phylogenetically young and genetically similar species with incomplete reproductive barriers [3–6]. Genealogical concordance, phylogenetic species recognition, and biological species concept (based on mating experiments), which are popular in many fungal groups, have limited application as separate identification procedures in these taxa [4,5,7]. In contrast, the DNA sequence divergencies in geophilic dermatophytes are much more pronounced than in anthropophilic and zoophilic species, and species boundaries can be also established using mating experiments [3,8–10]. Only two dermatophytic species, *Trichophyton eboreum* (teleomorph *Arthroderma olidum*) [8,9] and *Microsporum mirabile* (teleomorph *A. mirabile*) [10], were described in the last two decades despite the increasing application of molecular taxonomic techniques. Other taxa described in this period [11,12] were later synonymized with previously described species [2,13].

During a two-year molecular–epidemiological study that focused on dermatophytes, with the exception of *T. rubrum*, in the Czech Republic, a species with unusual morphological features was isolated from a case of suspected onychomycosis. This species showed a unique fingerprinting pattern and internal transcribed spacer [ITS] rDNA sequence [Hubka V, et al. One year overview of non-*T. rubrum* dermatophytes isolated in Czech Republic and identified by molecular methods. 18th Congress of the International Society for Human and Animal Mycology, Berlin, Germany, 2012, P541]. Additional morphological, physiological, and molecular data collected in this study confirmed isolation of an undescribed species that is described here based on a polyphasic approach.

Case report

A 33-year-old man presented in November 2011 with suspected onychomycosis of his right great toenail. Yellow discoloration, hyperkeratosis, and onycholysis were present on the medial margin of the plate of the entire nail; other toenails as well as fingernails were without abnormalities. There was a history of probable onychomycosis (not verified by mycological examination) of the same nail five years previously (in 2006) that had been treated with 1%

ciclopirox olamine solution. However, the nail abnormalities reappeared 12 months after the initial remission associated with the indicated treatment. A working diagnosis of recurrent distal lateral subungual onychomycosis was made, and the patient underwent mycological examination to confirm the diagnosis.

At the time of nail sampling, the patient was treated with perindopril for hypertension and was dispensarized due to suspected glomerulonephritis. The patient did not have diabetes, peripheral arterial disease, or psoriasis and had not undergone any immunosuppressive treatment. He did not take any other medication on a regular basis, and also his professional history was insignificant.

The mycological examination was performed in November 2011; the direct microscopic nail examination was negative for the presence of fungi (20% KOH). Remaining portions of the clinical samples were placed on two slants of Sabouraud glucose agar (SGA) without chloramphenicol (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) and one slant of SGA with chloramphenicol containing 400 mg/l of cycloheximide (Fluka, Buchs, Switzerland). A pure culture of a fungus was observed that was first identified as *T. rubrum* based on intensive red reverse pigmentation on SGA slants. Later, the colonies became granular, and abundant spiral hyphae were observed. These hyphae precipitated, in turn, modifying the identification to probable *T. mentagrophytes* (*T. interdigitale* according to the recent taxonomy). The isolate was sent to the Department of Botany, Charles University, Prague, where further morphological, physiological, and molecular analyses were conducted. Neither treatment nor further examination were possible because the patient did not return for therapy.

Materials and methods

Cultivation, morphology, and preservation

The isolates were grown on a set of media that included malt extract agar (MEA; Oxoid, Basingstoke, UK), SGA [14], potato dextrose agar (PDA; Roth, Karlsruhe, Germany), potato carrot agar (PCA) [14], and oatmeal agar (OA; Oxoid). A second set of media was supplemented with sterilized hair from blond children and placed on the medium surface, which consisted of OA, Takashio medium (1 g peptone, 2 g glucose, 1 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 1 g KH_2PO_4 , and 20 g distilled water), and agar medium without any other additions (20 g agar and 1000 ml distilled water). The plates were incubated at 25°C in the dark and checked weekly for 3 months for growth and morphologic features. Colony color determinations were made using the ISCC-NBS Centroid Color Charts (Foster, J. C., 2004; <http://tx4.us/nbs/nbs-1.htm>). Growth at 27, 30, 34, and 37°C was evaluated on MEA after incubation for

7 days. An *in vitro* hair perforation test and a urease test were performed in accordance with the report by Ajello and Georg [15] and Philpot [16], respectively. The ex-type strain of *T. onychocola* was deposited into the Culture Collection of Fungi (CCF), Department of Botany, Charles University in Prague (CCF 4259^T) and into the Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS), Utrecht, Netherlands (CBS 132920^T).

Molecular studies

DNA was isolated as described by Hubka et al. [17]. Polymerase chain reaction (PCR) conditions used for amplification of the ITS region, partial *benA* gene (encoding beta-tubulin), and partial *RPB2* (encoding RNA polymerase beta) were as described by Nováková et al. [18]. The *act1* locus (encoding actin) was amplified using primers *ACT-512F* (5'-ATGTGCAAGGCCGGTTTCGC) and *ACT-783R* (5'-TACGAGTCCTTCTGGCCCAT); the annealing temperature was 60°C. PCR product purification and sequencing were performed at MacroGen Europe (Netherlands, Amsterdam) using the terminal primers. The sequences were inspected and alignments were performed as described by Hubka and Kolařík [19]. Maximum-likelihood (ML) analysis was performed using the same parameters as those described by Nováková et al. [18]. Additional alignment characteristics are listed in the caption of Fig. 1. Sequences were deposited into the EMBL database under accession numbers listed in Fig. 1 (bold print).

Results

Molecular analysis

The ITS rDNA region of isolate CCF 4259 (=CBS 132920) showed 96%–97% similarity when using BLAST similarity search to the ex-type isolate of *A. melis* CBS 669.80^T (766/787 bp; AJ877216), *T. thuringiense* CBS 417.71^T (762/786 bp; AJ877215), and *A. ciferrii* CBS 272.66^T (554/578 bp; AJ877217). In phylogenetic analysis, these taxa created a well-supported clade (Fig. 1) that was located in between other geophilic *Trichophyton* species. Three additional loci (*benA*, *RPB2*, and *act1*) were sequenced in the ex-type isolates of mentioned species. In all three cases, the isolate CCF 4259 was found to have only a 93%–96% similarity to these taxa, suggesting discovery of an undescribed species.

Taxonomy

Trichophyton onychocola Cmokova, Hubka, Skorepova & M. Kolařík sp. nov., MB804199, Figs 2 and 3.

Diagnosis: The species has yellowish colonies with red reverse on SGA, PCA, and PDA; is unable to grow at

34°C; on nutrient-poor media or on media supplemented with human hairs produces sterile ascomata-like structures with peridial hyphae consisting of dumbbell-shaped peridial cells; produces abundant pyriform or clavate microconidia, spiral hyphae, chlamydo-spores; does not produce macroconidia.

Type: Czech Republic, Prague, General University Hospital in Prague, the great toenail of 33-year-old man, 14 November 2011, Dr Magdalena Skorepova, SK 3941/11 (PRM 860611, a dried herbarium specimen – holotype; PRM 860612 – isotype; CCF 4259^T = CBS 132920^T – cultures ex-holotype).

Description: Colonies on SGA attaining 31–36 mm diameter in 21 d at 25°C, colony color yellowish white (#F0EAD6) to light greenish yellow (#EAE679), floccose, central part of colony raised, crateriform, reverse light orange (#FAB57F). Colonies on MEA attaining 35–40 mm diameter in 21 d at 25°C, colony color yellowish white (#F0EAD6) to pale yellow (#F3E5AB), coarsely granular, flat, reverse light yellow (#F8DE7E) in the marginal part, deep yellow (#AF8D13) in the center. Colonies on PCA attaining diameter of 42–55 mm after 21 d at 25°C, colony color similar to that on MEA, finely granular, plane, reverse deep yellowish pink (#E66761). Colonies on PDA attaining 39–48 mm diameter in 21 d at 25°C, colony color and texture similar to PCA, reverse vivid yellowish pink (#FFB7A5). No growth observed at 37°C on all media tested above. Hair perforation test negative, urease test positive.

Micromorphology observed on SGA. Vegetative mycelium consists of hyaline, smooth, septate hyphae, 1.3–2.8 µm in diameter. Racquet hyphae sometimes present, mostly associated with ascomata-like structures, spiral hyphae abundantly present. Microconidia abundantly produced, borne singly on short lateral branches, terminally or sessile on the hyphae, pyriform to clavate, smooth-walled, nonseptate, 2.6–5.2 × 1.4–2.6 µm. Ascoma-like structures develop after 5–6 weeks of cultivation on nutrient-poor media with addition of sterilized hair from children, 200–650 µm, solitary or in clusters, globose to subglobose, white at first, becoming pale yellow. Peridial hyphae hyaline, septate, uncinately branched, sometimes terminated by spiral appendages with curled ends or by blunt prominences, peridial dumbbell-shaped cells, symmetrical, echinulate, 4.9–16.4 µm in length and 2.4–5.1 µm in width at the enlarged ends and 1.7–3.1 µm at constrictions. Thick-walled chlamydo-spores frequently present after 6–7 weeks of cultivation on MEA, in limited numbers on other media, mostly arranged in chains, variable in shape, asymmetrical, spherical, or barrel-shaped, thick walled, up to 6 µm wide. The optimal temperature for growth was between 18°C and 25°C, maximum growth

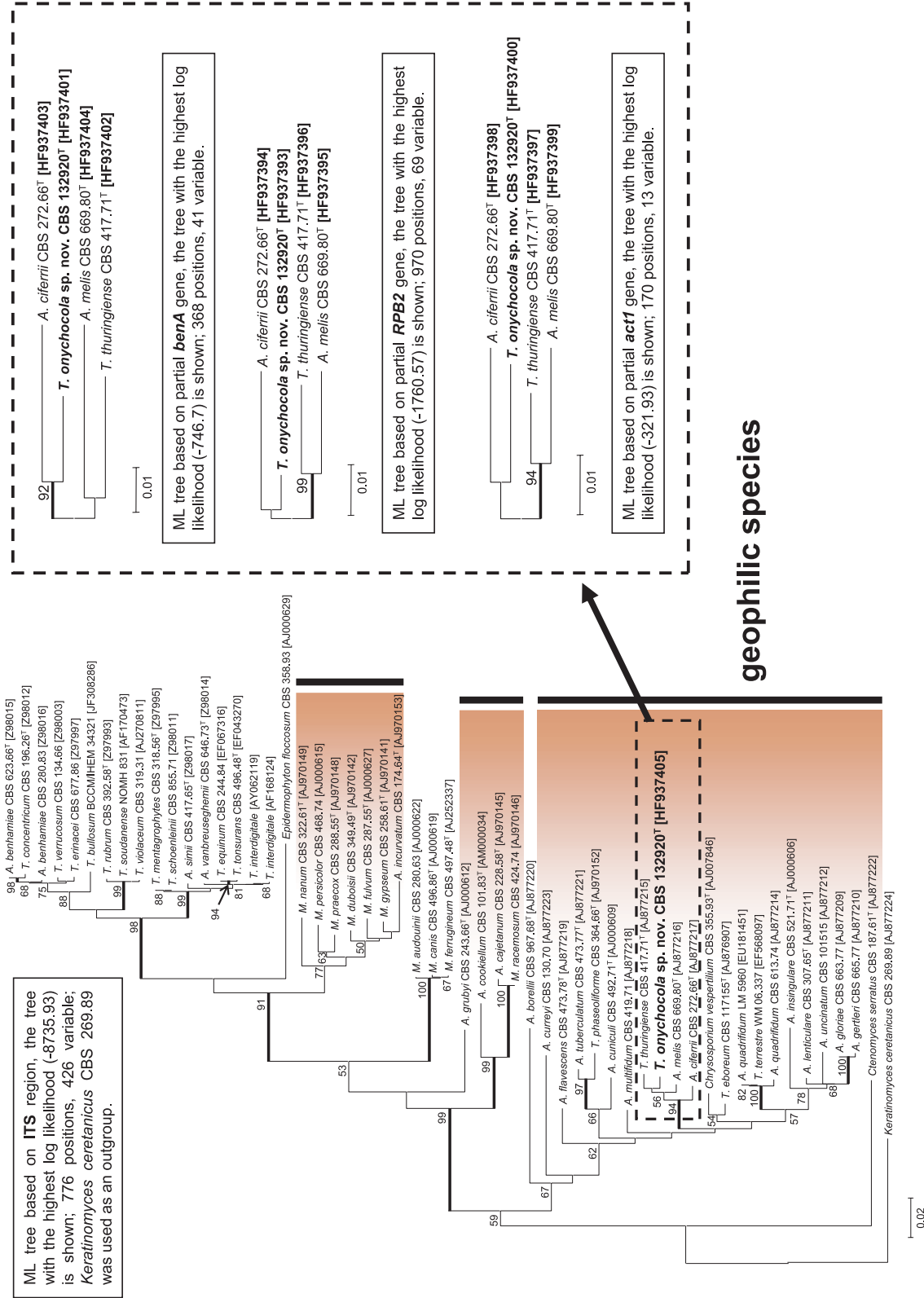


Figure 1. ML trees showing relationships of *Trichophyton onychocola* sp. nov. to other dermatophytes. Nodes supported at 90% bootstrap or higher are double thick; ex-type isolates are designated by a superscript T. Geophilic species are designated by a darker background. The dashed line defines taxa analyzed in three single-locus trees (*benA*, *RPB2*, and *act1*).

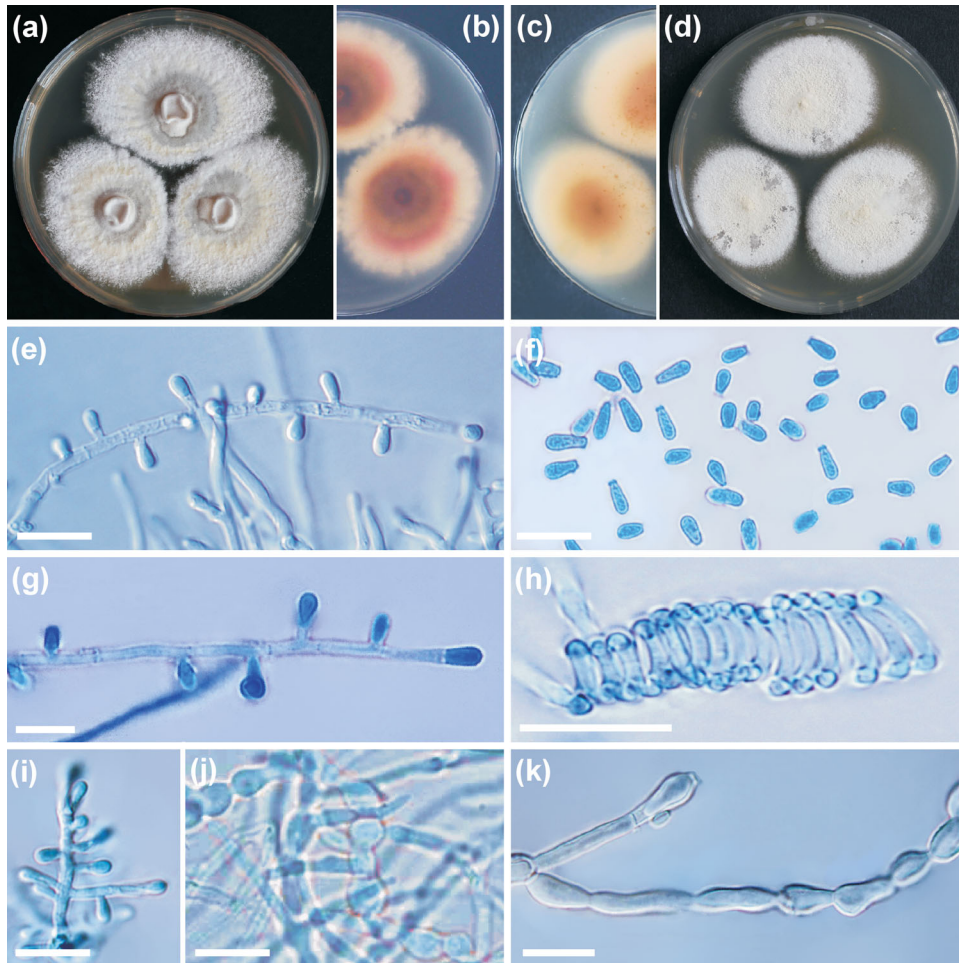


Figure 2. *Trichophyton onychocola* CCF 4259^T colonies after three weeks of cultivation at 25°C on SGA (a) and reverse (b); on MEA (c) and reverse (d); microconidia on short pedicels or sessile (e, g) on the hyphae (conidiophore); clavate microconidia (f); spiral hypha (h); slightly branched conidiophore (i); chlamydospore-like cells and swollen hyphae (j,k). Scale bars, 10 μm.

temperature was 30°C, the species did not grow at 34°C (Fig. 4).

Etymology: “inhabiting nails”: combining onyx, onychos = nail (from the Greek) and colo, -ere, -ui, cultus = inhabit (from the Latin).

Discussion

Atypical causal agents are isolated in dermatomycology with increasing frequency. Several new infectious agents known only from dermatomycological specimens were described recently, belonging, as do dermatophytes, to the order Onygenales. *Onychocola canadensis* [20–22] and *Auxarthron ostraviense* [23] are examples of such fungi. Geophilic *T. eboreum*, which represents the most recently described *Trichophyton* species, was associated with cases of tinea pedis in a patient who was positive for the human immunodeficiency virus [8] and in erythematous skin lesions of an otherwise healthy patient [24]. However, the

etiological significance of the isolated fungus in both cases was not confirmed with sufficient confidence. The geophilic nature of *T. eboreum* was first predicted by sequence data analysis (the species was close to geophilic *Trichophyton* species) [8] and later confirmed by repeated isolation of the species from badger and rabbit burrows [9].

Similarly, based on phylogenetic analysis, it is probable that the species described here is also a geophilic *Trichophyton* species since all such fungi are phylogenetically related and concentrated in one clade (Fig. 1). However, gymnothecium-like structures observed in *T. onychocola* (Fig. 3), which lack ascospores and may represent structures analogous to the cleistothecium-like structures covered by dumbbell-shaped hyphae, were described by Brasch and Gräser [8] in *T. eboreum*. As shown by Campbell et al. [9], *T. eboreum* is, in fact, a heterothallic species, and two opposite mating-type isolates are needed for ascospore production. This observation may suggest that *T. onychocola* is also a heterothallic species. Mating experiments with the

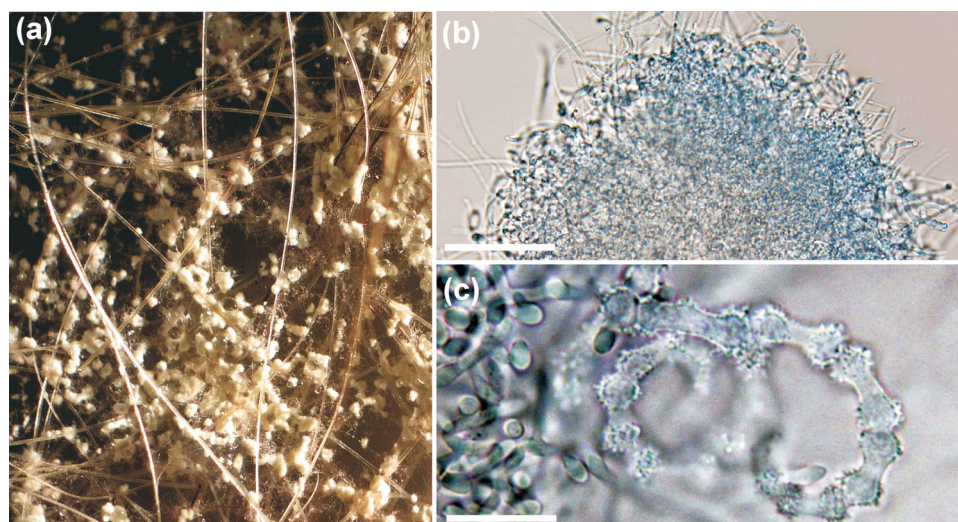


Figure 3. Gymnothecium-like structures present on OA with sterilized human hairs and observed under stereo microscope (a) and light microscope (b); scale bar, 50 μm . Peridial hyphae consisting of ossiform peridial cells (c); scale bar, 10 μm .

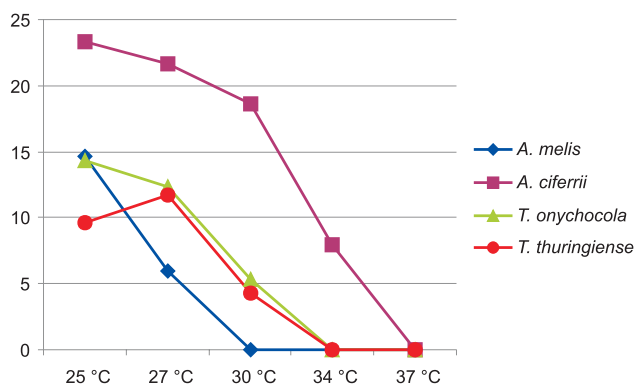


Figure 4. Average growth (mm) of four ex-type isolates representing *Trichophyton onychocola* and three most closely related species on MEA at various temperatures and evaluated after 7 days.

ex-type isolates representing related species were provided on various media without success (data not shown). No isolate that is phylogenetically similar to the ex-type of *T. onychocola* is currently available for mating experiments, and this species is described here without teleomorph.

Although the isolation of common onychomycosis agents (e.g., *T. rubrum* and *T. interdigitale*) from cases is generally considered to be sufficient to establish these fungi as etiologic agents, this is not true for geophilic dermatophytes and less common agents of onychomycosis for which positive direct microscopy and repeated isolation should be conducted to verify their etiological significance. Our *T. onychocola* isolate probably does not represent the true causal agent of suspected onychomycosis in the presented case. Its pathogenic role was not confirmed by repeated isolation in temporally separated samples, and direct microscopic examination was negative at the time of sampling. Close relatives of this species are members of the

T. terrestre complex and other so-called dermatophytoids, which are usually considered to be nonpathogenic. It is likely that *T. onychocola* represents a fungus that accompanies the true causal agent of infection or saprophyte attached to the nail in the area of a previous onychomycosis. Other noninfectious nail changes, which are commonly associated with an increased level of saprophyte and dermatophytoid isolation, cannot be excluded. However, the history of distal lateral subungual onychomycosis in our patient is probably the result of the lesion with typical morphology, which occurred on the same nail five years earlier and healed after antimycotic therapy with a 1% solution of ciclopirox olamine. *Trichophyton onychocola* was the only microbial agent isolated after five years when recurrence of the nail infection appeared. However, a more detailed investigation of the case was not possible because the patient did not return for follow-up inspection and therapy.

The good growth of *T. onychocola* on human hairs, placed on the agar medium without any other additional nutrients, could indicate that this species is capable of using human keratin as its only nutrient source. However, keratinized substrates are also composed of proteins and fatty acids, which could serve as nutrient sources for the fungi. Moreover, perforation structures were not observed in this species, and additional test should be performed in order to confirm keratinolytic abilities of *T. onychocola* [25,26].

The species most closely related to *T. onychocola* are homothallic *A. ciferrii* [27], heterothallic *A. melis* [28], and anamorphic *T. thuringiense* [29]. Two of them, *A. melis* and *T. thuringiense*, were similarly to *T. onychocola* originally described as from the central Europe region, and both species were isolated from soil and associated with mammals [28,29]. In contrast, *A. ciferrii* was first described in

soil and opossum hairs in the United States [27]; it was subsequently isolated in central Europe [30,31]. This may suggest that all of these species coexist in relatively similar ecological and geographical conditions. Neither ascomata nor sterile ascomata-like bodies (as observed in *T. onychocola*; Fig. 3) are produced on human hairs by *T. thuringiense*. In addition, the colonies of *T. thuringiense* are fasciculate or cottony on all media, and the species produce large chlamydospores that reach up to 15 µm in diameter [29]. *Arthroderma ciferii* differs from *T. onychocola* by having wider peridial hyphae at the swelling ends and a length of constricted zone that is shorter (“ossiform” peridial cells in *T. onychocola*; Fig. 3; “burger-shaped” in *A. ciferii*). Two- to six-celled macroconidia are abundantly produced by *T. thuringiense*, and two- to four-celled macroconidia are less frequently produced by *A. ciferii* and *A. melis*. In contrast, no macroconidia were observed in *T. onychocola*. Hair-perforating organs develop in *A. melis* when grown on human hairs in contrast to *T. onychocola*. The latter also has distinctive pale yellow colonies with red reverse on SGA (Fig. 2), PCA, and PDA in contrast to colonies of related species, which are white or brown with pink tint. *Arthroderma ciferii* was the most rapidly growing species and also the only one able to grow at 34°C (Fig. 4). The growth profile of *T. onychocola* was most similar to that of *T. thuringiense*, with a maximum growth temperature at 30°C. *Arthroderma melis* grew only at 27°C.

Acknowledgments

This research was supported by the Ministry of Education, Youth and Sports (CZ.1.07/2.3.00/20.0055 and CZ.1.07/2.3.00/30.0003). Molecular genetic analyses were supported by the project GAUK 607812.

Declaration of interest

The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and the writing of the paper.

References

- Gräser Y, Kuijpers AFA, Presber W, De Hoog GS. Molecular taxonomy of the *Trichophyton rubrum* complex. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 3329–3336.
- Gräser Y, Kuijpers AFA, Presber W, De Hoog GS. Molecular taxonomy of *Trichophyton mentagrophytes* and *T. tonsurans*. *Med Mycol* 1999; 37: 315–330.
- Gräser Y, Scott J, Summerbell R. The new species concept in dermatophytes—a polyphasic approach. *Mycopathologia* 2008; 166: 239–256.
- Kawasaki M, Anzawa K, Wakasa A et al. Matings among three teleomorphs of *Trichophyton mentagrophytes*. *Jap J Med Mycol* 2010; 51: 143–152.
- Gräser Y, De Hoog S, Summerbell RC. Dermatophytes: recognizing species of clonal fungi. *Med Mycol* 2006; 44: 199–209.
- Anzawa K, Kawasaki M, Mochizuki T, Ishizaki H. Successful mating of *Trichophyton rubrum* with *Arthroderma simii*. *Med Mycol* 2010; 48: 629–634.
- Kawasaki M. Verification of a taxonomy of dermatophytes based on mating results and phylogenetic analyses. *Med Mycol J* 2011; 52: 291–295.
- Brasch J, Gräser Y. *Trichophyton eboreum* sp. nov. isolated from human skin. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 5230–5237.
- Campbell CK, Borman AM, Linton CJ, Bridge PD, Johnson EM. *Arthroderma olidum*, sp. nov. A new addition to the *Trichophyton terrestre* complex. *Med Mycol* 2006; 44: 451–459.
- Choi JS, Gräser Y, Walther G et al. *Microsporium mirabile* and its teleomorph *Arthroderma mirabile*, a new dermatophyte species in the *M. cookei* clade. *Med Mycol* 2012; 50: 161–169.
- Kane J, Scott JA, Summerbell RC, Diena B. *Trichophyton kraidenii*, sp. nov.: an anthropophilic dermatophyte. *Mycotaxon* 1992; 45: 307–316.
- Miriam J, Bhat DJ. *Microsporium appendiculatum* sp. nov. on goat dung from India. *Kavaka* 1997; 25: 93–94.
- Sharma R, Rajak RC, Pandey AK, Gräser Y. Internal transcribed spacer (ITS) of rDNA of appendaged and non-appendaged strains of *Microsporium gypseum* reveals *Microsporium appendiculatum* as its synonym. *Antonie Leeuwenhoek* 2006; 89: 197–202.
- Atlas RM. *Handbook of Microbiological Media*, 4th edn. Boca Raton: CRC Press; 2010.
- Ajello L, Georg LK. *In vitro* hair cultures for differentiating between atypical isolates of *Trichophyton mentagrophytes* and *Trichophyton rubrum*. *Mycopathologia* 1957; 8: 3–17.
- Philpot C. The differentiation of *Trichophyton mentagrophytes* from *T. rubrum* by a simple urease test. *Med Mycol* 1967; 5: 189–193.
- Hubka V, Kolařík M, Kubátová A, Peterson SW. Taxonomical revision of the genus *Eurotium* and transfer of species to *Aspergillus*. *Mycologia* 2013; 105: 912–937.
- Nováková A, Hubka V, Saiz-Jimenez C, Kolarik M. *Aspergillus baeticus* sp. nov. and *Aspergillus thesauricus* sp. nov.: two species in section *Usti* originating from Spanish caves. *Int J Syst Evol Microbiol* 2012; 62: 2778–2785.
- Hubka V, Kolařík M. β -tubulin paralogue *tubC* is frequently misidentified as the *benA* gene in *Aspergillus* section *Nigri* taxonomy: primer specificity testing and taxonomic consequences. *Persoonia* 2012; 29: 1–10.
- Sigler L, Congly H. Toenail infection caused by *Onychocola canadensis* gen. et sp. nov. *J Med Vet Mycol* 1990; 28: 405–417.
- Stuchlík D, Mencl K, Hubka V, Skořepová M. Fungal melanonychia caused by *Onychocola canadensis*: first records of nail infections due to *Onychocola* in the Czech Republic. *Czech Mycol* 2011; 63: 83–91.
- Gupta AK, Horga-Bell CB, Summerbell RC. Onychomycosis associated with *Onychocola canadensis*: ten case reports and a review of the literature. *J Am Acad Dermatol* 1998; 39: 410–417.
- Hubka V, Dobiasova S, Lyskova P et al. *Auxarthron ostraviense* sp. nov., and *A. umbrinum* associated with

- nondermatophytic onychomycosis. *Med Mycol* 2013; 51, doi:10.3109/13693786.2013.770608.
24. Keller MC, French LE, Hofbauer GFL, Bosshard PP. Erythematous skin macules with isolation of *Trichophyton eboreum*—infection or colonisation? *Mycoses* 2013; 56: 373–375.
25. Marchisio VF, Fusconi A. Morphological evidence for keratinolytic activity of *Scopulariopsis* spp. isolates from nail lesions and the air. *Med Mycol* 2001; 39: 287–294.
26. Scott JA, Untereiner WA. Determination of keratin degradation by fungi using keratin azure. *Med Mycol* 2004; 42: 239–246.
27. Varsavsky E, Ajello L. The perfect and imperfect forms of a new keratinophilic fungus: *Arthroderma ciferrii* sp. nov.: *Trichophyton georgii* sp. nov. *Riv Patol Veg* 1964; 4: 351–364.
28. Krivanec K, Janeckova V, Otcenasek M. *Arthroderma melis* spec. nov.—a new dermatophyte species isolated from badger burrows in Czechoslovakia. *Ces Mykol* 1977; 31: 91–99.
29. Koch HA. *Trichophyton thuringiense* spec. nov. *Mykosen* 1969; 12: 287–290.
30. Hubalek Z. Fungi associated with free-living birds in Czechoslovakia and Yugoslavia. *Acta Sci Nat Brno* 1974; 8: 1–62.
31. Hubalek Z, Rosicky B, Otcenasek M. Fungi on the hair of small wild mammals in Czechoslovakia and Yugoslavia. *Ces Myko* 1979; 33: 81–93.

Článek 6



Original Article

Discovery of a sexual stage in *Trichophyton onychocola*, a presumed geophilic dermatophyte isolated from toenails of patients with a history of *T. rubrum* onychomycosis

Vit Hubka^{1,2,3,*}, Christoffer V. Nissen⁴, Rasmus Hare Jensen⁵,
Maiken C. Arendrup⁵, Adela Cmokova^{1,2}, Alena Kubatova¹,
Magdalena Skorepova⁶ and Miroslav Kolarik^{1,2}

¹Department of Botany, Faculty of Science, Charles University in Prague, Benatska 2, 128 01, Prague 2, Czech Republic, ²Laboratory of Fungal Genetics and Metabolism, Institute of Microbiology of the AS CR, v.v.i, Videnska 1083, 142 20, Prague 4, Czech Republic, ³First Faculty of Medicine, Charles University in Prague, Kateřinská 32, 121 08 Prague 2, ⁴Department of Dermatology, Bispebjerg Hospital, University of Copenhagen, Bispebjerg Bakke 23, DK-2400 Copenhagen, Denmark, ⁵Unit of Mycology, Department of Microbiology & Infection Control, Statens Serum Institut, Artillerivej 5, DK-2300, Copenhagen, Denmark and ⁶Dermatology and Venerology, First Faculty of Medicine, Charles University in Prague and General University Hospital in Prague, 128 08, Prague 2, Czech Republic

*To whom correspondence should be addressed. Vit Hubka, Department of Botany, Faculty of Science, Charles University in Prague, Benatska 2, 128 01 Prague 2, Czech Republic. Tel: (+420) 739663218; Fax: (+420) 29644 2347;

E-mail: hubka@biomed.cas.cz

The European Molecular Biology Laboratory (EMBL) database accession numbers of the internal transcribed spacer (ITS) rDNA and β -tubulin (*Btub*) for the case isolate of *Trichophyton onychocola* CCF 4802 are LN589976 and LN589971, respectively.

Received 25 March 2015; Revised 1 May 2015; Accepted 12 May 2015

Abstract

Trichophyton onychocola is a recently described geophilic dermatophyte that has been isolated from a toenail of Czech patient with a history of onychomycosis due to *T. rubrum* and clinical suspicion of relapse. In this study, we report a similar case from Denmark in an otherwise healthy 56-year-old man. The patient had a history of great toenail infection caused by *T. rubrum* in 2004 and presented with suspected relapse in 2011 and 2013. *Trichophyton onychocola* was the only microbial agent isolated at the second visit in 2013 and the identification was confirmed by DNA sequencing. Direct microscopic nail examination was positive for hyphae, however the etiological significance of *T. onychocola* was not supported by repeated isolation of the fungus. This new species may be an overlooked geophilic species due to the resemblance to some common species, for example, zoophilic *T. interdigitale* or some species of geophilic dermatophytes. We included differential diagnosis with phenotypically similar species; however, it is

recommended that molecular methods are used for correct identification. The MAT locus of Danish strain was of opposite mating type than in the previously isolated Czech strain and the two isolates were successfully mated. The mating experiments with related heterothallic species *T. thuringiense* and *Arthroderma melis* were negative. The sexual state showed all typical signs of arthroderma-morph and is described by using optical as well as scanning electron microscopy. The sexual state was induced on a set of agar media, however low cultivation temperature and the presence of keratin source were crucial for the success rather than formulation of medium.

Key words: *Arthroderma*, geophilic dermatophytes, keratinophilic fungi, MAT locus, Onygenales, tinea unguium.

Introduction

Dermatophytes are a group of ecologically and phylogenetically related keratinophilic filamentous fungi comprising agents causing superficial human and animal mycoses. The superficial dermatomycoses affect a significant part of the world's population [1] and considerable economic costs are associated with treatment and prevention of these diseases worldwide [2,3].

The pathogenic potential of geophilic dermatophyte species is relatively low in comparison with anthropophilic and zoophilic dermatophytes and they usually cause approximately 1% of all dermatophytoses [4,5]. Geophilic dermatophytes encompass a high and still rising number of species in part due to the increasing use of molecular methods in species identification. Moreover, in the last few years, several presumed geophilic dermatophytes have been isolated from clinical material. *Trichophyton eboreum* was associated with a case of tinea pedis [6] and a skin infection [7]. Soon after the original description, the species was isolated from badger and rabbit burrows and its sexual stage was discovered in mating experiments [8]. *Microsporium mirabile* was isolated from human toenail and two asymptomatic animals, and described together with its sexual state [9]. Most recently, two new geophilic species were isolated from Czech patients [10], *T. onychocola* from a toenail, [11] and *M. aenigmaticum* from skin [12]. The descriptions of both species was based on a single isolate and lacked the description of sexual states.

In this study, we report a second case of isolation of *T. onychocola* from human clinical material. The sexual stage of this species (arthroderma-morph) was induced by mating experiments in various cultivation conditions and described using optical as well as scanning electron microscopy.

Case report

A 56-year-old man of Kurdish descent living in Copenhagen presented in October 2012 with suspected ony-

chomycosis of his left great toenail. Aside from noninsulin dependent diabetes, he was healthy. Prior to the current episode, the patient had a history of *Trichophyton rubrum* onychomycosis in the same toenail verified by culture in 2004. Treatment with itraconazole for 3 months and 5% amorolfine solution for one year cleared the infection. In 2011, the condition relapsed. Both culture and polymerase chain reaction (PCR) analysis were positive for *T. rubrum*. Successive 3 months treatment with terbinafine and itraconazole combined with 5% amorolfine solution was prescribed. However, PCR analysis in June 2012 was still positive for *T. rubrum*. This led to the referral of the patient to the department of dermatology and discontinuation of itraconazole.

At the out-patient clinic hyperkeratosis and nail dystrophy in the distal part of the left great toenail were observed. However, nail growth in the entire proximal half was normal and no other nails were affected. Nail sampling and mycological examinations were done and both direct microscopy (10% KOH) and culture were negative. Hence, the infection was regarded in remission which was confirmed at follow-up in January 2013.

In September 2013, the patient presented with distal and lateral nail dystrophy and yellow discoloration suggesting reinfection (Fig. 1). Direct microscopic nail examination (10% KOH) showed few hyphae and spores. Culture (Sabouraud glucose agar, SGA, with and without chloramphenicol and cycloheximide) was positive. Colonies were granular and spiral hyphae were observed. A tentative diagnosis of *T. mentagrophytes* infection was suggested (zoophilic *T. interdigitale* according to current taxonomy [13]). At the reference laboratory the isolate was found to have only one base pair difference (1/600 bp) when compared to the ITS sequence of species recently described and proposed under the name of *T. onychocola* (strain CBS 132920^T = CCF 4259^T = UAMH 11826^T; EMBL accession number HF937405). In comparison, the isolate shared 96% sequence identity to *Arthroderma melis* (CBS 669.80^T). The partial β -tubulin gene sequence was identical with the



Figure 1. Affected toenail with distal and lateral nail dystrophy and yellow discoloration. This Figure is reproduced in color in the online version of *Medical Mycology*.

ex-type strain of *T. onychocola* and showed 94% similarity to *A. melis*. The isolate was deposited into the Culture Collection of Fungi (CCF), Department of Botany, Charles University, Prague as CCF 4802.

The patient was informed but did not wish to undergo further treatment. Between the negative culture and microscopy in October 2012 and the clinical relapse in September 2013, the patient had not travelled abroad. He had visited the Czech Republic once in 2004.

Materials and methods

Molecular studies

DNA isolation from nail samples and a multiplex PCR for detection of dermatophytes and direct identification of *T. rubrum* was performed according to Brillowska-Dabrowska et al. [14,15]. ArchivePure DNA yeast and Gram2+ kit (5 PRIME Inc., Gaithersburg, Maryland) was used for DNA isolation from 7-day-old cultures according to manufacturer instructions as updated by Hubka et al. [16]. The reaction mixture and PCR protocol was described by Hubka et al. [17]. Primers ITS1 and ITS4 [18] were used for amplification of ITS rDNA region. Partial β -tubulin was amplified with primer pair Bt2a and Bt2b [19]. All terminal primers were used for DNA sequencing.

Sequences were inspected and assembled using Bioedit v. 7.0.0 (www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html). Alignments of the regions were performed using the FFT-NSi strategy, as implemented in MAFFT v. 6.861b [20]. The ITS and β -tubulin loci were combined, and maximum likelihood (ML) analysis was performed using MEGA6 [21]

with bootstrapping (1000 replicates). The analysis was performed with the K2+G model as estimated using the same software. The retrieved sequences were mostly published in studies by Rezaei-Matehkolaei et al. [22], Beguin et al. [23], Hubka et al. [12,24], Choi et al. [9], and Lyskova et al. [25]; and the EMBL/GenBank accession numbers are listed in Table 1.

We tried to amplify the idiomorphs of the MAT locus from *T. onychocola* and its relatives by using all primer combinations previously published by Kano et al. [26,27], Li et al. [28], and Symoens et al. [29] with respective amplification conditions. *Trichophyton onychocola*, *A. melis*, and *T. thuringiense* and several other species of geophilic dermatophytes were included, namely, *T. terrestre* CCF 4826, *M. aenigmaticum* CCF 4608^T, and *M. incurvatum* CCF 4753. The identity of the products was verified by DNA sequencing; product purification and sequencing were performed at Macrogen Europe (Amsterdam, the Netherlands) using both terminal primers.

Mating experiments

Opposite mating types of *T. onychocola* CCF 4259^T and CCF 4802, *A. melis* CBS 669.80^T and *T. thuringiense* CBS 417.71^T were paired in all possible combinations on malt extract agar (MEA; malt extract from Oxoid, Basingstoke, UK), potato dextrose agar (PDA; Roth, Karlsruhe, Germany), potato carrot agar (PCA [30]), oatmeal agar (OA; Difco, La Porte de Claix, France), Takashio medium (1 g peptone, 2 g glucose, 1 g MgSO₄·7 H₂O, 1 g KH₂PO₄, 20 g agar and 1 l distilled water), Sabourad's dextrose agar (SGA, Himedia, Milano, Italy) and water agar (20 g agar

Table 1. A list of fungi and sequence accession numbers (those in bold were generated for this study) used for phylogenetic analysis.

Species and Strain No.	GenBank/EMBL Accession Nos.		
	ITS rDNA	β -tubulin	MAT locus
<i>Trichophyton tonsurans</i> CBS 130822	JN134085	JF731071	
<i>Trichophyton interdigitale</i> IHEM 19024	JQ407192	JQ407162	
<i>Trichophyton interdigitale</i> IHEM 584	JQ407200	JQ407159	
<i>Trichophyton simii</i> IHEM 4420	JQ407210	JQ407138	
<i>Trichophyton mentagrophytes</i> CBS 318.56	Z97995	–	
<i>Trichophyton erinacei</i> CS379	JN134091	JF731117	
<i>Arthroderma benhamiae</i> IHEM 4710	JQ407182	JQ407137	
<i>Trichophyton rubrum</i> CBS 130821	JN134065	JF731065	
<i>Trichophyton violaceum</i> CBS 130937	JN134104	JF731088	
<i>Epidermophyton floccosum</i> NBRC 9045	JN134157	JF731127	
<i>Microsporium persicolor</i> CCF 4541	HG518405	HG518414	
<i>Microsporium incurvatum</i> CCF 4753 – MAT1–2	LM644235	LN651122	LN624595
<i>Microsporium fulvum</i> CCF 4676	HG518409	HG518417	
<i>Microsporium aenigmaticum</i> CCF 4608 – MAT1–2	HG518404	HG518421	LN624594
<i>Microsporium gypseum</i> CBS 258.61	AJ970141	HG518420	
<i>Microsporium mirabile</i> CBS 124422	HQ825137	HQ916946	
<i>Microsporium racemosum</i> CBS 423.74	HQ825139	HQ916948	
<i>Microsporium canis</i> CBS 130811	JN134125	JF731099	
<i>Microsporium audouinii</i> NBRC 6074	JN134145	JF731113	
<i>Trichophyton terrestre</i> (<i>A. quadrifidum</i>) CCF 4826 – MAT1–1	LN651123	LN651121	
<i>Trichophyton thuringiense</i> CBS 417.71 – MAT1–2	AJ877215	HF937402	LN624596, LN713931
<i>Arthroderma melis</i> CBS 669.80 – MAT1–1	AJ877216	HF937404	
<i>Trichophyton georgiae</i> (<i>A. ciferrii</i>) CBS 272.66 – homothallic	AJ877217	HF937403	
<i>Trichophyton onychocola</i> CCF 4259 – MAT1–1	HF937405	HF937401	
<i>Trichophyton onychocola</i> CCF 4802 – MAT1–2	LN589976	LN589971	LN624597, LN713932
<i>Auxarthron umbrinum</i> CCF 4062 (outgroup)	FR839683	FR851846	

and 1 l distilled water) plates, and were incubated at 17 and 25°C in the dark. Second set of the same media was supplemented by sterilized blond child hairs placed on the medium surface. All plates were inoculated in duplicates and all strain were plated also alone on each medium as a control. The plates were sealed with Parafilm and examined weakly for 3 months under a stereomicroscope for the production of ascumata.

Phenotypic studies

Lactic acid with cotton blue was used as a mounting medium for observation of the micromorphology of the subcultures. Photographs were taken on the Olympus BX-51 microscope (Olympus DP72 camera) using Nomarski contrast. Macromorphology of the colonies was documented using binocular loupe Olympus SZ61 (with Olympus Camedia C-5050 Zoom camera) or Canon EOS 500D. Scanning electron microscopy (SEM) was performed using a JEOL-6380 LV scanning electron microscope (JEOL Ltd. Tokyo, Japan). Pieces of colonies or mature ascumata were

fixed in osmium tetroxide vapours for one week at 5–10°C and gold coated using a Bal-Tec SCD 050 sputter coater. The specimens were observed using 40 μ m spot size and 15–25 kV accelerating voltage.

Results

Amplification of MAT genes and mating experiments

The amplicons of MAT1–2 gene were only observed when using primer pairs TmHMG3R and TmHMG3S [27], or MF1 and MF2 [29]; the PCR with other primer pairs was unsuccessful. In the first case, the PCR yielded fragments with approximate length of 100 bp (Fig. 2) from the Danish isolate of *T. onychocola* CCF 4802, *T. thuringiense* CBS 417.71^T and also from *M. incurvatum* CCF 4753 and *M. aenigmaticum* CCF 4608^T (GenBank Acc. Nos. LN624594–LN624597). In the second case, the 350 bp long fragments were amplified in the same isolates (GenBank Acc. Nos. LN713931–LN713932). The fragments of MAT1-1 gene were not successfully amplified by any of

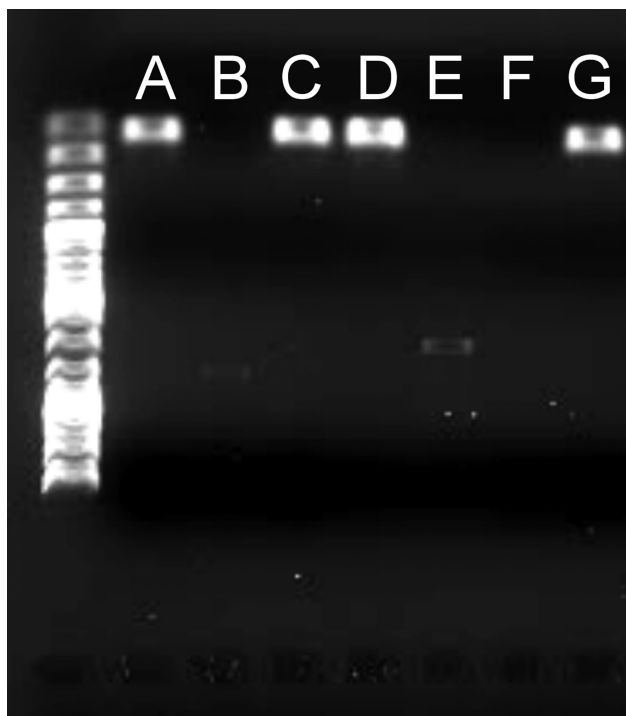


Figure 2. Amplification of partial MAT1-2 gene for *T. onychocola* and other geophilic dermatophytes with primers TmHMG3R and TmHMG3S [27] visualized by gel electrophoresis. *Trichophyton onychocola* CCF 4802 (A); *T. onychocola* CCF 4259^T (B); *T. thuringiense* CBS 417.71^T (C); *Microsporium aenigmaticum* CCF 4608^T (D); *Arthroderma melis* CBS 669.80^T (E); *T. terrestre* CCF 4826 (F); *M. incurvatum* CCF 4753 (G); GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder (Fermentas) was used as a size marker.

the primer pairs used (see methods). However, MAT1-1 idiomorph was expected in all remaining non-MAT1-2 isolates, including Czech isolate of *T. onychocola* CCF 4259^T and *A. melis* CBS 669.80^T.

Opposite mating types of *T. onychocola* and its relatives were paired in all possible combinations and the results of mating experiments are schematically shown in Figure 3. Fertile gymnothecia were first observed after 4–5 weeks of cultivation only in crosses of *T. onychocola* CCF 4259^T and CCF 4802. Interspecies crosses between *T. onychocola*, *T. thuringiense*, and *A. melis* yielded no ascomata. The induction of the sexual state was only successful at 17°C and on water agar, MEA, OA, PCA and Takashio medium; SGA and PDA, and all plates incubated at 25°C were without gymnothecia. No ascomata were observed on plates without hairs. None of the tested isolates produced gymnothecia when inoculated alone.

Description of the sexual state of *T. onychocola* (Figs 4 and 5)

Heterothallic fungus, ascomata (gymnothecia) globose, pale orange-brown, most commonly 400–600 (–750) μm in di-

ameter including peridial hyphae. The ascomata are covered by a felt of peridial hyphae having a diameter of 40–80 μm. Peridial hyphae hyaline, septate, uncinately branched, sometimes terminated by a claw-like projection or smooth-walled spiral appendages. Spiral appendages of ascomata usually do not exceed markedly the layer of peridial hyphae and were usually hidden within it. Peridial cells dumbbell-shaped, symmetrical, echinulate, 7.5–11.5 μm in length and 2.4–5.1 μm in width at enlarged ends and 1.7–3.1 μm at constrictions. Asci globose to subglobose, 8-spored, 5–6 μm diam. Ascospores faintly yellowish, biconcave with circular projection when viewed from above, 2.2–2.9 μm in diam, height 1.6–2 μm.

Ascomata resembling structures develop on nutrient poor media (water agar, PCA, OA, Takashio medium) with addition of keratin source. They are whitish and occur on the hairs as well as on the agar surface together with ascomata. They are also abundantly present when the particular isolates are inoculated alone. Their shape is globose but commonly irregular, they occur solitary or in clusters. They are composed of conidiophores producing conidia and never contain ascospores the surface is covered with abundant spirally coiled appendages protruding up to 250 μm above the surface. Dried cultures with cleistothecia were deposited into the herbarium of the Mycological Department, National Museum in Prague (PRM) as PRM 924058 and PRM 924059.

The asexual state and colony morphology of both isolates of *T. onychocola* were identical and described by Hubka et al. [11]. The inability to grow at 34°C on MEA was also confirmed in Danish isolate CCF 4802 as previously observed by Hubka et al. [11] in the ex-type strain CCF 4259. Red pigment was produced into hairs by *T. onychocola* isolates on water agar.

Differentiation of *T. onychocola* from related or phenotypically similar dermatophytes

The morphological and physiological features that can be useful in differentiation of *T. onychocola* from closely related geophilic dermatophytes or other phenotypically similar dermatophytes are summarized in Table 2. Here we only summarize our observations or mention some features that are not included in Table 2. All species included in differential diagnosis are heterothallic with exception of homothallic *A. ciferrii* (*T. georgiae*) [31,32] and clonal *T. rubrum* [33–35]. *Arthroderma ciferrii* is able to grow at 34°C in contrast to *T. onychocola* and the colonies of the ex-type strain CBS 272.66 attained a diameter of 9–11 mm after 7 days on MEA at 30°C in contrast to 5–8 mm large colonies of *T. onychocola*. Other differences

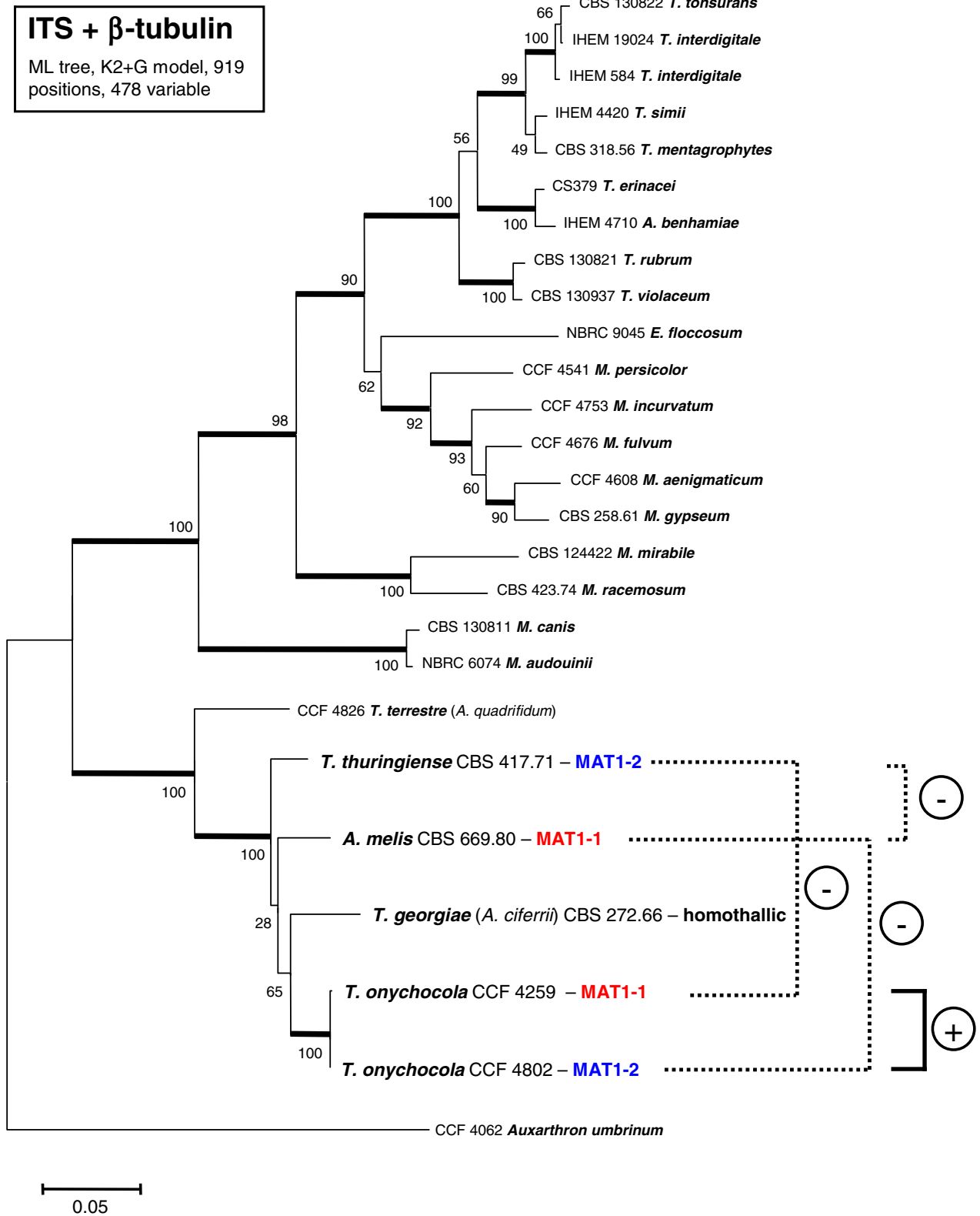


Figure 3. Maximum likelihood tree showing relationships of *T. onychocola* to other dermatophytes. The branch with *T. onychocola* and related species was extended vertically (the horizontal distances between species were not changed) to show results of mating experiments. Successful mating experiments are designated by symbol “+” and unsuccessful by “-”. The thick branches denote 90% bootstrap support or higher. The EMBL/GenBank accession numbers are listed in Table 1. This Figure is reproduced in color in the online version of *Medical Mycology*.

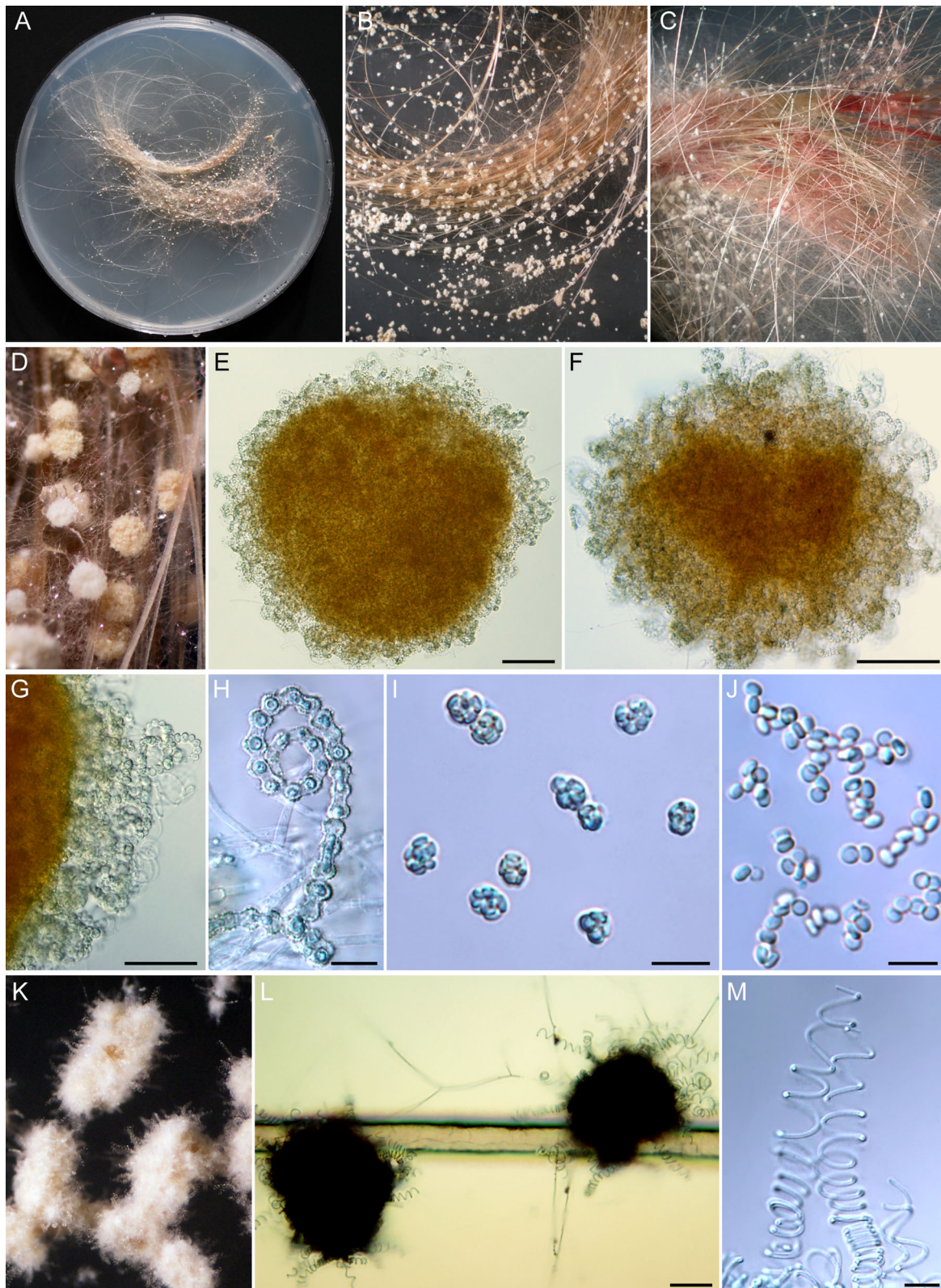


Figure 4. Mating between two opposite mating type strains of *T. onychocola*, CCF 4802 (MAT1–2) and CCF 4259^T (MAT1–1). Paired culture on oatmeal agar supplemented by blond child hairs after 5 weeks of cultivation at 17°C (A); detail of the same culture with ascomata and ascomata-like structures (B); red pigment produced into hairs on water agar (C); detail of pale orange-brown ascomata (D); ascoma (gymnothecium) covered by peridial hyphae (E, F); detail of peridial hyphae (G, H); asci (I); ascospores (J); ascomata-like structures covered by abundant spiral appendages (K, L); detail of spiral appendages (M). Scale bars: E, F 100 μ m; G 50 μ m; H–J 10 μ m; L 100 μ m; M 10 μ m. This Figure is reproduced in color in the online version of *Medical Mycology*.

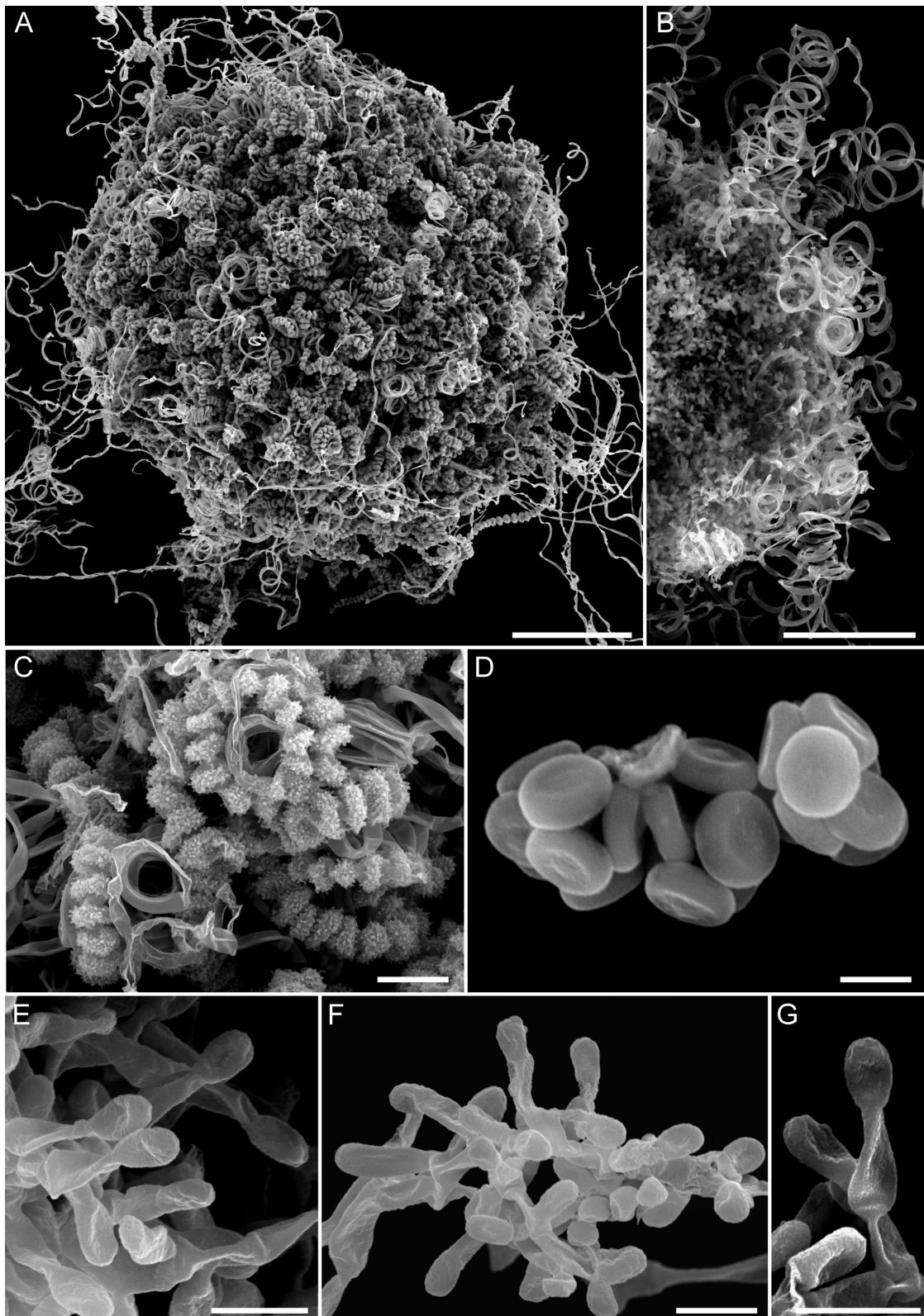


Figure 5. Scanning electron microscopy of *Trichophyton onychocola*. CCF 4802 (MAT1-2) and CCF 4259^T (MAT1-1). Ascoma (gymnothecium) covered by peridial hyphae (A); ascomata-like structure covered by abundant spiral appendages (B); detail of peridial hyphae (C); biconcave ascospores (D); conidiophores with microconidia (E–G). Scale bars: A 100 μm ; B 50 μm ; C 10 μm ; D 2 μm ; E–G 5 μm .

Table 2. Differentiation of *Trichophyton onychocola* from related or phenotypically similar dermatophytes.

Species →	<i>A. ciferrii</i>	<i>A. quadrifidum</i>	<i>T. interdigitale</i>
Feature ↓	<i>T. onychocola</i>	<i>A. melis</i>	<i>T. rubrum</i>
	(<i>T. georgiae</i>)	(“ <i>T. terrestre</i> ”)	
Ecology	probably geophilic	geophilic	zoophilic
Microconidia* (μm)	clavate or pyriform, 2.6–5.2 × 1.4–2.6	clavate or pyriform, 4.4–6.8 × 1.8–4.5	globose, pyriform, 1.5–3.5 in diam, less abundantly clavate, 3.5–5 × 2–3.5 up to 8 × 2–4
Macroconidia (μm)	absent	rare, up to 4-celled, 10.8–15.8 × 4.8–6.5	sporadically, granular strains, cigar-shaped or cylindrical, up to 75 × 4–11
Spiral hyphae	absent	absent	sporadically, granular strains, cigar-shaped or cylindrical, up to 75 × 4–11
Reverse on SGA	red to red-brown	brown	red, red-brown or brown
Mating system	heterothallic	heterothallic	heterothallic
Maximal growth temperature	30°C, no growth at 34°C	27°C, no growth at 30°C	grow at 37°C, no growth at 42°C
Ascospores (μm)	2.2–2.9 × 1.6–2	2.5–3 × 1.5–2.8	1.8–2.7 × 0.9–1.8
Peridial cells (μm)	symmetrical, 7.5–11.5 × 2.4–5.1, internode 1.7–3.1	symmetrical or asymmetrical, 7–10.8 × 3.8–6.4, internode 2–5.4	asymmetrical when mature, 8–13 × 5–9
Hair perforation	-	+	-
Urease test	+	+	mostly +

Note: * one-celled (nonseptate); † there is no consensus whether *A. vanbreuseghemii* is a sexual state of zoophilic *T. interdigitale* or a separate species, in addition many confusions exist in the taxonomy of former *T. mentagrophytes* s.l. and its teleomorph(s) and the sexual state of zoophilic *T. interdigitale* needs to be redescribed based on well-characterised isolates

can be found in the shape and dimensions of peridial cells [31]. The growth profile of *T. onychocola* is most similar to that of *T. thuringiense* [11], but this species does not produce ascomata resembling structures and the general morphology of colonies is different. *Trichophyton thuringiense* also produces multicelled macroconidia and large chlamydospores that were not observed in *T. onychocola* [11,36]. *Trichophyton terrestre* is a complex of at least three heterothallic biological species [37–39]. The sexual state of *T. terrestre* strains isolated from clinical material usually belongs to *A. quadrifidum* [5,40,41]. The colonies of this species are granular and white (later yellowish) with lobed margins and dissimilar to those of *T. onychocola*. In addition, this species does not grow even at 30°C and produces abundant multicelled, cylindrical macroconidia. We did not observe red pigmentation on the reverse of colonies of Czech clinical isolates of *A. quadrifidum* CCF 4743, CCF 4826, and D294/14 identified by sequence of ITS rDNA, and all cultures were distinctive by strong odor. However, isolates with red reverse or producing red soluble pigment were reported in all members of this complex, namely, *A. quadrifidum*, *A. lenticulare*, and *A. insingulare* [37–39,42–45]. The colonies of *T. eboreum*, another geophilic species known from clinical material [6,7], are whitish with feathery margins and without reverse colouration; the species also produces abundant club-shaped, multicelled macroconidia. Colonies of zoophilic strains of *T. interdigitale* and *T. mentagrophytes* s. str. are usually brown and granular with dark brown reverse, the isolates of these species usually produce at least some cigar-shaped macroconidia and are capable of growth at 37°C.

Discussion

Almost all dermatophytes are heterothallic fungi and two opposite mating type isolates are necessary for induction of ascomata. The exceptions are homothallic *A. curreyi* (with anamorph usually referred to as *Chrysosporium* sp.) and *A. ciferrii* (*T. georgiae*) [32]. Biological species concept with assessment of biological species boundaries by mating experiments is in general well applicable on species of geophilic dermatophytes [8,9,38,39,44,46–48]. In contrast, mating experiments can considerably disagree with concept of classical species of anthropophilic and zoophilic dermatophytes [34,49–51] as they represent relatively phylogenetically young species with incomplete prezygotic reproductive barriers.

Very specific conditions can be necessary for induction of sexual state in heterothallic fungi, these include specific media, temperature, light and presence of host in some pathogenic fungi [29,46,52–56]. Discovery of fungal genes responsible for sexual and somatic incompatibility facili-

tated the process of induction of sexual state in many different groups of fungi. Especially characterisation of mating type (MAT) genes has become a routine part of this process in heterothallic species. In this study, we characterised main MAT idiomorphs in *T. onychocola* and its relatives (Fig. 3) using previously developed primers [27,29] and successfully induced the production of ascomata (Figs 4 and 5). The gymnothecia were observed on variety of media but only those supplemented by keratin and cultivated at 17°C (the influence of light was not studied and all crosses were incubated in the dark). The crosses between opposite mating type isolates of *T. onychocola* and related species yielded neither gymnothecia nor other ascomata-like structures. *Arthroderma ciferrii*, however closely related to *T. onychocola*, was not included in the mating experiments because its homothallism was confirmed previously in several monoascosporic isolates [31].

Trichophyton onychocola is placed into the basal clades of the phylogenetic tree of dermatophytes s. l. (Fig. 3). These clades include almost exclusively geophilic and rarely pathogenic dermatophytes among which *T. terrestre* is the best known. Previous phylogenetic studies have shown that phylogeny correspond well with ecology [13,57]. Phylogenetic data, low temperature optimum for growth, mating behaviour, and morphological similarity of both sexual and asexual state of *T. onychocola* to other geophilic *Trichophyton* species strongly suggest that the species is geophilic. At this time, *T. onychocola* is only known from two collections from the temperate zone in Europe. *Arthroderma melis* and *T. thuringiense*, two closely related geophilic species, were also described from the central Europe region [36,44], and an additional isolate of *T. thuringiense* CBS 124118 (=CBS 132929 = DSMZ 25999) was later isolated from a toenail under the suspicion of onychomycosis [58]. *Arthroderma ciferrii*, another closely related species, was first isolated from soil and opossum hairs in the United States [31] and later found in many other countries of the temperate zone worldwide (UAMH culture collection catalogue [The University of Alberta Microfungus Collection and Herbarium]). These data may suggest that all these species coexist in relatively similar ecological and geographical conditions. However, the identification of these isolates was mostly not verified by sequence data and systematic studies on the diversity of soil-borne dermatophytes identified by molecular methods are lacking worldwide. For these reasons the true ecological distribution of these species remains unknown.

The isolation of common etiological agents of onychomycosis (e.g., *T. rubrum* and *T. interdigitale*) is usually considered to be sufficient to confirm the diagnosis. In rarely pathogenic geophilic dermatophytes and nondermatophytic

fungi, however, the positive direct microscopy and repeated isolation should be conducted before the final diagnosis is made. Further cases meeting these criteria are needed to confirm if *T. onychocola* is a significant agent of superficial infections in humans. It is possible that this species can be in fact more frequent than it may seem. Morphological identification of *T. onychocola* can be challenging because of its similarity to some common dermatophytes. Czech isolate was first identified as *T. rubrum* based on intensive red reverse pigmentation on SGA slants and later when the colonies became granular and abundant spiral hyphae were observed in microscope slides, the identification was changed to “zoophilic strain of *T. interdigitale*” [11]. A similar situation occurred in Danish case (this study). In general, it is recommended that molecular methods are used for correct identification, especially in ambiguous cases. Inability of *T. onychocola* to grow at 34°C can be used as a quick distinguishing feature from common pathogenic dermatophytes.

Acknowledgments

We are grateful to Prof. Yvonne Gräser for intermediation of collaboration between Danish and Czech department. This research was supported by the Ministry of Education, Youth and Sports (CZ.1.07/2.3.00/20.0055, CZ.1.07/2.3.00/30.0003 and SVV project) and by the project “BIOCEV - Biotechnology and Biomedicine Centre of the Academy of Sciences and Charles University” (CZ.1.05/1.1.00/02.0109), from the European Regional Development Fund. Molecular genetic analyses were supported by the projects GAUK 8615, 1344214, and 607812. We would like to thank to Dr Miroslav Hylíš for assistance with scanning electron microscopy, Dr Milada Chudíčková for preparation of cultivation media and Birgit Brandt for excellent technical assistance.

Declaration of interest

The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and the writing of the paper.

References

- Havlickova B, Czaika V, Friedrich M. Epidemiological trends in skin mycoses worldwide. *Mycoses* 2008; **51**(Suppl. 4): 2–15.
- Gupta AK. Pharmaco-economic analysis of oral antifungal therapies used to treat dermatophyte onychomycosis of the toenails. *Pharmacoeconomics* 1998; **13**: 243–256.
- Drake LA, Dinehart SM, Farmer ER et al. Guidelines of care for superficial mycotic infections of the skin: tinea corporis, tinea cruris, tinea faciei, tinea manuum, and tinea pedis. *J Am Acad Dermatol* 1996; **34**(2): 282–286.
- Seebacher C, Bouchara J-P, Mignon B. Updates on the epidemiology of dermatophyte infections. *Mycopathologia* 2008; **166**(5–6): 335–352.
- Hubka V, Větrovský T, Dobiášová S et al. Molecular epidemiology of dermatophytoses in the Czech Republic: two-year-study results. *Čes-slov Derm* 2014; **89**(4): 167–174.
- Brasch J, Gräser Y. *Trichophyton eboreum* sp. nov. isolated from human skin. *J Clin Microbiol* 2005; **43**(10): 5230–5237.
- Keller MC, French LE, Hofbauer GFL et al. Erythematous skin macules with isolation of *Trichophyton eboreum*—infection or colonisation? *Mycoses* 2013; **56**(3): 373–375.
- Campbell CK, Borman AM, Linton CJ et al. *Arthroderma olidum*, sp. nov. A new addition to the *Trichophyton terrestre* complex. *Med Mycol* 2006; **44**(5): 451–459.
- Choi JS, Gräser Y, Walther G et al. *Microsporium mirabile* and its teleomorph *Arthroderma mirabile*, a new dermatophyte species in the *M. cookei* clade. *Med Mycol* 2012; **50**(2): 161–169.
- Hubka V, Skorepova M, Dobiasova S et al. Two undescribed dermatophyte species, *Trichophyton* and *Microsporium*, isolated from Czech patients. *Mycoses* 2013; **56**(S3): 162.
- Hubka V, Cmokova A, Skorepova M et al. *Trichophyton onychocola* sp. nov. isolated from human nail. *Med Mycol* 2014; **52**:285–292.
- Hubka V, Dobiasova S, Dobias R et al. *Microsporium aenigmaticum* sp. nov. from *M. gypseum* complex, isolated as a cause of tinea corporis. *Med Mycol* 2014; **52**:387–396.
- Gräser Y, Scott J, Summerbell R. The new species concept in dermatophytes—a polyphasic approach. *Mycopathologia* 2008; **166**(5–6): 239–256.
- Brillowska-Dabrowska A, Saunte DM, Arendrup MC. Five-hour diagnosis of dermatophyte nail infections with specific detection of *Trichophyton rubrum*. *J Clin Microbiol* 2007; **45**(4): 1200–1204.
- Brillowska-Dabrowska A, Nielsen SS, Nielsen HV et al. Optimized 5-hour multiplex PCR test for the detection of tinea unguium: performance in a routine PCR laboratory. *Med Mycol* 2010; **48**(6): 828–831.
- Hubka V, Kolařík M, Kubátová A et al. Taxonomical revision of *Eurotium* and transfer of species to *Aspergillus*. *Mycologia* 2013; **105**: 912–937.
- Hubka V, Lyskova P, Frisvad J et al. *Aspergillus pragensis* sp. nov. discovered during molecular re-identification of clinical isolates belonging to *Aspergillus* section *Candidi*. *Med Mycol* 2014; **52**: 565–576.
- White TJ, Bruns T, Lee S Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, J SJ, White TJ et al. (eds). *PCR protocols: a guide to methods and applications*. San Diego, CA: Academic Press; 1990:315–322.
- Glass NL, Donaldson GC. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Appl Environ Microbiol* 1995; **61**(4): 1323–1330.
- Katoh K, Standley DM. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Mol Biol Evol* 2013; **30**(4): 772–780.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D et al. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* 2013; **30**(12): 2725–2729.
- Rezaei-Matehkolaei A, Mirhendi H, Makimura K et al. Nucleotide sequence analysis of beta tubulin gene in a wide range of dermatophytes. *Med Mycol* 2014; **52**(7): 674–688.
- Beguín H, Pyck N, Hendrickx M et al. The taxonomic status of *Trichophyton quinckeanum* and *T. interdigitale* revisited: a

- multigene phylogenetic approach. *Med Mycol* 2012; 50(8): 871–882.
24. Hubka V, Dobiasova S, Lyskova P et al. *Auxarthron ostraviense* sp. nov., and *A. umbrinum* associated with nondermatophytic onychomycosis. *Med Mycol* 2013; 51: 614–624.
 25. Lysková P, Hubka V, Bodnárová J. A case of tinea corporis caused by *Microsporium incurvatum*—a geophilic species related to *M. gypseum*. *Čes-slov Derm* 2014; 89(4): 187–191.
 26. Kano R, Yamada T, Makimura K et al. *Arthroderma benhamiae* (the teleomorph of *Trichophyton mentagrophytes*) mating type-specific genes. *Mycopathologia* 2011; 171(5): 333–337.
 27. Kano R, Kawasaki M, Mochizuki T et al. Mating genes of the *Trichophyton mentagrophytes* complex. *Mycopathologia* 2012; 173: 103–112.
 28. Li W, Metin B, White TC et al. Organization and evolutionary trajectory of the mating type (MAT) locus in dermatophyte and dimorphic fungal pathogens. *Eukaryot Cell* 2010; 9: 46–58.
 29. Symoens F, Jousson O, Packeu A et al. The dermatophyte species *Arthroderma benhamiae*: intraspecies variability and mating behaviour. *J Med Microbiol* 2013; 62: 377–385.
 30. Atlas RM. *Handbook of Microbiological Media*. 4th ed. Boca Raton, CA: CRC Press; 2010.
 31. Varsavsky E, Ajello L. The perfect and imperfect forms of a new keratinophilic fungus: *Arthroderma ciferrii* sp. nov.: *Trichophyton georgii* sp. nov. *Riv Patol Veg* 1964; 4: 351–364.
 32. Padhye A, Carmichael J. The genus *Arthroderma* Berkeley. *Can J Bot* 1971; 49: 1525–1540.
 33. Young CN. Pseudo-cleistothecia in *Trichophyton rubrum*. *Sabouraudia* 1968; 6: 160–162.
 34. Anzawa K, Kawasaki M, Mochizuki T et al. Successful mating of *Trichophyton rubrum* with *Arthroderma simii*. *Med Mycol* 2010; 48(4): 629–634.
 35. Gräser Y, Kühnisch J, Presber W. Molecular markers reveal exclusively clonal reproduction in *Trichophyton rubrum*. *J Clin Microbiol* 1999; 37(11): 3713–3717.
 36. Koch HA. *Trichophyton thuringiense* spec. nov. *Mykosen* 1969; 12(5): 287–290.
 37. Padhye A, Carmichael J. Mating reactions in the *Trichophyton terrestre* complex. *Med Mycol* 1973; 11(1): 64–69.
 38. Pore R, Tsao G, Plunkett O. A new species of *Arthroderma* established according to biological species concepts. *Mycologia* 1965; 57: 969–973.
 39. Padhye A, Carmichael J. *Arthroderma insingulare* sp. nov., another gymnoasceous state of the *Trichophyton terrestre* complex. *Sabouraudia* 1972; 10(1): 47–51.
 40. L'Ollivier C, Cassagne C, Normand A-C et al. A MALDI-TOF MS procedure for clinical dermatophyte species identification in the routine laboratory. *Med Mycol* 2013; 51(7): 713–720.
 41. Nenoff P, Erhard M, Simon JC et al. MALDI-TOF mass spectrometry—a rapid method for the identification of dermatophyte species. *Med Mycol* 2013; 51(1): 17–24.
 42. Durie EB, Frey D. A new species of *Trichophyton* from New South Wales. *Mycologia* 1957; 49(3): 401–411.
 43. Dawson CO, Gentles J. The perfect states of *Keratinomyces ajel-loi* van-Breuseghem, *Trichophyton terrestre* Durie & Frey and *Microsporium nanum* Fuentes. *Sabouraudia* 1962; 1(1): 49–57.
 44. Křivanec K, Janečková V, Otčenášek M. *Arthroderma melis* spec. nov.—a new dermatophyte species isolated from badger burrows in Czechoslovakia. *Ceska Mykol* 1977; 31: 91–99.
 45. Otčenášek M, Dvořák J, Kunert J. A contribution to the knowledge of the so-called “red strains” of *Trichophyton terrestre*. *Dermatol Wochenschr* 1967; 153: 656–663.
 46. Stockdale PM. *Nannizzia incurvata* gen. nov., sp. nov., a perfect state of *Microsporium gypseum* (Bodin) Guiart et Grigorakis. *Sabouraudia* 1962; 1(1): 41–48.
 47. Stockdale PM. The *Microsporium gypseum* complex (*Nannizzia incurvata* Stockd., *N. gypsea* (Nann.) comb. nov., *N. fulva* sp. nov.). *Sabouraudia* 1964; 3(1): 114–126.
 48. Stockdale PM. *Nannizzia persicolor* sp. nov., the perfect state of *Trichophyton persicolor* Sabouraud. *Med Mycol* 1967; 5(4): 355–359.
 49. Kawasaki M. Verification of a taxonomy of dermatophytes based on mating results and phylogenetic analyses. *Med Mycol* 2011; 52(4): 291–295.
 50. Kawasaki M, Anzawa K, Wakasa A et al. Matings among three teleomorphs of *Trichophyton mentagrophytes*. *Jap J Med Mycol* 2010; 51(3): 143–152.
 51. Kawasaki M, Anzawa K, Mochizuki T et al. Successful mating of a human isolate of *Arthroderma simii* with a tester strain of *A. vanbreuseghemii*. *Med Mycol* 2009; 50(1): 15–18.
 52. Nováková A, Hubka V, Dudová Z et al. New species in *Aspergillus* section *Fumigati* from reclamation sites in Wyoming (USA) and revision of *A. viridinutans* complex. *Fungal Divers* 2014; 64: 253–274.
 53. O’Gorman CM, Fuller HT, Dyer PS. Discovery of a sexual cycle in the opportunistic fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Nature* 2009; 457(7228): 471–474.
 54. Mostert L, Crous PW, Groenewald JE et al. *Togninia* (Calosphaerales) is confirmed as teleomorph of *Phaeoacremonium* by means of morphology, sexual compatibility and DNA phylogeny. *Mycologia* 2003; 95(4): 646–659.
 55. Metz AM, Haddad A, Worapong J et al. Induction of the sexual stage of *Pestalotiopsis microspora*, a taxol-producing fungus. *Microbiology* 2000; 146(8): 2079–2089.
 56. Bentley AR, Summerell BA, Burgess LW. Sexual compatibility in *Fusarium pseudograminearum* (*Gibberella coronicola*). *Mycol Res* 2008; 112(9): 1101–1106.
 57. Gräser Y, El Fari M, Vilgalys R et al. Phylogeny and taxonomy of the family Arthrodermataceae (dermatophytes) using sequence analysis of the ribosomal ITS region. *Med Mycol* 1999; 37(2): 105–114.
 58. Nenoff P, Winter I, Winter A et al. *Trichophyton thuringiense* H.A. Koch 1969. A rare geophilic dermatophyte—now isolated for the first time from man. *Hautarzt* 2014; 65(3): 221–228.

Článek 7

3 **Equine Dermatophytosis due to *Trichophyton bulbosum*,**
4 **a Poorly Known Zoophilic Dermatophyte Masquerading**
5 **as *T. verrucosum***

6 **Pavlina Lyskova · Vit Hubka · Anna Petricakova ·**
7 **Radim Dobias · Adela Cmokova · Miroslav Kolarik**

8 Received: 27 June 2015 / Accepted: 6 August 2015
9 © Springer Science+Business Media Dordrecht 2015

10 **Abstract** *Trichophyton bulbosum* is a zoophilic
11 dermatophyte from the *Arthroderma benhamiae* com-
12 plex with a poorly known distribution. In this study,
13 we report a case of dermatophytosis caused by *T.*
14 *bulbosum* in a 6-year-old male horse who had a skin
15 lesion located in a saddle area. The infection spread
16 rapidly to the upper chest and to both sides of the
17 trunk. The dermatophyte was isolated in culture and
18 identified by sequence analysis of the internal tran-
19 scribed spacer regions (ITS rDNA). To date, this is the
20 first verified case of animal infection due to *T.*
21 *bulbosum* in Europe following the 2012 report of
22 human infection in France. We hypothesize that this

species can be relatively common in horses and 23
donkeys, but it is confused with other zoophilic 24
species responsible for infections with similar clinical 25
manifestations, and when isolated in culture, it is 26
misidentified as the phenotypically similar *T. verru-* 27
cosum. Previous cases of dermatophytosis caused by 28
T. verrucosum-like dermatophytes in horses and 29
donkeys were reviewed together with human infec- 30
tions transmitted from these animals. This summary 31
estimates possible distribution width of *T. bulbosum*. 32
The taxonomy of *T. verrucosum*-like dermatophytes is 33
extremely difficult due to lack of original material and 34
poor morphology of species. Molecular genetic meth- 35
ods are necessary to verify the identification of these 36
fungi. ITS1 or ITS2 region of rDNA alone is sufficient 37
for correct identification. 38

Electronic supplementary material The online version of
this article (doi:10.1007/s11046-015-9931-0) contains supple-
mentary material, which is available to authorized users.

P. Lyskova
Laboratory of Medical Mycology, Department of
Parasitology, Mycology and Mycobacteriology Prague,
Public Health Institute in Usti nad Labem, Sokolovska 60,
186 00 Prague 8, Czech Republic

V. Hubka (✉) · A. Cmokova · M. Kolarik
Department of Botany, Faculty of Science, Charles
University in Prague, Benatska 2, 128 01 Praha 2,
Czech Republic
e-mail: hubka@biomed.cas.cz

V. Hubka · A. Cmokova · M. Kolarik
Laboratory of Fungal Genetics and Metabolism, Institute
of Microbiology of the AS CR, v.v.i., Videnska 1083,
142 20 Praha 4, Czech Republic

V. Hubka
First Faculty of Medicine, Charles University in Prague,
Katerinska 32, 121 08 Prague 2, Czech Republic

A. Petricakova
Dermatological outpatients' department, Kojeticka 1021,
277 11 Neratovice, Czech Republic

R. Dobias
Laboratory of Clinical Mycology, Institute of Public
Health, Partyzanske namesti 7, 702 00 Ostrava,
Czech Republic

39 **Keywords** *Arthroderma benhamiae* complex ·
 40 Enilconazole · Flutrimazole · Horse diseases ·
 41 Superficial mycoses · Zoonotic infections

42 Introduction

43 *Trichophyton equinum* and *Microsporum canis* are the
 44 most common fungal pathogens causing dermatophy-
 45 tosis in horses. These infections are most frequently
 46 found in young animals and typically manifest as dry
 47 lesions, with powdery scales and hairs with breaks
 48 present on their base [1]. The lesions are most
 49 frequently located on the upper chest, flanks, shoulders
 50 and body areas that are exposed to trauma or are in
 51 contact with saddles, bridles and harness [1, 2]. Other
 52 species reported as causative agents of dermatophy-
 53 tosis in horses are *T. mentagrophytes*, *T. verrucosum*
 54 and *M. gypseum*, while *M. praecox* and several other
 55 species have been isolated mostly from asymptom-
 56 atic animals [2–4]. Horse dermatophytosis usually
 57 resolves spontaneously within 1–4 months, but the
 58 treatment is mandatory due to the contagious and
 59 zoonotic nature of the disease. Antifungal therapy
 60 includes topical or oral antifungals, among which
 61 enilconazole, natamycin and griseofulvin have the
 62 widest use [2].

63 *Trichophyton bullosum* is an almost forgotten
 64 zoophilic dermatophyte that has been isolated in the
 65 past from the coat of horses in Africa (Tunisia and
 66 Mali/French Sudan at that time) and the Middle East
 67 (Syria) [5]. The species was revalidated using
 68 sequence data and phylogenetically accommodated
 69 in the *Arthroderma benhamiae* complex [6]. In
 70 2012, the first human infection was reported from
 71 Europe [7], probably transmitted from a donkey
 72 with suspected dermatophyte lesions in a rural area
 73 in France; however, no sample was collected from
 74 the animal.

75 In this study, we present another case of animal
 76 infection, many decades after the original description
 77 of *T. bullosum*. Currently, this is the first verified case
 78 of animal infection caused by *T. bullosum* in Europe.
 79 This case adds to the knowledge base on the ecology of
 80 this little explored dermatophyte. We emphasize that
 81 special attention should be given to dermatophytosis
 82 in horses and donkeys (or in humans who in contact
 83 with them) caused by *T. verrucosum*-like organisms.

Case Report

84
 85 A 6-year-old Quarter Horse developed a weeping
 86 lesion in a saddle area (approximately 10 cm in
 87 diameter) with a subsequent loss of the coat in October
 88 2013. The focus had irregular margins covered with
 89 pustules. The horse was restless and lost weight,
 90 probably due to intense itching. The lesion spread
 91 quickly to the shoulders, hip bones, withers and upper
 92 chest (Fig. 1). Initial therapy included topical antibi-
 93 otics and was unsuccessful, and the skin scales were
 94 subsequently taken (November 19 2013) for myco-
 95 logical examination.

96 The scales were examined by fluorescence micro-
 97 scopy (whitening agent Blankophor; Bayer, Lev-
 98 erkusen, Germany), and fungal septate, branched
 99 hyphae and arthrospores were revealed. Cultures were
 100 grown on Sabouraud dextrose agar (SDA; Trios,
 101 Prague, Czech Republic) at 25 °C for 1 month. After
 102 several days, the hyphae of a slow-growing dermatophyte
 103 were visible. The strain grew better at 35 °C
 104 compared with 25 °C and was first morphologically
 105 identified as *T. verrucosum* (very slow growth and
 106 presence of chlamydoconidia in slides).

107 Following the verification of fungal etiology, the
 108 horse was treated with whole-body baths with an
 109 emulsifiable solution of enilconazole. Subsequently, a
 110 slow improvement was observed, and the lesions
 111 stopped weeping; however, considerable marginal
 112 scaling remained. The bath with enilconazole was

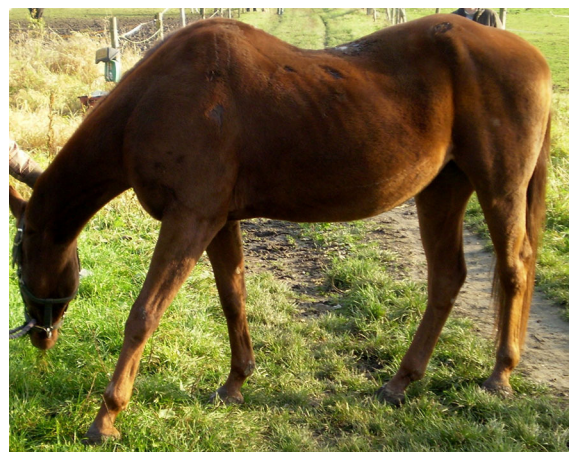


Fig. 1 Dermatophytosis (ringworm) in a horse caused by *Trichophyton bullosum*. The rounded or irregular lesions are visible in the saddle area, withers and hip bone area

113 repeated after 10 days. Following this approach,
114 remission was observed, and the lesions became
115 smaller and without scaling. Afterward, the lesions
116 were treated locally with flutrimazole spray once a day
117 for 3 weeks. The skin started to regrow with weak soft
118 hairs at first. Complete remission was observed in
119 March 2014.

120 At the time of infection, the horse was stabled at a
121 race stable in Mlekojedy (Czech Republic) with other
122 horses and with no history of being abroad. Control
123 swabs, with negative results, were also taken from the
124 other horses stabled in the same building. Before the
125 infection occurred, the horse did not show any signs of
126 injury or trauma and was used for a horse race. In June
127 2013, during flooding season, the horse was trans-
128 ported for 1 week to the stud farm Xaverov and at the
129 beginning of October 2013 to a race in Lysa and
130 Labem (Czech Republic). It was stabled with horses
131 and was never in the contact with cows, sheep or other
132 animals. The source of the infection was not found.
133 Currently, the horse has been moved to another stable
134 in Korycany, and it is healthy and in good nutritional
135 status. All lesions are completely healed and filled in
136 with fine hairs.

137 Materials and Methods

138 Phenotypic Studies

139 The subcultures were grown at 25 °C on MEA (malt
140 extract agar; Oxoid, Basingstoke, UK) and SDA
141 with chloramphenicol and cycloheximide (SDACC;
142 Trios, Prague, Czech Republic) for further myco-
143 logical examination of the micro- and macromor-
144 phologies. Lactic acid with cotton blue was used as
145 a mounting medium for observation of the micro-
146 morphology of the subcultures. Photographs were
147 taken with an Olympus BX-51 microscope (Olym-
148 pus DP72 camera) using Nomarski contrast. Macro-
149 morphology of the colonies was documented using
150 either a binocular loupe Olympus SZ61 (with
151 Olympus Camedia C-5050 Zoom camera) or Canon
152 EOS 500D.

153 Physiological tests with T1–T7 agar media were
154 conducted according to the previously described
155 procedure [8, 9]; growth on commercial (HiMedia,
156 Mumbai, India) and laboratory-made media was
157 tested. In vitro hair perforation and urease tests were

performed according to Ajello and Georg [10] and
Philpot [11], respectively. The ability of species from
A. benhamiae complex to grow at 25 and 37 °C was
tested on MEA and evaluated after 7 and 14 days.

Molecular Studies and Phylogenetic Analysis

The sequence of the internal transcribed spacer of the
ribosomal DNA (ITS rDNA—involving the ITS1-
5.8S-ITS2 cluster) was amplified following the proce-
dure described below. DNA was isolated from 14-day-
old colonies growing on MEA. Archive Pure DNA
yeast and a Gram2 + kit (5PRIME Inc., Gaithersburg,
MD, USA) was used for DNA extraction according to
procedure modified by Hubka et al. [12]. The PCR
mixture (25 µl) contained 50 ng of genomic DNA,
20 pmol of each primer, 0.2 mM of dNTPs (dNTP
master mix; Invitex, Berlin, Germany) and 1 U of M
Maximo Taq DNA polymerase with the respective
buffer (GeneOn GmbH, Nuernberg, Germany). The
ITS rDNA was amplified using the primers ITS5 (5'-
GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG) and ITS4 (5'-
CCTCCGCTTATTGATATGCTTAAG) and condi-
tions described by Hubka et al. [13]. PCR product
purification and sequencing were performed at Macro-
gen Europe (Amsterdam, The Netherlands) using the
terminal primers and internal primers ITS2 (5'- GCTG
CGTTCTTCATCGATGC) and ITS3 (5'- GCATCGA
TGAAGAACGCAGC). The sequences obtained in
this study were deposited into the EMBL (The
European Molecular Biology Laboratory) database
under accession numbers listed in Table 1 (bold print).

The sequences were inspected and aligned as
described by Hubka et al. [14]. Phylogenetic analysis
was conducted in MEGA6 [15] with 1000 bootstrap
replicates. A suitable substitution model was deter-
mined in MEGA6, which proposed the T92 + I model
as the best fitting. The analysis involved 29 nucleotide
sequences. There were a total of 575 positions in the
final dataset with 160 variables and 96 of which were
parsimony informative. All positions with <70 % site
coverage were eliminated. The phylogenetic tree was
calculated with Neighbor-Joining (NJ) and Maximum
Likelihood (ML) analyses. Initial tree for the heuristic
search before ML analysis was obtained automatically
by applying NJ and BioNJ algorithms to a matrix of
pairwise distances estimated using the maximum
composite likelihood approach, and then selecting
the topology with superior log likelihood value.

Table 1 Physiological tests results for *T. bullosum* and selected dermatophyte species read after two weeks of incubation

Species	Physiology											ITS sequence accession number
	T1 [†]	T2	T3	T4	T5	T6	T7	Urease	Hair perforation	Growth at 37/25 °C		
<i>A. benhamiae</i> complex												
<i>T. bullosum</i> CCF 4831	-	-	+	+	+ [^]	-	-	+, d	-	>1	LN589975	
<i>T. concentricum</i> [‡]	-	+	+	+	+	-	w	-	-	<0.5/0	-	
<i>T. erinacei</i> CCF 4473	+	+	+	+	+	-	+	+	+	~1	LN736306	
<i>T. erinacei</i> IHEM 19621	+	+	+	+	+	w [§]	+	w	+	0	LN736305	
<i>T. erinacei</i> [‡]	+	+	+	+	+	+	+	+, w	v	No data	-	
<i>T. eriotrephon</i> CBS 220.25	+	+	+	+	w	- [§]	- [§]	+	-	<0.5	FM992674	
<i>T. verrucosum</i> CCF 4889	-	w	+	+	+	-	-	+, d	-	>1	LN614527	
<i>T. verrucosum</i> [‡]	-	+	+	+	-	-	-	-	-	>1	-	
<i>A. benhamiae</i> CCF 4851	w	+	+	+	+	w [§]	w	w	-	~1	LN736302	
<i>A. benhamiae</i> CCF 4847	+	+	+	+	+	w [§]	+	+	+	~1	LN736303	
<i>A. benhamiae</i> CCF 4848	+	+	+	+	+	- [§]	+	+	+	~1	LN589972	
<i>A. benhamiae</i> CCF 4853	+	+	+	+	+	w [§]	+	+	+	~1	LN736304	
<i>A. benhamiae</i> African race IHEM 4032	+	+	+	+	+	-	+	+	+	<1	JQ407180	
Other dermatophytes included for comparison												
<i>T. equinum</i> CBS 292.81	-	-	w [^]	-	+	-	-	+	-	~1	EF04327	
<i>T. equinum</i> CBS 127.97 [§]	-	-	-	-	+	-	-	+	-	No data	ABWI01001612	
<i>T. tonsurans</i> CBS 496.48 [§]	+	+	+	+	+	+	+	+	-	No data	EF043270	
<i>T. tonsurans</i> CCF 4930	w	+	+	+	w	-	-	+	+	<1	LN736307	
<i>T. schoenleinii</i> [‡]	+	+	+	+	+	+	+	v	-	Grow at 37	-	
<i>M. aenigmaticum</i> CCF 4608 [#]	+	+	+	+	+	-	+	+	+	0	HG518404	

Data based on commercial media (HiMedia) are presented; the differences between commercial media and laboratory-made media are indicated by superscript symbols [^] and [§]

[†] T1—vitamine-free casamino acid agar, basal medium for agars T2–T5, T2 = T1 + inositol, T3 = T2 + thiamine, T4 = T1 + thiamine, T5 = T1 + nicotinic acid, T6—vitamine-free ammonium nitrate agar, basal medium for agar T7, T7 = T6 + L-histidine; “-” —no growth, “+” —growth, “v” —variable, “w” —weak, “d” —delayed (negative or weak after 1 week, positive after 2 weeks)

[^] The test was scored as negative when laboratory-made media were used

[§] The test was scored as positive when laboratory-made media were used

All data were generated in this study with following exceptions

[‡] Data published previously by de Hoog et al. [16], and strain numbers were not mentioned

[§] Data published previously by Gräser et al. [9]

[#] Data published previously by Hubka et al. [21]

205 Maximum parsimony (MP) bootstrap consensus tree
206 inferred from 1000 replicates was calculated using the
207 same software. Branches corresponding to partitions
208 reproduced in <50 % bootstrap replicates were col-
209 lapsed. The MP tree was obtained using the subtree
210 pruning–regrafting (SPR) algorithm in which the
211 initial trees were obtained by the random addition of
212 sequences (10 replicates).

Results

213

Molecular Studies

214

The ITS rDNA sequence of *T. bullosum* obtained in
215 this study was deposited into the EMBL (European
216 Molecular Biology Laboratory database) under the
217 accession number LN589975.
218

Species identification was based on a sequence similarity search using the BLAST server. The resulting sequence was almost identical (603/604 identical base pairs) with the *T. bullosum* sequence FM992675 [6]. This sequence is derived from the isolate CBS 363.35, which is considered to be an authentic Lebasqués strain of *T. bullosum* [6]. Morphologically similar species *T. verrucosum* showed only 96 % similarity by using BLAST similarity search. Both ITS1 and ITS2 region alone are sufficient for distinguishing *T. bullosum* and *T. verrucosum* as they include several conserved substitutions. Two substitutions are also present in conservative 5.8S rDNA region (Suppl. Figure 1).

Phylogenetic analysis based on ITS region of rDNA (Fig. 2) placed *T. bullosum* into the predominantly

zoophilic *A. benhamiae* complex together with *T. erinacei* (95 % similarity), *T. eriotrephon* (95 %), *T. verrucosum*, *T. concentricum* (95 %) and both races of *A. benhamiae* (American–European with 96 % and African with 97 % similarity). The African race of *A. benhamiae* was the most closely related species based on BLAST similarity search as well as phylogenetic analysis. The tree topology was almost identical when using NJ and ML methods (Fig. 2). The clade containing *T. bullosum* and African race of *A. benhamiae* did not group with *A. benhamiae* complex in MP bootstrap consensus tree (Suppl. Figure 2) and created separate clade. This result is not in direct contradiction with previous analyses because of unresolved and weakly supported deeper branching in the tree.

235
236
237
238
239
240
241
242
243
244
245
246
247
248
249
250

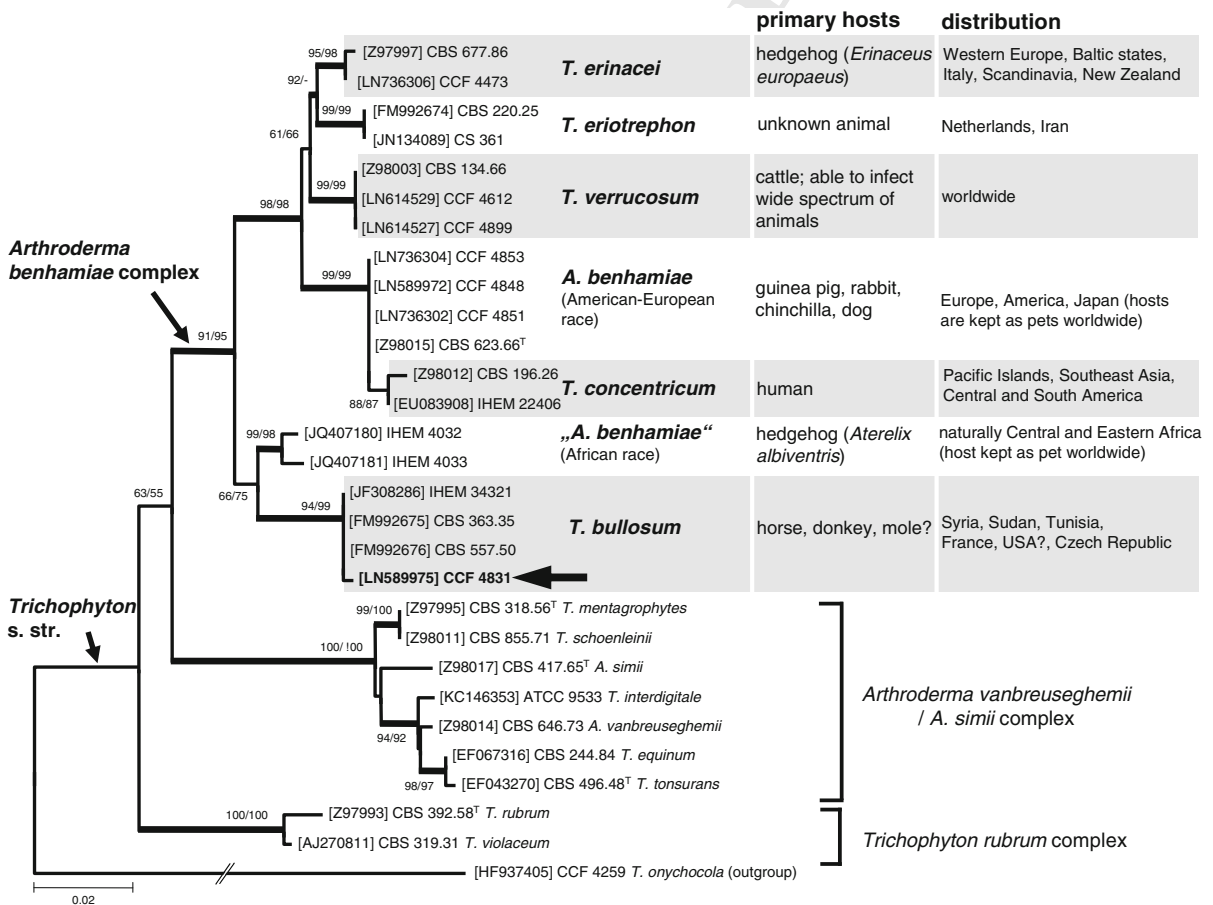


Fig. 2 Neighbor-joining (NJ) tree based on ITS rDNA region showing the relationships of *T. bullosum* to other anthropophilic and zoophilic *Trichophyton* species. Numbers on internodes are bootstrap proportions resulting from NJ and maximum likelihood (ML) analyses. When bootstrap proportions in NJ as well

as ML analyses were >90 % the internode line is thick. Only supports higher than 50 % are shown. The ex-type strains are designated with superscript T. The primary hosts and geographical distribution of species in *Arthroderma benhamiae* complex are designated in the right part of the figure

251 Morphology

252 The colonies of the case isolates were slow growing
 253 (Fig. 3a, b), attaining a 9–11 mm diameter after
 254 1 month on SDACC (13–20 mm after 3 months) and
 255 17–24 mm diameter after 1 month on MEA. They
 256 were cream colored, waxy and slightly elevated in the
 257 center, later becoming slightly lanuginous in some
 258 areas. The intensive submerged growth was apparent
 259 in the marginal parts with dendritic branching of
 260 submerged mycelium (Fig. 3c, d, e). Microscopic
 261 examination revealed the presence of intensely septate
 262 vegetative hyphae (Fig. 3f–k), sometimes with an
 263 apparent fragmentation tendency (Fig. 3f). They
 264 included numerous thick-walled, intercalar and termi-
 265 nal chlamydospores, frequently in chains. Chlamy-
 266 dospores were mainly globose, subglobose or elliptical,
 267 or they had an irregular shape. Their diameter measured
 268 between 4 and 9 μm , sometimes up to 20 μm . Our
 269 culture is available at the Culture Collection of Fungi
 270 (CCF), Department of Botany, Charles University in
 271 Prague under the number CCF 4831. Dried culture was
 272 deposited into the herbarium of the Mycological
 273 Department, National Museum in Prague (PRM
 274 933844).

275 Physiology

276 The results of physiological tests across species from
 277 the *A. benhamiae* complex are presented in Table 1.
 278 Several non-related species outside the complex that
 279 show similar morphology were also included. The
 280 growth on *Trichophyton* agars T1–T7 was tested using
 281 commercial media and laboratory-made media. Dif-
 282 ferences in the results between these media were
 283 observed for *T. bullosum* on T5 agar, *T. eriotrephon* on
 284 T6 and T7 agar and *A. benhamiae* on T6 agar
 285 (Table 1). No variability in *A. benhamiae* complex
 286 was observed on T3 and T4 media. Growth inhibition
 287 on T1 medium distinguished *T. bullosum*, *T. verruco-*
 288 *sum* and *T. concentricum* from other species in the
 289 complex. *T. bullosum* was unable to grow on T2
 290 medium in contrast to the restricted growth of *T.*
 291 *verrucosum* CCF 4889. However, the general pattern
 292 of physiological features was identical for *T. bullosum*
 293 and *T. verrucosum*, including a negative hair perfora-
 294 tion test and positive urease test with delayed response
 295 (note: a negative urease test was reported for *T.*
 296 *verrucosum* by de Hoog et al. [16]). In conclusion, the

entire set of *Trichophyton* agars seems to be insuffi- 297
 cient for differentiation between *T. bullosum* and *T.* 298
verrucosum. In addition, isolate-dependent variability 299
 within species allows limited use of these tests for 300
 rough orientation or in some well-defined examples, 301
 e.g., distinguishing *T. equinum* and *T. tonsurans*. 302
Trichophyton bullosum and *T. verrucosum* share the 303
 ability to grow faster at 37 °C than at 25 °C which is 304
 currently unique across dermatophytes. 305

Discussion 306

Clinical Manifestation and Therapy 307

The foci of infection caused by *T. verrucosum*-like 308
 isolates in horses are mainly located on the saddle 309
 area, shoulders, chest and withers, and less commonly 310
 on the head, neck, buttocks and extremities (Table 2). 311
 Several well-documented infections in donkeys exist, 312
 which are manifested predominantly by lesions not 313
 only on the head and neck [17, 18] but also on the 314
 forelimbs and buttocks [17], while other reports have 315
 lacked a detailed clinical description (Table 2). The 316
 majority of these lesions showed circular arrange- 317
 ments and were covered by crusts or pustules and 318
 characterized by the loss of hair and a hyperemic 319
 margin. Following the acute period, the skin becomes 320
 scaly. The infected hairs are usually microscopically 321
 described as large-spored ectothrix (ectothrix mega- 322
 spore) with the size of arthroconidia ranging from 5 to 323
 10 μm in diameter [19]. In the present study, the 324
 infection caused by *T. bullosum* spread rapidly from 325
 the saddle area to other parts of the body. The lesions 326
 were also pruriginous and affected the behavior of the 327
 animal. 328

Horse dermatophytosis is usually a self-limiting 329
 disease that resolves spontaneously within several 330
 months [2, 20]. Treatment of the affected horses 331
 remains necessary to shorten the duration and to 332
 reduce the severity of the infection. In addition, 333
 treatment of these horses and their environment 334
 prevents the spread of the disease to other animals, 335
 including humans [20]. Enilconazole (wash or spray 336
 with diluted emulsion) and natamycin (topical sus- 337
 pension or spray) are the only drugs officially regis- 338
 tered in the majority of European countries as 339
 veterinary products for the treatment of horse der- 340
 matophytosis and treatment is highly effective in 341



Fig. 3 *Trichophyton bulbosum* CCF 4831; colonies after 3 months of incubation at 25 °C on SDACC (a) and on MEA (b); detail of colonies on SDACC (c–e); vegetative hyphae

disintegrating into arthroconidia or with numerous irregularly shaped intercalary or terminal chlamydospores (f–k); scale bars 10 µm

Table 2 Overview of published infections of horses and donkeys caused by isolates identified as *Trichophyton bulbosum* and *T. verrucosum*, including human cases transmitted from these animals

Species identification	Identification methods used in original studies	Host (number of infected hosts)	Country; year of publication (isolation)	Site of infection (age and sex of patients when available)	Reference
<i>T. bulbosum</i>	Morphology (original description), later ITS rDNA (FM992675)	Horses (8)	Syria (5 horses in 1931 and 1932), Tunisia (2 horses), Mali (1 horse); 1933	Horses 0.5, 1.5, 3, 4, 7, 9, 10 and 13 years old showed lesions on shoulders, saddle area, withers and chest; strongly affected horse from Sudan had lesion also on the head and inner face of the forelimbs	Lebasque [5, 37], Heidemann et al. [6]
	Morphology, ITS rDNA (JF308286)	Human (contact with donkey showing suspected dermatophytosis) (1)	France; 2012	21-year-old male, left forearm	Sitterle et al. [7]
	ITS rDNA (LN589975), morphology, physiology	Horse (1)	Czech Republic; this study (2013)	Saddle area, shoulder area, hip bones area, withers and upper chest	This study
<i>T. verrucosum</i>	Morphology (as 'trichophyton faviforme, à cultures brunes, saillantes et irrégulières')	Horses (39); human (contact with infected horses) (5)	Denmark, France (Paris – Clichy–Levallois); 1896 (1893)	Horse imported from Denmark to France with multiple focuses of alopecia on shoulders and chest; the infection was transmitted to 38 horses from the same stable with similar clinical manifestation; five patients (males, 27-, 29- and 32-year-old; the age is missing for remaining two) with tinea capitis (kerion Celsi - 1×), tinea barbae (1×) and tinea corporis (forearm - 3×)	Bodin [18]
	Morphology (as 'trichophyton faviforme, à cultures grises')	Donkey (purchased healthy three months before manifestation of infection, stabled alone and pastured without contact with infected animals) (1); human (contact with infected donkey) (3)	France (Pantin); 1896 (1895)	Donkey with multiple focuses of alopecia on the neck, ears and head; 36-year-old male - tinea corporis (forearm), 13-year-old girl - tinea faciei (cheek), 10-year-old boy - tinea corporis (calves, feet)	Bodin [18]
	Morphology (as 'T. discoides')	Horse	France; 1925	No details	Fayet [38]
	Morphology	Horse (1)	France; 1926	No details	Brocq-Rousseu [39]

Table 2 continued

Species identification	Identification methods used in original studies	Host (number of infected hosts)	Country; year of publication (isolation)	Site of infection (age and sex of patients when available)	Reference
	Morphology	Horse (1)	France; 1927 (1925–1926)	No details	Brocq-Rousseu et al. [40]
	Morphology (as ' <i>T. faviforme</i> ')	Horse (1)	Netherlands (Utrecht); 1932	Withers	Baudet [32]
	Morphology (as ' <i>T. faviforme</i> ')	Horses and human (numbers not specified)	USA; 1952	Saddle area of horses; no details for infected man	Jillson and Buckley [41]
	Morphology	Horse (not specified)	Canada; 1953	No details	Unpublished data of F. Blank mentioned later in review [31]
	Morphology	Horse (1) (was pastured with cattle heavily infected with <i>T. verrucosum</i>)	UK; 1955 (1953)	No details	Ainsworth and Austwick [42]
	Morphology	Horses (not specified)	Canada; 1955	No details	Bakerspigel and Bremner [43]
	Morphology and physiology	Pony (1)	UK; 1957 (1956)	Several ringworm lesions without specification of body areas	Georg et al. [19]
	Morphology and physiology	Horse (pastured with infected cattle) (1)	USA; 1957 (1953)	Neck and back	Georg et al. [19]
	Morphology and physiology (as <i>T. equinum</i> , but later reidentified as <i>T. verrucosum</i> by Georg et al. [19])	Horse (1)	USA; 1945	No details	Hoerlein [44]
	Morphology	Donkey (2); horse (1)	USA; 1957	No details	Georg and Camp [8]
	Morphology	Burro (1)	USA; 1957	No details	Menges and Georg [45]
	Morphology and physiology	Human (contact with infected horse) (1), horse (1)	Germany; 1959	9-year-old boy, location not specified (tinea corporis); neck and upper chest in horse	Janke and Newig [35]
	Morphology	Donkeys, burro, horse	USA; 1960	Not specified	Georg [4]
	Morphology	Horse (5)	Czech Republic; 1964 (1963)	No details	Otčenášek et al. [33]
	Morphology	Horse (6)	Czech Republic; 1965 (1962–1964)	No details	Dvořák et al. [30]

Table 2 continued

Species identification	Identification methods used in original studies	Host (number of infected hosts)	Country; year of publication (isolation)	Site of infection (age and sex of patients when available)	Reference
Morphology		Horse (pastured with cattle infected with <i>T. verrucosum</i>) (16)	Germany; 1984 (1982)	1- to 3-year-old horses; shoulders, chest, head, saddle area, croup	Weiss et al. [46]
Morphology		Horse (1)	Sudan; 1985	Not specified (inflammatory, purulent lesion)	Elmula and Idris [47]
Morphology		Donkey (3)	Israel; 1988	No details	Ali-Shtayeh et al. [28]
Morphology		Human (contact with horses showing signs of dermatophytosis) (1)	Germany; 1991	17-year-old girl, periorbicular area; no details for horses	Brasch [36]
Morphology		Human (contact with horses showing signs of dermatophytosis) (1), horses (10)	Slovakia; 1995 (1993)	29-year-old female, left shoulder and forearm; numerous rounded lesion on the body of horses without specification	Šimaljaková and Polák [34]
Morphology		Horse (9)	Egypt; 1995	No details	Mahmoud [48]
Morphology		Human (contact with horses) (1)	Australia; 1998	54-year-old male, left leg	Korman et al. [49]
Morphology		Human (contact with horses) (1)	Australia; 2000	21-year-old female, face	Maslen [50]
Morphology		Human (contact with horses) (3)	Italy; 2001 (1995–1999)	31-year-old male, dorsum, palm and wrist of the right hand (contact with horse showing squamous patches of hair loss with crusting); 43-year-old male, upper lip, beard; 39-year-old male, right jaw, beard	Romano et al. [51]
Morphology and physiology		Horse (2)	Iran; 2003 (1994–1998)	No details	Khosravi and Mahmoudi [29]
Morphology		Donkey (2)	Sudan; 2005	2- to 3-year-old donkeys, head, neck, forelimbs, hindquarters	Abdalla et al. [17]

342 infections caused by *T. equinum* [20]. Hypochlorite
 343 bleach and enilconazole environmental sprays may be
 344 used to decontaminate the environment [2, 20]. The
 345 efficiency of enilconazole and natamycin therapy for
 346 *T. verrucosum* infections in horses can be assumed
 347 because both substances are successfully used to
 348 manage cattle ringworm [20]. However, we have not
 349 found any report of antifungal treatment for equine
 350 dermatophytosis caused by *T. verrucosum*-like iso-
 351 lates among previously published cases (Table 2).

352 The horse in our case report was treated with
 353 topical enilconazole emulsifiable solution three times
 354 with intervals of 10 and 15 days. It is generally

355 recommended to treat the dermatophytosis four times
 356 with intervals of 3–4 days [20]. The prolonged
 357 interval of bathing and incomplete treatment course,
 358 in our case, can most likely explain the prolonged
 359 time of infection. The approach was chosen based on
 360 the decision of the owner and his financial capabil-
 361 ities. After the lesions became dry without presence
 362 of the pustules, the horse was treated with flutrima-
 363 zole spray once a day for 3 weeks until the infection
 364 recovered. It is questionable whether the treatment
 365 influenced the cure time or whether the disease
 366 resolved spontaneously due to its self-limiting
 367 nature.

368 Identification of *Trichophyton bullosum*

369 The morphology typical for *T. bullosum* and *T.*
 370 *verrucosum* (slow-growing colonies, no sporulation
 371 on SDA, mycelium with numerous chlamydo-spores
 372 commonly arranged in chains) is found also in *T.*
 373 *concentricum* from the *A. benhamiae* complex. Some-
 374 what similar morphology can be found in non-related
 375 species outside the complex, e.g., relatives of *T.*
 376 *schoenleinii* and *T. mentagrophytes*, some strains of *T.*
 377 *equinum* and *M. aenigmaticum* [16, 21, 22]. All of
 378 these species can be differentiated from *T. verrucosum*
 379 by different nutritional requirements and the inability
 380 to grow or slower growth at 37 °C in comparison with
 381 25 °C (Table 1 and Gräser et al. [9]).

382 Both *T. bullosum* CCF 4831 and *T. verrucosum*
 383 CCF 4889 were used for nutritional tests in this study
 384 (Table 1), requiring thiamine and inositol for good
 385 growth. However, CCF 4889 grew very restrictedly
 386 also at T2 medium (T1 + inositol, without thiamine).
 387 Georg et al. [19] published data for 92 *T. verrucosum*-
 388 like strains: 85 % of them required both inositol and
 389 thiamine, and 15 % required only thiamine. Two *T.*
 390 *verrucosum*-like strains isolated from horses were
 391 both found to require thiamine and inositol [19].

392 We first determined the isolate incorrectly as *T.*
 393 *verrucosum* based on its micromorphological features
 394 and very slow growth. Because *T. verrucosum* is
 395 uncommon in horses, we decided to verify the
 396 identification by sequencing the ITS rDNA region,
 397 and the isolate was reidentified as *T. bullosum* based
 398 on its sequence identity with the authentic Lebasqués
 399 isolate. We have not found any reliable phenotypic
 400 character distinguishing *T. bullosum* and *T. verruco*-
 401 *sum*, and molecular genetic methods are necessary to
 402 verify the identification.

403 Phylogenetic Position of *Trichophyton bullosum*

404 The species is phylogenetically clearly distinct from
 405 phenotypically similar *T. verrucosum* and included in
 406 the *Arthroderma benhamiae* complex (Fig. 2). This
 407 species complex contains at least seven species with
 408 diverse host spectra and distribution. All species are
 409 zoophilic with the exception of *T. concentricum*,
 410 which is an antropophilic species that causes tinea
 411 imbricata (Tokelau) in the Pacific islands and some
 412 endemic regions in Asia and America [16]. All
 413 zoophilic species in the complex are transmissible to

humans and clinically manifest as highly inflamma- 414
 tory tinea corporis or capitis. *Arthroderma benhamiae* 415
 is most commonly isolated from guinea pigs and 416
 rabbits, which are also the main source of infections 417
 for human. This pathogen has become a health 418
 problem, particularly in the Central Europe and Japan 419
 where it causes outbreaks of infection, especially in 420
 children [23, 24]. *Trichophyton erinacei* and one 421
 hitherto unnamed species referred to as ‘African race 422
 of *A. benhamiae*’ are associated with different species 423
 of hedgehogs [25] with different geographical distri- 424
 butions (Fig. 2). *Trichophyton eriotrephon* is known 425
 from three cases of human infection [26] that were 426
 probably transmitted from animal, based on the 427
 clinical picture and phylogenetic position of the 428
 species (Fig. 2). *Trichophyton verrucosum* is a clonal 429
 [27] and slow-growing species, typically associated 430
 with infections in cattle and other ruminants, which 431
 can easily infect other animals, including humans. In 432
 addition to cattle, this species has been reported from 433
 horses, donkeys, rabbits, dogs, cats, pigs, chickens, 434
 canaries, goats, sheep and camels [1, 4, 28–32]. 435

 Probable Distribution and Host Spectrum
 of *T. bullosum*

436
 437
 438 Molecular methods are not routinely used to identify 438
 dermatophytes causing animal infections, and it is 439
 possible that *T. bullosum* isolates in Europe and 440
 elsewhere may be confused with *T. verrucosum*. 441
 Therefore, it is not clear how broad the host range 442
 actually is for *T. verrucosum* and *T. bullosum* or if 443
 there is an overlap within these spectra. We have 444
 evidence based on the published data and data 445
 deposited in GenBank that only *T. verrucosum* has 446
 been isolated from cattle. However, it must be noted 447
 that these data are very limited. Recent studies 448
 examining *T. verrucosum* isolates from cattle and 449
 patients infected by cattle from Japan and Czech 450
 Republic confirmed *T. verrucosum* by ITS rDNA 451
 sequencing in all cases as the agent of infection [24, 452
 27]. Similarly, *T. bullosum* was confirmed only from 453
 horses (original description of Lebasque [5] and this 454
 study) and from a patient who was likely infected 455
 from a donkey [5, 7]. One of the isolates (No. 456
 493 = CBS 557.50) from an unknown source (per- 457
 sonal communication with CBS collection) was later 458
 reidentified by sequence data (FM992676) as *T.* 459
bullosum [6]. Comprehensive, large-scale studies 460

461 have not been published worldwide on epidemiology
 462 of dermatophytosis in cattle and horses using molec-
 463 ular methods to identify pathogenic dermatophytes.
 464 Thus far, *T. verrucosum*-like isolates from horses and
 465 donkeys have never been subjected to molecular
 466 genetic analysis and were identified solely based on
 467 morphology or physiology (Table 2), which is almost
 468 identical in both species (Table 1). Assuming that the
 469 host specificity of *T. bullosum* exists for horses and
 470 donkeys, we hypothesize that at least some of
 471 infections in horses, donkeys and their respected
 472 human infections were caused by *T. bullosum* despite
 473 that they were attributed to *T. verrucosum* (Table 2).
 474 *Trichophyton verrucosum* is usually referred to as
 475 very rare in horses and donkey; however, relatively
 476 large numbers of reports can be found in the literature
 477 worldwide (Table 2). This overview may indicate
 478 roughly how wide can be distribution of *T. bullosum*;
 479 the most of the cases were reported not only from
 480 Western and Central Europe, North Africa and the
 481 Middle East, but also from USA, Canada and
 482 Australia. Simultaneously, it is obvious that *T.*
 483 *verrucosum*, with cattle as the primary host, is capable
 484 of infecting a wide spectrum of animals and that
 485 horses can be infected especially when pastured with
 486 cattle infected by *T. verrucosum*. It was case of
 487 isolates from USA, Australia and also some European
 488 strains, and thus *T. bullosum* probably occurs only in
 489 Europe, Africa and Middle East. The original endemic
 490 area of *T. bullosum* was probably Africa and the
 491 Middle East, where this species was isolated in former
 492 French colonies. We hypothesize that *T. bullosum*
 493 could have been introduced into France through
 494 intensive colony trading and then spread to other
 495 European countries, including the Czech Republic.
 496 The dermatophytosis caused by *T. verrucosum*-like
 497 isolates in the Czech Republic was described also in
 498 the past by Dvořák et al. [30] and Otčenášek et al.
 499 [33]. Similar evidence exists from neighboring coun-
 500 tries such as Slovakia [34] and Germany [35, 36].

501 **Acknowledgments** This research was supported by the
 502 Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech
 503 Republic (SVV project) and the project “BIOCEV—
 504 Biotechnology and Biomedicine Centre of the Academy of
 505 Sciences and Charles University” (CZ.1.05/1.1.00/02.0109)
 506 from the European Regional Development Fund. Molecular
 507 genetic analyses were supported by the projects of Charles
 508 University Grant Agency (GAUK 1344214, GAUK 8615).

Compliance with Ethical Standards

Conflict of interest The authors declare that they have no
 conflict of interest.

References

- Chermette R, Ferreiro L, Guillot J. Dermatophytoses in animals. *Mycopathologia*. 2008;166(5–6):385–405.
- Cafarchia C, Figueredo LA, Otranto D. Fungal diseases of horses. *Vet Microbiol*. 2013;167(1–2):215–34.
- De Vroey C, Wuytack-Raes C, Fossoul F. Isolation of saprophytic *Microsporium praecox* Rivalier from sites associated with horses. *Med Mycol*. 1983;21(3):255–7.
- Georg LK. Animal ringworm in public health: diagnosis and nature. Washington, DC: US Government Printing Office; 1960.
- Lebasque J. Les champignons des teignes du cheval et des bovidés. Paris Faculté des Sciences de Paris; 1933.
- Heidemann S, Monod M, Gräser Y. 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*. 2010;162(2):282–95.
- Sitterle E, Frealle E, Foulet F, Cabaret O, Cremer G, Guillot J, et al. *Trichophyton bullosum*: a new zoonotic dermatophyte species. *Med Mycol*. 2012;50(3):305–9.
- Georg LK, Camp LB. Routine nutritional tests for the identification of dermatophytes. *J Bacteriol*. 1957;74(2):113–21.
- Gräser Y, Kuijpers AFA, Presber W, De Hoog GS. Molecular taxonomy of *Trichophyton mentagrophytes* and *T. tonsurans*. *Med Mycol*. 1999;37(5):315–30.
- Ajello L, Georg LK. In vitro hair cultures for differentiating between atypical isolates of *Trichophyton mentagrophytes* and *Trichophyton rubrum*. *Mycopathologia*. 1957;8(1):3–17.
- Philpot C. The differentiation of *Trichophyton mentagrophytes* from *T. rubrum* by a simple urease test. *Med Mycol*. 1967;5(3):189–93.
- Hubka V, Novakova A, Kolarik M, Jurjevic Z, Peterson SW. Revision of *Aspergillus* section *Flavipedes*: seven new species and proposal of section *Jani* sect. nov. *Mycologia*. 2015;107(1):169–208.
- Hubka V, Lyskova P, Frisvad JC, Peterson SW, Skorepova M, Kolarik M. *Aspergillus pragensis* sp. nov. discovered during molecular re-identification of clinical isolates belonging to *Aspergillus* section *Candidi*. *Med Mycol*. 2014;52:565–76.
- Hubka V, Nissen C, Jensen R, Arendrup M, Cmokova A, Kubatova A. Discovery of a sexual stage in *Trichophyton onychocola*, a presumed geophilic dermatophyte isolated from toenails of patients with a history of *T. rubrum* onychomycosis. *Med Mycol*. 2015; doi:10.1093/mmy/myv044.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipowski A, Kumar S. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol Biol Evol*. 2013;30(12):2725–9.

- 564 16. de Hoog GS, Guarro J, Gené J, Figueras MJ. Atlas of
565 Clinical Fungi, 3rd. CD-ROM ed. Utrecht: CBS-KNAW
566 Fungal Biodiversity Centre; 2009.
- 567 17. Abdalla W, Suliman E, Gabbar A. A report on *Trichophyton*
568 *verrucosum* in donkeys in the Sudan. Sudan J Vet Res.
569 2005;20:83–5.
- 570 18. Bodin E. Les teignes tondantes du cheval et leurs inocula-
571 tions humaines. Paris 1896.
- 572 19. Georg LK, Kaplan W, Camp L. Equine ringworm with
573 special reference to *Trichophyton equinum*. Am J Vet Res.
574 1957;18(69):798–810.
- 575 20. Rochette F, Engelen M, Vanden Bossche H. Antifungal
576 agents of use in animal health—practical applications. J Vet
577 Pharmacol Ther. 2003;26(1):31–53.
- 578 21. Hubka V, Dobiasova S, Dobias R, Kolarik M. *Microsporium*
579 *aenigmaticum* sp. nov. from *M. gypseum* complex, isolated
580 as a cause of tinea corporis. Med Mycol. 2014;52:387–96.
- 581 22. Dvořák J, Otčenášek M. Mycological diagnosis of animal
582 dermatophytoses. Praha: Academia; 1969.
- 583 23. Takeda K, Nishibu A, Anzawa K, Mochizuki T. Molecular
584 epidemiology of a major subgroup of *Arthroderma ben-*
585 *hamiae* isolated in Japan by restriction fragment length
586 polymorphism analysis of the non-transcribed spacer region
587 of ribosomal RNA gene. Jpn J Infect Dis. 2012;65:233–9.
- 588 24. Hubka V, Větrovský T, Dobiášová S, Skořepová M, Lys-
589 ková P, Mencl K, et al. Molecular epidemiology of der-
590 matophytoses in the Czech Republic: two-year-study
591 results. Čes-slov Derm. 2014;89(4):167–74.
- 592 25. Takahashi Y, Sano A, Takizawa K, Fukushima K, Miyaji M,
593 Nishimura K. The epidemiology and mating behavior of
594 *Arthroderma benhamiae* var. *erinacei* in household four-
595 toed hedgehogs (*Atelerix albiventris*) in Japan. Jpn J Med
596 Mycol. 2003;44(1):31–8.
- 597 26. Rezaei-Matehkolaei A, Makimura K, de Hoog S, Shidfar
598 MR, Zaini F, Eshraghian M, et al. Molecular epidemiology
599 of dermatophytosis in Tehran, Iran, a clinical and microbial
600 survey. Med Mycol. 2013;51(2):203–7.
- 601 27. Kano R, Yoshida E, Yaguchi T, Hubka V, Anzawa K,
602 Mochizuki T, et al. Mating type gene (MAT1-2) of *Tri-*
603 *chophyton verrucosum*. Mycopathologia. 2014;177:103–12.
- 604 28. Ali-Shtayeh M, Arda H, Hassouna M, Shaheen S. Ker-
605 atinophilic fungi on the hair of cows, donkeys, rabbits, cats,
606 and dogs from the West Bank of Jordan. Mycopathologia.
607 1988;104(2):109–21.
- 608 29. Khosravi A, Mahmoudi M. Dermatophytes isolated from
609 domestic animals in Iran. Mycoses. 2003;46(5–6):222–5.
- 610 30. Dvorak J, Otcenasek M, Komarek J. Das Spektrum der aus
611 Tierläsionen in Ostböhmen in den Jahren 1962–1964 iso-
612 lierten Dermatophyten. Mycoses. 1965;8(4):126–7.
- 613 31. Blank F. Dermatophytes of animal origin transmissible to
614 man. Am J Med Sci. 1955;229(3):302–16.
- 615 32. Baudet EARF. Recherches experimentales sur les *Tri-*
616 *chophyton* animaux a cultures faviformes. Ann Parasitol
617 Hum Comp. 1932;10(6):520–41.
- 618 33. Otčenášek M, Dvořák J, Komárek J. K mykologické diag-
619 nostice trichfyčí vyvolaných *Trichophyton verrucosum*
620 Bodin 1902. Vet Med (Praha). 1964;1964(5):391–8.
- 621 34. Šimaljaková M, Polák I. Zoonotic dermatomycoses in urban
622 populations. Epidemiol Mikrobiol Imunol. 1995;44(4):
623 175–6.
- 624 35. Janke D, Newig H. *Trichophyton verrucosum* als erreger
625 von trichophytien bei mensch und tier in oberhessen.
626 Mycoses. 1959;2(3):75–89.
- 627 36. Brasch J. Periorbicular *Trichophyton verrucosum* infec-
628 tions. Hautarzt. 1991;42(11):717–20.
- 629 37. Lebasque J. Recherches morphologiques et biologiques sur
630 les *Trichophyton* mégasporés du cheval et du boeuf. Ann de
631 Parasitol. 1934;12:418–44.
- 632 38. Fayet PA. Traitement et prophylaxie des teignes chez le
633 cheval. Paris: Editions de la Revue de Pathologie comparée
634 et d'hygiène générale; 1925.
- 635 39. Brocq-Rousseu D. Etude épidémiologique des teignes du
636 cheval. Bull Acad Natl Med. 1926;95(10):242–3.
- 637 40. Brocq-Rousseu D, Urbain A, Barotte J. Étude des teignes du
638 cheval et de l'immunité dans les teignes expérimentales.
639 Ann Inst Pasteur (Paris). 1927;41:513–51.
- 640 41. Jillson OF, Buckley WR. Fungous disease in man acquired
641 from cattle and horses: (due to *Trichophyton faviforme*).
642 N Engl J Med. 1952;246(26):996–9.
- 643 42. Ainsworth G, Austwick P. A survey of animal mycoses in
644 Britain: mycological aspects. Trans Br Mycol Soc. 1955;
645 38(4):369–86.
- 646 43. Bakerspigel A, Bremner R. Ringworm in Saskatchewan
647 caused by *Trichophyton verrucosum*. Can Med Assoc J.
648 1955;73(8):665.
- 649 44. Hoerlein AB. Studies on animal dermatomycoses. Cornell
650 Vet. 1945;35:287–307.
- 651 45. Menges RW, Georg LK. Survey of animal ringworm in the
652 United States. Public Health Rep. 1957;72(6):503–9.
- 653 46. Weiss R, Földy I, Christoph H. *Trichophyton-verrucosum-*
654 *Infektion bei Pferden*. Tierärztliche Praxis. 1984;12:
655 49–53.
- 656 47. Elmula AF, Idris UEAA. Ringworm in a horse caused by
657 *Trichophyton verrucosum*. Bull Anim Health Prod Afr.
658 1985;33:17–8.
- 659 48. Mahmoud A-L. Dermatophytes and other keratinophilic
660 fungi causing ringworm of horses. Folia Microbiol.
661 1995;40(3):293–6.
- 662 49. Korman TM, Fuller A, Dowling JP. Inflammatory tinea
663 corporis due to *Trichophyton verrucosum*. Clin Infect Dis.
664 1998;26(1):220–1.
- 665 50. Maslen MM. Human cases of cattle ringworm due to *Tri-*
666 *chophyton verrucosum* in Victoria, Australia. Australas J
667 Dermatol. 2000;41(2):90–4.
- 668 51. Romano C, Massai L, Gianni C, Crosti C. Case reports. Six
669 cases of infection due to *Trichophyton verrucosum*. Myco-
670 ses. 2001;44(7–8):334–7.