

Aus dem Institut für Mikrobiologie und Hygiene
der Medizinischen Fakultät Charité
Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

DNA-Polymorphismen der *internal transcribed spacer*-Region zur
Differenzierung anthropophiler und zoophiler Spezies von *Trichophyton*
mentagrophytes sensu lato

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae
(Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité - Universitätsmedizin Berlin

von
Stefan Heidemann
aus Eberswalde-Finow

Gutachter: 1. Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Y. Gräser
 2. Priv.-Doz. Dr. U.-C. Hipler
 3. Prof. Dr. med. J. Brasch

Datum der Promotion: 16. Mai 2010

Zusammenfassung

Dermatophyten sind die Hauptursache für oberflächliche Mykosen der Haut bei Menschen und Tieren. Molekulargenetische Untersuchungen haben einen nützlichen Einblick in die Phylogenie und Taxonomie der Dermatophyten gegeben und so geholfen die Schwierigkeiten der konventionellen Diagnostik zu umgehen.

Trichophyton mentagrophytes sensu lato beinhaltet anthropophile und zoophile Spezies. Obwohl bereits verschiedene molekulargenetische Marker zur Differenzierung von Stämmen dieses Komplexes entwickelt wurden bleibt die korrekte Identifizierung problematisch, speziell die Abgrenzung anthropophiler und zoophiler Stämme der Spezies *T. interdigitale*. Diese Differenzierung ist jedoch für die Auswahl der adäquaten antimykotischen Therapie von großer Bedeutung.

Aus diesem Grund wurden 130 Isolate, die zuvor durch konventionelle Diagnostik als *T. mentagrophytes ss. lato* identifiziert wurden, mithilfe verschiedener molekulargenetischer Methoden, wie RFLP und Sequenzanalyse der PCR-amplifizierten ITS-Region der ribosomalen DNA, untersucht. Diese Daten wurden mit denen der konventionellen Diagnostik verglichen um eventuelle Gemeinsamkeiten zu entdecken.

Die verschiedenen Spezies von *T. mentagrophytes ss. lato* zeigten mehrere individuelle RFLP-Schnittmuster und die folgende Sequenzanalyse der ITS-Region konnte, insbesondere für *T. interdigitale* Polymorphismen aufzeigen, die für die Differenzierung zwischen anthropophilen und zoophilen Stämmen hilfreich sind.

Die Auswertung der epidemiologischen Daten ergab, dass unterschiedliche Wirtsspektren für die zoophilen Stämme von *T. interdigitale* im Vergleich zur primär zoophilen Spezies *A. benhamiae* bestehen. Weiterhin konnten unterschiedliche klinische Bilder, der durch anthropophile und zoophile *T. interdigitale*-Stämme verursachten Infektionen, herausgefunden werden.

Schlagerwörter: RFLP, Phylogenie, Tinea, Trichophyton

Abstract

Dermatophytes are the main cause of superficial mycoses of the skin in humans and animals. Molecular genetic studies have given useful insights in the phylogeny and taxonomy of the dermatophytes and have thus helped to avoid the difficulties of conventional diagnostic methods.

Trichophyton mentagrophytes sensu lato contains anthropophilic and zoophilic species. Although different molecular markers for the differentiation of strains belonging to this complex have been developed the correct identification remains problematic, especially with the delineation of anthropophilic and zoophilic strains of *T. interdigitale*. However, this differentiation is essential for the choice of the correct antimycotic treatment.

For this reason 130 strains identified as *T. mentagrophytes ss. lato* by conventional methods have been examined with different molecular methods, such as RFLP and sequence analysis of the PCR-amplified ITS-region of the ribosomal DNA. This data was then compared to the results of the conventional methods to discover possible similarities.

The different species of *T. mentagrophytes ss. lato* showed multiple individual RFLP patterns and the following sequence analysis revealed several polymorphisms that can be helpful for the differentiation between anthropophilic and zoophilic strains of *T. interdigitale* in particular. The comparison of the epidemiological data showed that zoophilic strains of *T. interdigitale* have different hosts than the zoophilic species *A. benhamiae*. Furthermore, different clinical pictures resulting from infection with anthropophilic and zoophilic strains of *T. interdigitale* could be identified.

Keywords: RFLP, phylogeny, tinea, trichophyton

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	VIII
Tabellenverzeichnis	IX
Abkürzungsverzeichnis	X
1 Einleitung	1
1.1 Dermatophyten	1
1.1.1 Definition	1
1.1.2 Taxonomie	1
1.1.3 Dermatophytosen	2
1.2 Therapie der Dermatomykosen	3
1.2.1 Substanzklassen	3
1.2.2 Tinea pedis	4
1.2.3 Onychomykose	4
1.2.4 Tinea corporis	5
1.2.5 Grenzen und Probleme	5
1.3 Ribosomales Operon und ITS	6
1.3.1 Aufbau	6
1.3.2 Verwendung in der Diagnostik	6
1.4 <i>Trichophyton mentagrophytes sensu lato</i>	7
1.4.1 Taxonomie	7
1.4.2 <i>T. interdigitale</i>	8
1.4.3 <i>T. mentagrophytes</i> ss. <i>str.</i> und <i>T. simii</i>	9
1.4.4 <i>A. benhamiae</i>	9
1.5 Ziel der Arbeit	9

2	Methoden	11
2.1	Nährböden	11
2.2	Material	11
2.3	Morphologische Identifizierung	11
2.4	Extraktion und Aufbereitung der DNA	12
2.4.1	DNA-Extraktion	12
2.4.2	Konzentrationsbestimmung	13
2.5	PCR der <i>internal transcribed spacer</i> -Region	13
2.5.1	Verwendete Primer	13
2.5.2	Vorbereitung der PCR	13
2.5.3	PCR-Cycling	14
2.5.4	Elektrophorese	14
2.6	RFLP	15
2.6.1	Aufbereitung des PCR-Produkts	15
2.6.2	Restriktion mit <i>Mva</i> 1	15
2.6.3	Elektrophorese	15
2.7	Sequenzierung	16
2.8	Multiple Alignment und Phylogenie	16
2.8.1	Alignments	16
2.8.2	Bootstrapping und phylogenetische Konstruktion	16
2.9	Bildmaterial	17
 3	 Ergebnisse	 18
3.1	RFLP	18
3.1.1	Schnittmuster	18
3.1.2	Klassifizierung	20
3.2	Polymorphismen	24
3.2.1	<i>T. interdigitale</i>	24
3.2.2	<i>T. mentagrophytes</i> ss. str. und <i>T. simii</i>	26
3.2.3	<i>A. benhamiae</i>	27
3.3	Phylogenie	27
3.3.1	<i>T. interdigitale</i> , <i>T. mentagrophytes</i> ss. str. und <i>T. simii</i>	27
3.3.2	<i>A. benhamiae</i>	29

3.4	Morphologie	31
3.4.1	<i>T. interdigitale</i>	34
3.4.2	<i>A. benhamiae</i>	37
3.5	Assoziation zwischen Krankheitsbild und Genotyp	38
3.5.1	Tinea pedis	38
3.5.2	Onychomykose	38
3.5.3	Tinea corporis	38
3.5.4	Zoophile Infektionen	39
4	Diskussion	40
4.1	Molekulargenetische Methodik	40
4.1.1	DNA-Extraktion	40
4.1.2	PCR	40
4.1.3	RFLP	41
4.1.4	Sequenzierung	41
4.2	Erkenntnisse durch Sequenzanalyse und phylogenetische Betrachtungen	42
4.2.1	<i>T. interdigitale</i>	42
4.2.2	<i>T. mentagrophytes</i> ss. <i>str.</i> und <i>T. simii</i>	43
4.2.3	<i>A. benhamiae</i>	43
4.2.4	Validität der Polymorphismen	45
4.2.5	Fehlidentifizierungen	45
4.2.6	Morphologie	46
4.3	Klinische Relevanz	46
4.4	Ausblick	48
	Literaturverzeichnis	50

Abbildungsverzeichnis

1.1	ITS-Region	6
1.2	Spiralhyphen und Mikrokonidien	8
3.1	RFLP-Fragmente	19
3.2	Multiple Alignment ITS-1-Region	25
3.3	Multiple Alignment 5.8S rDNA und ITS-2-Region	26
3.4	Übersichtsbaum	27
3.5	NJ-Tree <i>T. interdigitale</i>	28
3.6	MP-Tree <i>A. benhamiae</i>	30
3.7	<i>T. interdigitale</i> Typ I	34
3.8	<i>T. interdigitale</i> Typ II	35
3.9	<i>T. interdigitale</i> Typ III	36
3.10	<i>T. interdigitale</i> Typ IV	37
3.11	Tinea pedis	38
3.12	Onychomykose	38
3.13	Tinea corporis	38
3.14	Zoophile Infektionen	39

Tabellenverzeichnis

3.1	RFLP-Fragmentgrößen	18
3.2	Referenzstämme	20
3.3	Klinische Isolate	22
3.4	Morphologie	31

Abkürzungsverzeichnis

AB	<i>Arthroderma benhamiae</i>
CBS	Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, Niederlande
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
IFM	Research Center for Pathogenic Fungi und Microbial Toxicoses, Chiba University, Japan
IHEM	Scientific Institute of Public Health, Mycology Section, Brüssel, Belgien
KMU	Kanazawa Medical University, Japan
RV	Institute de Médecine Tropicale Prince Leopold Antwerpen, Belgien
TB	<i>Trichophyton bullosum</i>
TBE	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan-Borat-Ethylendiamintetraessigsäure
TC	<i>Trichophyton concentricum</i>
TE	<i>Trichophyton erinacei</i>
TEQ	<i>Trichophyton equinum</i>
TET	<i>Trichophyton eriotrephon</i>
TI	<i>Trichophyton interdigitale</i>
TI*	<i>Trichophyton interdigitale</i> Typ IV
TM	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>
TR	<i>Trichophyton rubrum</i>

TS *Trichophyton simii*

TSC *Trichophyton schoenleinii*

TT *Trichophyton tonsurans*

TV *Trichophyton verrucosum*

UAMH Microfungus Collection and Herbarium, University of Alberta, USA

Danksagung

Mein Dank gilt zuallererst meiner Betreuerin Frau PD Dr. Yvonne Gräser, für die Bereitstellung des Themas und der notwendigen Ressourcen zur Bearbeitung desselbigen, ferner Dr. Michel Monod, Dr. Antonio Rezusta, Mary Moore, Dr. Shu Wen Deng und Herr Peter Kutzer für die Bereitstellung der zahlreichen klinischen Isolate.

Weiterhin möchte ich mich bei meinen Kollegen der AG Gräser und AG Schönian des Instituts für Mikrobiologie und Hygiene der Charité Universitätsmedizin Berlin, insbesondere Florian Pankewitz, Carola Schweynoch und Oliver Marg, für die freundliche Zusammenarbeit und Hilfsbereitschaft bedanken.

Bei meiner Frau Ulrike Heidemann und meiner Tochter Adele möchte ich mich bedanken, da sie mich stets in meinem Handeln unterstützten und für die notwendige Ablenkung sorgten, außerdem bei meiner Mutter Margitta Heidemann, die die Arbeit im Verlauf mehrfach las und nützliche Tipps zu Ausdruck und Gestaltung gab.

Mein besonderer Dank gilt Sebastian Steinmetz, der mich an den Textsatz mit \LaTeX herangeführt hat und mir während des Entstehungsprozesses dieser Dissertation bei Problemen mit Rat und Tat zur Seite stand.

1 Einleitung

1.1 Dermatophyten

1.1.1 Definition

Dermatophyten sind eine Gruppe von Pilzen, die aufgrund von speziellen Enzymen (Keratinasen, Chitinasen) in der Lage, sind keratinhaltige Gewebe, wie die Haut und ihre Anhangsgebilde (Haare, Nägel, Schuppen), zu besiedeln und zu infizieren. Die Infektion ist zunächst auf die Epidermis, also die toten Hautschichten, begrenzt, kann jedoch in speziellen Fällen, z.B. bei immunsupprimierten Patienten auch tiefer gelegene Areale infiltrieren [8, 10]

1.1.2 Taxonomie

Die Spezies der Familie Arthrodermataceae gehört zur Ordnung Onygenales und somit in die Abteilung der Ascomyzeten. Die Ascomyzeten werden aufgrund ihrer sexuellen Vermehrungsform oder perfekten Form (Teleomorph) klassifiziert. Die teleomorphe Gattung innerhalb der Familie der Arthrodermataceae heißt Arthroderma. Die meisten Dermatophyten bilden jedoch nur die asexuelle Vermehrungsform (Anamorph) aus. Nach heutigem Kenntnisstand lassen sich die Dermatophyten deshalb in drei anamorphe Gattungen (Epidermophyton, Microsporum und Trichophyton) unterteilen. In den 60er Jahren, und teilweise auch heute noch, wurden diese Teleomorphe durch Kreuzungsexperimente bzw. „mating“ evaluiert [16, 63, 55, 37], d.h. ließen sich zwei Dermatophytenstämme miteinander kreuzen, waren sie der selben teleomorphen Spezies zugehörig. Der Erfolg solcher Kreuzungsexperimente ist jedoch sehr stark von den Bedingungen im Labor (Medienzusammensetzung, Temperatur) abhängig und variiert von Art zu Art. Deshalb stellten diese Versuche für die Klassifizierung der Dermatophyten eine eher unbefriedigende Methode dar.

Eine weitere Möglichkeit ist die Systematisierung der Dermatophytenarten auf Basis morpho-

logischer Kriterien, wie Form und Größe von Makro- und Mikrokonidien, Koloniewachstum, Produktion von Pigmenten und anderen physiologischen Eigenschaften, wie Haarperforation und Produktion von Urease [2]. Die auf diesen Kriterien basierende Diagnostik ist heute in vielen Laboren noch Goldstandard, kann aber problematisch sein, da vor allem die anthropophilen Dermatophytenarten die Fähigkeit verloren haben, gut zu sporulieren und nach mehrfacher Subkultivierung ihre spezifischen Merkmale nicht mehr ausbilden (Pleomorphie) [44]. Es kommt noch hinzu, dass eine Vielzahl an Nährböden für die Anzucht von Dermatophytenkulturen vorhanden ist. Diese sind mitunter an die Bedürfnisse der verschiedenen Arten angepasst (pH, Peptongehalt, Kohlenhydrate, etc.) Dadurch kann derselbe Stamm morphologisch unterschiedlich wachsen und Stämme unterschiedlicher Dermatophytenspezies auf bestimmten Nährmedien nicht zu unterscheiden sein [7]. All diese Faktoren führen dazu, dass die Identifizierung eines Isolates aufgrund morphologischer und physiologischer Parameter nicht immer reproduzierbar und deshalb häufig nicht verlässlich ist.

Aus diesem Grund gehörten die Dermatophyten auch zu den ersten Pilzen, deren Taxonomie erheblich von den modernen molekulargenetischen Methoden profitierte. Die Ansätze zur phylogenetischen Systematik waren zunächst vielfältig, aber nicht alle Ansätze lieferten eine ausreichende Differenzierung der einzelnen Taxa. Hier seien RFLP der mitochondrialen DNA [46], Gene der Chitinsynthase [35] und die Gene weiterer Proteine [33, 36], sowie diverse Abschnitte der ribosomalen DNA [14, 21, 32] genannt. Es stellte sich heraus, dass die variable ITS-Region geeignet erschien, um phylogenetische Zusammenhänge innerhalb der Familie Arthrodermataceae zu analysieren [19].

1.1.3 Dermatophytosen

Das Erscheinungsbild einer Infektion mit Dermatophyten wird gemeinhin als Dermatophytose bezeichnet. Dermatomykosen (Infektionen der Haut mit Pilzen) sind in Deutschland die häufigsten Infektionen der Haut. Von der Tinea pedis („Fußpilz“) sind ca. 30 % der deutschen Bevölkerung betroffen [4]. Wie schon erwähnt, sind die Dermatophyten auf Keratin als Nährstoff angewiesen und befallen deshalb die Haut und ihre Anhangsgebilde. Einige Dermatophytenspezies sind auf bestimmte Areale spezialisiert. So befällt *E. floccosum* Haut und Nägel, während *M. audouinii* nur die Haare infiziert. Die anthropophilen Dermatophytenspezies machen allerdings nur einen geringen Anteil der gesamten Gattung aus, und viele Erreger werden dem Menschen deshalb nicht gefährlich. Der Übertragungsweg ist vielfältig,

so kann es, z.B. in Schwimmhallen, Saunen oder durch gemeinsam genutztes Schuhwerk, zu einer Übertragung von Mensch zu Mensch kommen, aber, beispielsweise bei Kontakt mit einem infizierten Haustier auch von Tier zu Mensch übertragen werden [9].

Die Infektionen werden als Tinea bezeichnet und mit einem Zusatz - je nach Lokalisation - versehen, z. B. die bereits erwähnte Tinea pedis, oder Tinea corporis, Tinea capitis, Tinea unguium (Nagelmykose/Onychomykose), etc. Der häufigste Erreger für Dermatophyosen ist *T. rubrum*, mit einer Häufigkeit von 62,5 % wird *T. rubrum* vor allem von Patienten mit Tinea pedis und Onychomykosen isoliert [51]. Betrachtet man nur die Onychomykosen, die durch Dermatophyten verursacht wurden beträgt der Anteil von *T. rubrum* sogar 91 %, gefolgt von *T. interdigitale* mit 7,7 % [43].

Der zweithäufigste Erreger ist mit 24,5 % *T. interdigitale* [51], die anthropophile Form kommt ähnlich *T. rubrum* vor allem bei Tinea pedis und Onychomykose vor, die zoophile Form infiziert vorrangig Nagetiere (Meerschweinchen, Hamster, etc. [48]) und Katzen [11]. Eine Ansteckung des Menschen, v.a. Kinder und Jugendliche, durch Haustiere ist beobachtet worden [9, 44]. Das häufigste Krankheitsbild hierbei ist die Tinea corporis [45].

Weitere Beispiele für Dermatophyten, die vom Tier auf den Menschen übertragen werden können seien *T. verrucosum* (Rinderflechte) und die Trichophytonspezies von *A. benhamiae* (Meerschweinchen) genannt. Hier ist die Gefahr einer Ansteckung besonders von der Exposition abhängig, so kann z. B. eine Infektion auf Kinder übertragen werden, die mit den infizierten Meerschweinchen spielen[9].

1.2 Therapie der Dermatomykosen

1.2.1 Substanzklassen

Man unterteilt die Antimykotika grob in systemisch und topisch wirksame Substanzen. Einige sind sowohl topisch als auch systemisch wirksam. Insgesamt sind zehn verschiedene Substanzklassen bekannt, die in unterschiedliche Stoffwechselmechanismen der Pilze eingreifen. Beispiele sind die Hemmung der Squalen-Epoxidase durch Terbinafin und die Mitosehemmung durch Griseofulvin. Die wichtigsten Gruppen für die Behandlung von Dermatomykosen sind die Allylamine (z. B. Terbinafin), die Azole (Imidazole und Triazole), die Benzofurane (z. B. Griseofulvin), die Morpholine (z. B. Amorolfin) und die Pyridone (z. B. Ciclopiroxolamin). Für

die systemische Therapie sind zugelassen: Fluconazol, Griseofulvin, Itraconazol, Ketoconazol, Miconazol und Terbinafin. Für die topische Therapie können alle zuvor genannten, sowie Amorolfen und diverse Azol-Antimykotika eingesetzt werden.

1.2.2 Tinea pedis

Im Regelfall ist die topische Behandlung mit einem Antimykotikum aus der Gruppe der Azole (z. B. Itraconazol, Fluconazol) oder Terbinafin ausreichend. Beide Gruppen besitzen zudem auch eine gewisse antibakterielle Aktivität [25]. Die Behandlungsdauer richtet sich nach dem Ausmaß der Infektion. Für Terbinafin wird eine Behandlungsdauer von zwei Wochen, bei Imidazol von vier Wochen empfohlen. Der Behandlungserfolg wird klinisch beurteilt. Bei anhaltender Infektion kann unter Umständen auch ein längeres Therapieintervall von mehreren Wochen bis Monaten nötig sein.

Bei nicht beherrschbaren Verläufen der Tinea pedis, v.a. bei stark hyperkeratotischer Tinea pedis, ist aufgrund der unmöglichen Penetration der topischen Applikation eine systemische Antimykotikatherapie indiziert. In diesem Fall kommen Substanzen wie Terbinafin und Itraconazol zum Einsatz. Auch hier variiert – je nach Therapieerfolg – das Therapieintervall von zwei Wochen mit Terbinafin bis vier und mehr Wochen bei Itraconazol.

1.2.3 Onychomykose

Die Therapie der Onychomykose ist aufgrund der schwer zugänglichen Hohlräume unter den Nagelplatten oft schwierig und langwierig. Häufig ist die vorherige Behandlung und Freilegung des infizierten Nagels mittels Harnstoffsalbe (chemische Ablösung) oder Fräsen (mechanische Lösung) nötig, bevor mit der antimykotischen Therapie begonnen werden kann. Die topische Therapie erfolgt mit Ciclopiroxamin oder Amorolfen in Form von speziellen Nagellacken. Bei starkem Befall des Nagels (mehr als 50 % der Nagelplatte) wird die zusätzliche systemische Therapie empfohlen. Diese richtet sich nach dem Erreger und kann mit Griseofulvin, Fluconazol, Itraconazol oder Terbinafin durchgeführt werden. Die Therapiezyklen, deren Behandlungsintervall zwischen sieben Tagen (Itraconazol) und sechs bis zwölf Monaten (Griseofulvin, Fluconazol) variiert, können bei Ausbleiben des Therapieerfolgs nach dreiwöchiger Pause wiederholt bzw. mit einem anderen Antimykotikum fortgesetzt werden [60].

1.2.4 Tinea corporis

Die Therapie der Tinea corporis richtet sich nicht nur nach Tiefe und Ausmaß der Infektion, sondern vor allem auch nach Art des Erregers. Bei lokal begrenzten Mykosen, häufig ausgelöst durch anthropophile Erreger, ist die topische Therapie mit Bifonazol, Terbinafin oder Ciclopiroxolamin meist ausreichend. Die tiefen und eitrigen Infektionen sollten systemisch behandelt werden. Hier kommt hauptsächlich Terbinafin infrage, da bei anderen Substanzen, wie Fluconazol, Itraconazol und Griseofulvin, Wirksamkeitslücken bestehen. Zudem hat Griseofulvin ein ausgeprägtes Nebenwirkungsspektrum und wird deshalb nur als Reserveantimykotikum eingesetzt [59, 62].

Bei zoophilen Erregern muss kombiniert topisch und systemisch therapiert werden, da die Sporulation – und damit die Ansteckungsgefahr – durch die systemische Wirkung zunächst nicht eingedämmt wird. Für die topische Therapie eignet sich Ciclopiroxolamin, systemisch wird analog zu Infektionen mit anthropophilen Erregern (s.o.) behandelt. Die Therapie muss oftmals über einen Zeitraum von 4–6 Wochen durchgeführt werden. Bei zu frühen Therapieabbrüchen kann es zu Rezidiven kommen [59].

1.2.5 Grenzen und Probleme der antimykotischen Therapie

Seit längerem sind auch Resistenzen von Dermatophyten gegenüber bestimmten Antimykotika bekannt. Diese traten bei Stämmen auf, bei denen vorher eine Wirksamkeit gegenüber dem Antimykotikum beschrieben war. Gründe für diese Resistenzen sind – vergleichbar mit antimikrobiellen Resistenzen – Schutzmechanismen der Pilze gegenüber dem Antimykotikum. Diese Resistenzmechanismen sind für *T. rubrum* besonders gut untersucht. Hier haben sich verschiedene Anpassungsmechanismen bis auf die molekulare Ebene gezeigt. Als Beispiele seien hier eine vermehrte Produktion von Membrantransportern zur Steigerung des Medikamenteneffluxes (z.B. bei Terbinafin, den Azolen und Griseofulvin [13]) und eine Veränderung des Zielzyms (z.B. Squalen-Epoxidase [47]) genannt.

Für *T. mentagrophytes ss. lato* sind Resistenzen bzw. eine erhöhte MHK von *T. interdigitale* gegenüber Itraconazol, Ketoconazol und Griseofulvin beschrieben [18, 38].

1.3 Das ribosomale Operon und der *internal transcribed spacer* bei Eukaryonten

1.3.1 Aufbau

Das ribosomale Operon der Eukaryonten setzt sich aus mehreren Teilen zusammen. Vom 5'-Ende aus betrachtet, ist es wie folgt aufgebaut: *external transcribed spacer* (ETS), 16S-18S-Untereinheit (Small Subunit), *internal transcribed spacer 1* (ITS-1), 5.8S-Untereinheit, ITS-2 und die 26S-28S-Untereinheit (Large Subunit). Dieses Cluster liegt mehrfach wiederholt im Genom eukaryoter Zellen vor. Die einzelnen Cluster sind durch den *non transcribed spacer* (NTS) getrennt. Die Konservierung der einzelnen Abschnitte ist in den drei ribosomalen Genen (18S, 5.8S und 28S) höher als in den transkribierten Spacern (ITS-1 und ITS-2), und dort wiederum höher als in der nicht transkribierten Region (NTS). Die Anzahl der Basenpaare, aus denen insbesondere ITS und NTS Regionen bestehen, variieren erheblich zwischen den verschiedenen Dermatophytengattungen- und spezieis. So variiert die Anzahl der Basenpaare der ITS-1 Region zwischen 169 bp (*M. gallinae*) und 293 bp (*E. floccosum*), der ITS-2 zwischen 174 bp (*T. terrestre*) und 293 bp (*E. floccosum*) [40].

1.3.2 Verwendung in der Diagnostik

Für die molekulare Diagnostik hat es sich bewährt, die Sequenzen des Abschnitts ITS-1, 5.8S, ITS-2 zu betrachten [19]. Hierzu stehen verschiedene Primer zur Verfügung, welche nur bestimmte Teile dieses Abschnitts oder auch den gesamten Abschnitt amplifizieren können. Abb. 1.1 zeigt eine schematische Übersicht über den Aufbau der ITS-Region bei Dermatophyten.

Der Beginn der ITS-1-Region wird durch die Basensequenz 5'-ATCATTA-3' markiert. Die durch PCR-Amplifikation erhaltenen Sequenzen können dann mit Sequenzen von bereits bekannten Stämmen in diversen Datenbanken verglichen und der jeweiligen Referenzsequenz zugeordnet werden. Auch diese

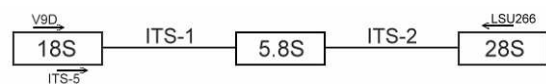


Abbildung 1.1: Schematische Übersicht der ITS-Region einschließlich der von uns verwendeten Primern

Methode hat Nachteile, da einige Dermatophytenspezies, wie *M. canis*, und *M. ferrugineum*, morphologisch zu differenzieren sind, sich in der ITS-Sequenz jedoch sehr wenig unterschei-

den. Hier hat sich gezeigt, dass Polymorphismen in den nicht kodierenden Regionen und Mikrosatelliten weitaus aussagekräftiger sind [22].

1.4 *Trichophyton mentagrophytes sensu lato*

1.4.1 Taxonomie

Die anamorphe Spezies *Trichophyton mentagrophytes* ist eine sehr heterogene Gruppe. Phylogenetische Studien haben gezeigt, dass der Komplex aus den drei teleomorphen Spezies *A. benhamiae*, *A. vanbreuseghemii*, und *A. simii* besteht [23]. Bis vor kurzem existierte eine Vielzahl an morphologisch beschriebenen Varianten von *T. mentagrophytes*. Diese stammen aus einer Zeit, in der die Verwendung molekulargenetischer Methoden zur Differenzierung noch nicht möglich war. Folgende Beispiele seien hier angeführt:

- *T. mentagrophytes* var. *goetzii* [28]
- var. *nodulare* (charakterisiert durch mikroskopisch erkennbare knotenförmige Strukturen und das Fehlen von Makrokonidien) [17]
- var. *quinckeanum* (beschrieben bei Favus von Mäusen, mikroskopisch dickwandige Makrokonidien mit gebogenen Spitzen) [5]
- var. *erinacei* (benannt nach ihrem Vorkommen bei europäischen Igel) [53]
- var. *interdigitale* [49]

Zusätzlich gehören noch einige andere sehr alte Taxa, wie *T. batonrougei*, *T. depressum*, *T. candelabreum*, *T. langeronii*, *T. papillosum* in diesen Komplex. Insgesamt 24 Spezies und Varianten wurden unter Maßgabe ihrer ITS-Sequenzen und anhand von PCR-Fingerprint auf die vier Taxa *T. interdigitale* (*A. vanbreuseghemii*), *T. mentagrophytes* ss. str., *T. simii* (*A. simii*), *T. erinacei* (*A. benhamiae*) und eine weitere Trichophytonspezies (bisher ohne Namen) von *A. benhamiae* reduziert [23]. Die Taxa in den Klammern bezeichnen die jeweiligen teleomorphen Spezies.

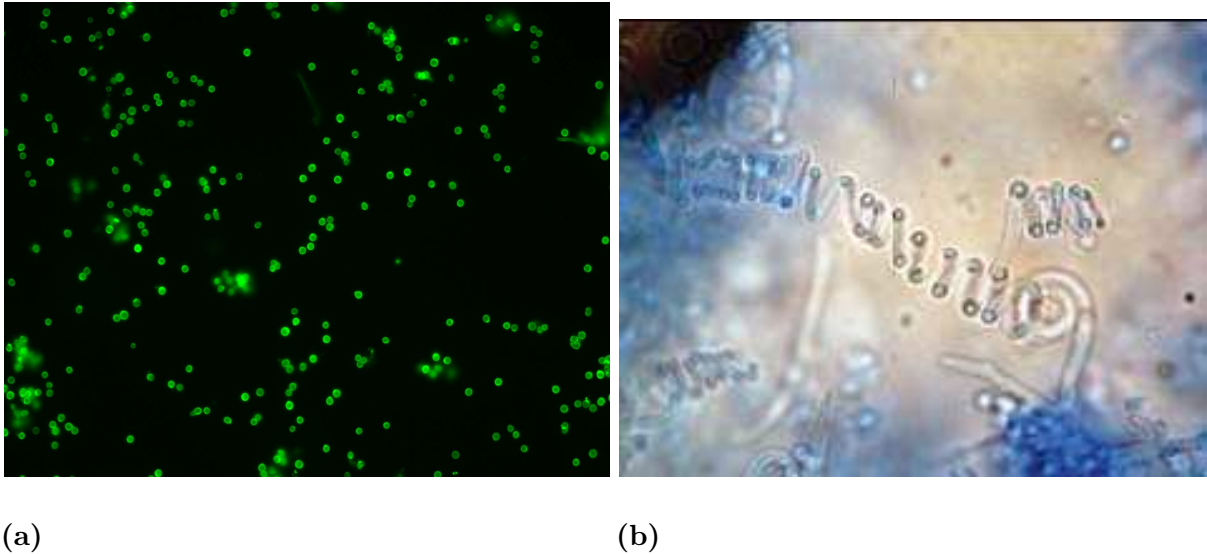


Abbildung 1.2: 1.2a Mikrokonidien bei *T. interdigitale* unter einem Fluoreszenzmikroskop;
 1.2b Typisches Bild einer Spiralhyphe bei *T. interdigitale* [44]

1.4.2 *Trichophyton interdigitale*

Die teleomorphe Spezies von *T. interdigitale* ist *A. vanbreuseghemii*. Die anamorphen Stämme lassen sich in zwei Gruppen einteilen, in anthropophil und zoophil. Die Einteilung erfolgte bisher nach phenotypischen Merkmalen. Beschrieben ist, dass zoophile Isolate typischerweise eine große Menge Mikrokonidien (von runder bis querovaler Form) und Spiralhypen ausbilden (siehe Abb. 1.2a und 1.2b). Diese Spiralhypen waren einst das klassische Erkennungsmerkmal von *T. mentagrophytes*, sie sind jedoch sowohl bei den anamorphen Stämmen von *A. benhamiae* als auch den zoophilen und anthropophilen *T. interdigitale*-Isolaten zu finden [24].

Die anthropophilen Isolate zeigen hingegen häufig samtiges bis wattiges Oberflächenwachstum. In den Kulturen mit wattiger Oberfläche wird oftmals eine verminderte Produktion von Mikrokonidien und das Fehlen von Spiralhypen beobachtet. Auch die zoophilen Isolate können diese Morphologie zeigen, dies tritt besonders häufig nach mehrmaliger Subkultivierung auf (Pleomorphie) [44].

Derzeit sind drei Genotypen beschrieben. Diese wurden von Ninet et. al [45] durch Analyse von Sequenzen der 28S rDNA ermittelt und ferner als *T. mentagrophytes* Typ I bis IV bezeichnet.

1.4.3 *Trichophyton mentagrophytes sensu stricto* und *Trichophyton simii*

T. mentagrophytes ss. str. und *T. simii* gehören zu den selteneren Entitäten in Westeuropa. Morphologisch ähneln sowohl *T. mentagrophytes ss. str.* als auch *T. simii* den zoophilen Isolaten von *A. vanbreuseghemii* oder *A. benhamiae*, wobei für *T. simii* eine üppige Produktion von Makrokonidien beschrieben ist, die auch in den Subkulturen erhalten bleibt. *T. simii* findet sich eher auf dem indischen Subkontinent bei Affen, jedoch wird aufgrund der Art und Weise seiner Arthrokonodien- und Makrokonidienformation und den Ergebnissen von Kreuzungsversuchen die Assoziation zu Tieren die am Boden bzw. unter der Erde leben vermutet [24, 54].

T. mentagrophytes ss. str. kann derzeit nur auf molekularer Ebene korrekt identifiziert werden.

1.4.4 *Arthroderma benhamiae*

Der *A. benhamiae*-Komplex beinhaltet nach aktuellen Erkenntnissen die zoophilen Spezies *T. erinacei*, dessen Hauptwirt Igel sind, das *Trichophyton* Anamorph von *A. benhamiae* (eine spezifischere Bezeichnung existiert derzeit nicht), *T. verrucosum* und als einzige anthropophile Spezies *T. concentricum*. Morphologisch ist für *T. erinacei* eine gelbe Verfärbung des Agars und ein negativer Urease-Test beschrieben, wobei die mit afrikanischen Igel (*Atelerix albiventris*) assoziierten Stämme kaum von zoophilen *T. interdigitale*-Isolaten zu unterscheiden sind. Ebenso verhält es sich mit dem *Trichophyton* Anamorph von *A. benhamiae*. *T. verrucosum* („Kälberflechte“) und *T. concentricum* (*Tinea imbricata*) werden aufgrund ihrer Wirte bzw. klinischer Manifestation der Infektion differenziert.

Bei der *Tinea imbricata* handelt es sich um eine chronische Dermatomykose, die vorrangig die unbehaarte Haut befällt. Die Hautläsionen zeigen erythematöse, schuppige, konzentrische und überlappende Plaques. Sie kommt v. a. in Polynesien, Zentral- und Südamerika vor [6].

1.5 Ziel der Arbeit

Die Diagnostik verschiedener Dermatophyten, insbesondere der Gruppe *T. mentagrophytes ss. lato* ist auf morphologischer Basis problematisch. Molekulargenetische Methoden sind in der Lage, die Spezies dieses Komplexes mit Hilfe der ITS zu differenzieren, allerdings wäre

auch eine Identifizierung der zoophilen und anthropophilen Stämme von *T. interdigitale* aus therapeutischen Gründen wünschenswert. Aus diesem Grund soll in dieser Arbeit eine große Anzahl von Isolaten dieser Gruppe untersucht werden. Mithilfe verschiedener konventioneller und molekulargenetischer Methoden, wie PCR, RFLP und Sequenzanalyse, sollen Marker zur exakteren Differenzierung, vor allem von *T. interdigitale*, gefunden werden, um die zukünftige Diagnostik dieser Dermatophytenspezies einfacher und zuverlässiger zu gestalten. Molekulargenetische und konventionelle Identifizierung sollen miteinander verglichen werden, um weiterhin herauszufinden, ob es stabile morphologische Merkmale gibt, die sich insbesondere für die Differenzierung der zoophilen und anthropophilen Stämme von *T. interdigitale*, aber auch für die Unterscheidung zwischen den zoophilen Stämmen von *T. interdigitale* und dem *Trichophyton* Anamorph von *A. benhamiae* eignen.

Diese Differenzierung ist nicht nur von akademischem Interesse, sondern ferner ist die Einleitung der adäquaten Therapie einer Infektion mit Dermatophyten oftmals erst nach genauerer Differenzierung des Stammes möglich. So benötigt eine Infektion mit zoophilen Erregern meist eine Kombination aus topischer und systemischer antimykotischer Therapie und ein längeres Therapieintervall, während bei anthropophilen Erregern die topische Therapie meist ausreichend ist.

2 Materialien und Methoden

2.1 Nährböden

Als Nährböden wurden ausschließlich Platten mit Sabouraud-Dextrose-Agar (4 % Glucose, pH 5,6; Oxoid, UK) ohne Zusatz von Cycloheximid und Chloramphenicol verwendet, um ein möglichst ungehemmtes Wachstum zu ermöglichen.

2.2 Material

Insgesamt wurden 130 klinische Proben untersucht. Die Identifizierung erfolgte zunächst konventionell durch die Labore aus denen die Proben stammten. Die Herkunft der Proben ist in Tab. 3.3 dargestellt. Zusätzlich wurden 40 Stämme des CBS untersucht, von denen 27 als Referenzstämme dienten.

Als Referenzstämme dienten nur diejenigen Stämme, die zuvor bereits einer Sequenzanalyse unterzogen worden waren.

Das DNA-Material der Referenzstämme stammte aus bereits extrahierten Proben, die in unserem Labor vorhanden waren [19, 20, 23, 52].

2.3 Morphologische Identifizierung

Alle Proben wurden nach ein- bis dreiwöchigem Wachstum auf Sabouraud-Glucose-Agar nochmals nach konventionellen Kriterien identifiziert. Hierbei wurden Koloniewachstum und Pigmentierung als makroskopische Merkmale untersucht.

Zur Herstellung der mikroskopischen Präparate wurde die „double-layer tape prep“-Methode angewandt [30]. Durch diese Modifizierung der Standardmethode können längerlebige mikroskopische Präparate hergestellt werden. Hierzu wurde mit einem durchsichtigen Klebestreifen

Myzel von der Oberfläche der Kulturen abgetragen, auf einen Objektträger mit Lactophenolblau gegeben und mit einem Deckglas abgedeckt. Die Präparate wurden zunächst unter der Lupeneinstellung des Mikroskops betrachtet und dann mit 400-facher Vergrößerung genauer beurteilt.

Die Isolate wurden aufgrund der gängigen Kriterien zur morphologischen Identifizierung von Dermatophyten als Spezies des *T. mentagrophytes*-Komplex identifiziert. Dazu gehören pudrige oder wattige Textur der Kultur und/oder die Ausbildung runder bis keulenförmiger Mikrokonidien sowie die Formation von Spirallyphen.

2.4 Extraktion und Aufbereitung der DNA

2.4.1 DNA-Extraktion

Die Extraktion genomischer DNA erfolgte nach der CTAB-Methode [23]. Dazu wurde Pilzmaterial mit einem Durchmesser von 0,5-1 *cm* mithilfe eines Skalpell aus der Kultur herausgeschnitten und in einen tiefgefrorenen Mörser gegeben. Unter mehrmaliger Zugabe von flüssigem Stickstoff wurde die Kultur pulverisiert, in ein 2-*ml* Eppendorf-Gefäß überführt und in 600 μ l Lysis-Puffer (100 *mM* Tris-HCl; 1,4 *M* NaCl; 20 *mM* EDTA; 2 % CTAB; 2 % β -Mercaptoethanol) resuspendiert. Nach dreimaligem Einfrieren mit flüssigem Stickstoff und Tauen im 65 °C Wasserbad wurden 50 μ g Proteinase K hinzugefügt, um eventuell noch vorhandene Proteine aus dem Ansatz zu entfernen und die Freisetzung der Nukleinsäuren zu fördern. Es folgte ein Inkubationsintervall von einer Stunde bei 65 °C.

Im Anschluss wurden die Ansätze fünf Minuten bei 15700 \times *g* zentrifugiert, und dem Überstand wurde 1 Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) zugefügt. Die Ansätze wurden dann kurz mit einem Vortexer (Scientific Industries, New York, USA) auf niedriger Stufe gemischt und anschließend erneut für 15 Minuten bei 15700 \times *g* zentrifugiert. Die obere Phase wurde abpipettiert und in ein frisches Eppendorf-Gefäß überführt. Die untere Phase wurde verworfen. Dieser Schritt wurde nun drei- bis viermal wiederholt, bis keine Interphase mehr erkennbar war. Im letzten Durchgang wurde anstatt der Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Mischung 1 Volumen Chloroform hinzugefügt. Die Ausfällung der DNA erfolgte mit 1/10 Volumen 3 *M* Natriumacetat, pH 5,2 und 1 Volumen eiskaltem Isopropanol. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4 °C.

Die präzipitierte DNA wurde für 10 Minuten bei 15700 \times *g* zentrifugiert, das DNA-Pellet

wurde mit 70 % Ethanol gewaschen und mittels Evaporation in einer SpeedVac (Eppendorf, Deutschland) getrocknet. Es folgte die Resuspension des DNA-Pellets in 100 μl TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) und Inkubation mit 100 μg RNase bei 37 °C für eine Stunde.

2.4.2 Konzentrationsbestimmung

Die Konzentrationsbestimmung der Stammlösung erfolgte durch Extinktionsmessung in einem Photometer. Aufgrund der hohen DNA-Konzentrationen in den Stammlösungen mussten zur photometrischen Extinktionsmessung 100 μl einer 1:50 Verdünnung von jeder Probe angefertigt werden. Es wurden die Extinktionswerte bei 260 nm , als Absorptionsmaximum der DNA, und bei 280 nm , als Absorptionsmaximum der RNA, gemessen und mit folgender Formel die DNA-Konzentration bestimmt: $c_{DNA}[\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}] = E_{260} \times 50[\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}]$

Des Weiteren wurde die Reinheit der Proben $\frac{E_{260}}{E_{280}}$ bestimmt. Das Optimum sollte hier bei 1,7–1,9 liegen. Für die weitere Verarbeitung wurden Verdünnungen mit einer DNA-Konzentration von 10 $\frac{ng}{\mu\text{l}}$ hergestellt. Die Aufbewahrung der Stammlösungen erfolgte bei -20 °C, der Verdünnungen bei 4 °C.

2.5 Polymerase Chain Reaction der *internal transcribed spacer*-Region

2.5.1 Verwendete Primer

Die PCR der ITS-Region wurde mit dem Primerpaar V9D (5'-TTA CGT CCC TGC CCT TTG TA-3') und LSU266 (5'-GCA TTC CCA AAC AAC TCG ACT C-3') durchgeführt [29]. Mit diesen Primern wird ein DNA-Fragment von ca. 1000 bp Länge amplifiziert. Dieses Fragment enthält die Regionen ITS-1, 5.8S rDNA, ITS-2 und Teile der 18S und 28S rDNA.

2.5.2 Vorbereitung der PCR

Die PCR erfolgte in 0,5 ml Eppendorf-Gefäßen. Das Volumen des PCR-Ansatzes betrug 50 μl pro Probe und wurde nach folgendem Ansatz durchgeführt.

28,6 μ l	Aqua dest.
5 μ l	10 \times PCR-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 8,0; 50 mM KCl; 1,5 mM MgCl ₂ ; Applied Biosciences, USA)
4 μ l	Desoxyribonucleotide (200 mM Adenosin, 200 mM Guanin, 200 mM Cytosin, 200 mM Thymin; GE Healthcare, USA)
1 μ l	V9D (50 pmol; TIB MOLBIOL, Berlin)
1 μ l	LSU266 (50 pmol; TIB MOLBIOL, Berlin)
5 μ l	Dimethylsulfoxid (Serva, Heidelberg)
0,4 μ l	Taq-Polymerase (2U; Applied Biosciences, USA)
5 μ l	Proben-DNA (50 $\frac{ng}{\mu l}$)

Als Verdunstungsschutz wurde der PCR-Ansatz mit einem Tropfen Mineralöl überschichtet.

2.5.3 PCR-Cycling

Die PCR wurde in einem automatischen PCR-Cycler (Beckman-Fullerton, USA) nach folgendem Protokoll durchgeführt:

Schritt 1	95 °C	5 Minuten	Initiale Denaturierung der DNA
Schritt 2 (30 Zyklen)	95 °C	1 Minute	Denaturierung der DNA
	55 °C	1 Minute	Primerhybridisierung
	72 °C	1 Minute	Elongation
Schritt 3	72 °C	5 Minuten	Abschließende Elongation
Schritt 4	4 °C		Aufbewahrung

2.5.4 Elektrophorese

Als Erfolgskontrolle der PCR wurde eine Gelelektrophorese vorgenommen. Hierzu wurden 5 μ l DNA mit 3 μ l Aqua dest. und 3 μ l Ladepuffer (Bromphenolblau, Glycerin, EDTA, Tris-HCl) auf ein 1,4 % Agarosegel (1,4 mg Agarose, 100 ml 1 \times TBE) gegeben und dort für eine Stunde bei 7,5 $\frac{V}{cm}$ in der Elektrophorese-Kammer (0,5 \times TBE) aufgetrennt. Anschließend wurde das Agarose-Gel für 15 Minuten in Ethidiumbromidlösung (0,5 $\frac{mg}{l}$) gefärbt und unter UV-Licht betrachtet und fotografiert. Zur Kontrolle der Größe des Fragments wurde Gene Ruler™ DNA ladder mix (Fermentas) verwendet.

2.6 Restriction Fragment Length Polymorphism

2.6.1 Aufbereitung des PCR-Produkts

Da verschiedene Bestandteile des PCR-Ansatzes nachfolgende Enzymreaktionen inhibieren bzw. zu *star activity*, einer unerwünschten unspezifischen Enzymreaktion bei nicht optimalen Bedingungen, führen können, wurde die DNA der PCR-Produkte ausgefällt und aufgereinigt. Hierzu wurden 20 μl PCR-Produkt in einem neuen 0,5-*ml*-Eppendorf-Gefäß mit 2 μl 3 M Natriumacetat und 50 μl 96 % Ethanol vermischt und über Nacht bei 4 °C inkubiert.

Es folgte eine 15-minütige Zentrifugation bei $15700 \times g$. Hiernach wurde das DNA-Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen und erneut für 15 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und eventuelle Ethanolreste mittels Evaporation in einer SpeedVac (Eppendorf, Deutschland) entfernt. Das DNA-Pellet wurde zur weiteren Verwendung in 18 μl Aqua dest. resuspendiert.

2.6.2 Restriktion mit *Mva1*

Die RFLP wurde nach einem bereits beschriebenen Protokoll [31] in modifizierter Weise durchgeführt. Für die RFLP wurde die Restriktionsendonuklease *Mva1* (Fermentas) verwendet. Diese ist eine synthetische hergestellte Variante der RII des *Escherichia coli*-Bakteriums. *Mva1* erkennt folgende DNA-Muster:

5'-CC↓AGG-3'

5'-CC↓TGG-3'

5'-GGT↓CC-3'

5'-GGA↓CC-3'

Das aufbereitete PCR-Produkt wurde mit 2 μl Puffer R+ (Fermentas) und 1 μl *Mva1* vermischt und 4 Stunden bei 37 °C im Wasserbad inkubiert.

2.6.3 Elektrophorese

Für die elektrophoretische Auftrennung wurden 5 μl des Reaktionsansatzes mit 3 μl Aqua dest. und 3 μl Ladepuffer (s.o.) auf ein 2 % Metaphor-Agarosegel (2 *mg* Metaphor-Agarose (Cambrex, USA); 100 *ml* 1× TBE) gegeben und 2,5 Stunden bei $5,8 \frac{\text{V}}{\text{cm}}$ aufgetrennt. Das

Gel wurde anschließend für 15 Minuten in Ethidiumbromidlösung (s.o.) gefärbt und unter UV-Licht sichtbar gemacht und dokumentiert.

Zur Abschätzung der einzelnen Fragmentgrößen wurde Gene Ruler™ DNA ladder mix (Fermentas) verwendet.

2.7 Sequenzierung

Zur Sequenzierung wurde ITS-PCR-Produkt (Amplifikation mit V9D und LSU266) verwendet. Dieses wurde mit QiaGen QuickSpin Kit (QiaGen, Deutschland) aufgereinigt. Die Sequenzierung der DNA wurde von Dr. Martin Meixner (DLMBC, Berlin) durchgeführt und erfolgte unter Verwendung des internen Primers ITS-5 (5'-GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G-3').

Zur Identifizierung der Sequenzen wurde eine Homologiesuche mit einem Basic Local Alignment Search Tool vorgenommen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> und <https://apps.idns-smartgene.com/apps/IDNSPortal.po>). In der SmartGene Datenbank wurden alle Sequenzen mittels ihrer Chromatogramme mit dem wahrscheinlichsten Referenzstamm manuell gegengelesen um eventuelle Sequenzierungsfehler aufzudecken.

Alle Sequenzen wurden sowohl in der SmartGene IDNS Datenbank (Schweiz) als auch bei GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) hinterlegt.

2.8 Multiple Alignment und Phylogenie

2.8.1 Alignments

Sequenzalignments wurden mit Hilfe eines Multiple Alignment mit ClustalW [58] unter Verwendung der Software BioEdit Version 7.0.9.0 [27] angefertigt.

2.8.2 Bootstrapping und phylogenetische Konstruktion

Zur Erstellung der phylogenetischen Bäume und für das Bootstrapping (1000 Stichproben) diente die Software MEGA [57]. Die phylogenetischen Analysen wurden sowohl mit dem Neighbor-Joining-Algorithmus und Kimura-2-Parameter als Substitutionsmodell, als auch mit dem Maximum Parsimony-Algorithmus durchgeführt.

2.9 Bildmaterial

Bilder der Dermatophytenkulturen wurden mit einer Digitalkamera aufgenommen (Lumix FC-12, Panasonic). Die Aufnahme der Gelbilder erfolgte mit der Software GeneSnap (SynGene, Cambridge, UK) mit der auch die Umwandlung der Rohdaten in das TIFF-Format möglich war. Die weitere Bildbearbeitung erfolgte mit PhotoImpact X3 (Ulead, Corel, Kanada). Bilder, die nicht selbst angefertigt wurden sind als solche mit der jeweiligen Quelle gekennzeichnet.

3 Ergebnisse

3.1 Restriction Fragment Length Polymorphism

3.1.1 Schnittmuster

Die Auswertung der RFLP-Analyse zeigte fünf verschiedene Schnittmuster für *T. mentagrophytes* ss. lato: 1.) Trichophyton Anamorph von *A. benhamiae*, 2.) *T. interdigitale*/*A. vanbreuseghemii* (2 Schnittmuster), 3.) *T. mentagrophytes* ss. str., 4.) *T. simii* (Tabelle 3.1, Abbildung 3.1). *T. erinacei* konnte durch diese Methode nicht vom Trichophyton Anamorph von *A. benhamiae* unterschieden werden. Zusätzlich zu den bereits genannten Spezies wurden einige nah verwandte Spezies von *T. mentagrophytes* ebenfalls in die Analyse mit einbezogen um eine Richtgröße für die Spezifität der RFLP-Analyse zu haben. Zu den nah verwandten Stämmen gehören *T. rubrum*, *T. schoenleinii*, *T. tonsurans* und *T. equinum*.

Tabelle 3.1: Schematische Darstellung der RFLP-Fragmentgrößen

Spezies	Geschätzte Fragmentgröße in bp									
<i>T. interdigitale</i> Typ I-III/III*	-	-	-	320	260	-	220	-	-	130
<i>T. interdigitale</i> Typ IV	490	-	-	320	-	-	-	-	160	130
<i>T. mentagrophytes</i> ss. str.	490	-	330	-	-	-	-	180	160	130
<i>T. schoenleinii</i>	490	-	330	-	-	-	-	180	160	130
<i>A. benhamiae</i>	-	390	-	-	-	-	220	-	-	-
<i>T. erinacei</i>	-	390	-	-	-	-	220	-	-	-
<i>T. simii</i>	-	390	-	320	-	230	-	-	160	-
<i>T. rubrum</i>	-	390	-	320	-	230	-	-	-	-
<i>T. tonsurans</i> / <i>T. equinum</i>	-	-	-	320	260	-	-	-	160	130

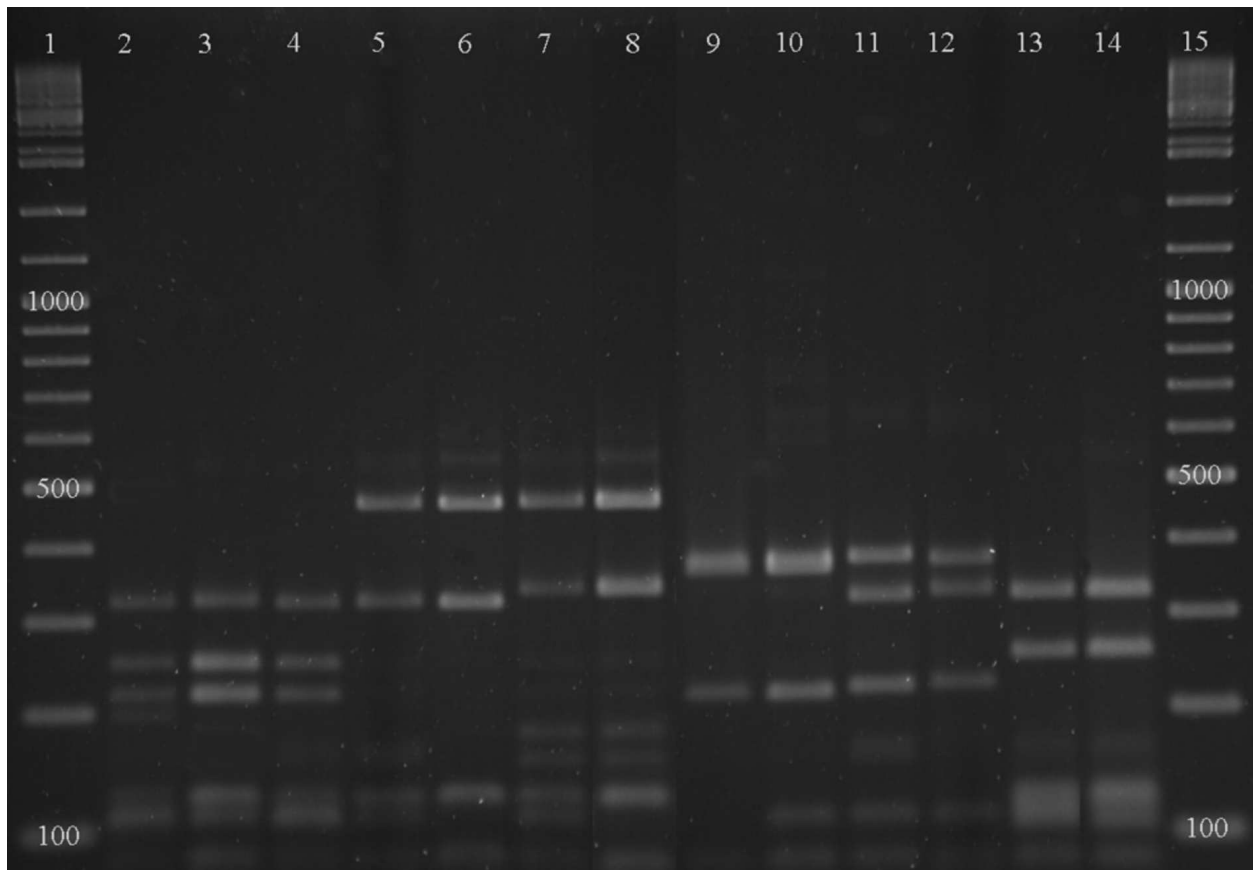


Abbildung 3.1: RFLP-Fragmente von ITS-PCR-Produkten in 2 % MetaPhor Agarose Gel
Bahn 1/15 Gene Ruler™ DNA ladder, **Bahn 2** *T. interdigitale* Typ I (3127), **Bahn 3** *T. interdigitale* Typ II (2778), **Bahn 4** *T. interdigitale* Typ III (V220), **Bahn 5** *T. interdigitale* Typ IV (CBS 357.62), **Bahn 6** *T. interdigitale* Typ IV (CBS 646.73), **Bahn 7** *T. mentagrophytes* *ss. str.* (CBS 158.66), **Bahn 8** *T. schoenleinii* (CBS 855.71), **Bahn 9** *A. benhamiae* (CBS 806.72), **Bahn 10** *T. erinacei* (CBS 474.76), **Bahn 11** *T. simii* (CBS 417.65), **Bahn 12** *T. rubrum* (CBS 100.81), **Bahn 13** *T. tonsurans* (CBS 333.32), **Bahn 14** *T. equinum* (CBS 635.82)

3.1.2 Klassifizierung

Als Referenzen für die RFLP-Analyse dienten Proben des Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, Niederlande. Diese und die für die phylogenetische Analyse verwendeten Referenzstämme sind in Tabelle 3.2 dargestellt.

Tabelle 3.2: Übersicht der Referenzstämme

Isolat Nr.	Accession #	Identifizierung	Herkunft	RFLP	Sequenz
	AF506033	<i>T. interdigitale</i> P	ND		I
	AF506036	<i>T. interdigitale</i> P	ND		II
	AF506034	<i>T. interdigitale</i> P	ND		III
IFM 51386	AB246678	<i>T. interdigitale</i> P	ND		IV
CBS 392.68	Z97998	<i>T. interdigitale</i> R ^{††}	interdigital	TI	II
CBS 429.63	Z97999	<i>T. interdigitale</i> R	Mensch, Haut	TI	II
CBS 558.66	Z98001	<i>T. interdigitale</i> R	Fuß	TI	II
CBS 646.73	Z98014	<i>T. interdigitale</i> R	ND	TI*	IV
CBS 357.62	FM986778	<i>T. interdigitale</i> R	Maus	TI*	IV
CBS 428.63		<i>T. interdigitale</i>	Schuppen Fußsohle	TI	
CBS 165.66		<i>T. interdigitale</i>	Pustel	TI	
CBS 845.73		<i>T. interdigitale</i>	Mensch, Haut	TI	
CBS 102.68		<i>T. mentagrophytes</i>	Mensch, Eiter	TI	
CBS 263.79		<i>T. mentagrophytes</i>	Meerschwein	TI	
CBS 435.73		<i>T. mentagrophytes</i>	Kaninchen	TI	
CBS 805.71		<i>T. mentagrophytes</i>	ND	TI	
KMU 4810	AB430473	<i>T. simii</i> P	ND		TS
CBS 150.66	AB430475	<i>T. simii</i> P	ND		TS
CBS 417.65	Z98017	<i>T. simii</i> R	Huhn	TS	TS
UAMH 2943	AF170454	<i>T. simii</i> P	Huhn		TS
CBS 318.56	AY185126	<i>T. mentagrophytes</i> R	Mensch, Trichophytose	TM	TM
CBS 106.67	Z98000	<i>T. mentagrophytes</i> R	Mensch, Hand	TM	TM
CBS 388.58	FM986779	<i>T. mentagrophytes</i> R	Hund	TM	TM
CBS 158.66		<i>T. mentagrophytes</i>	Mensch, Unterarm	TM	TM
CBS 572.75		<i>T. mentagrophytes</i>	Mensch, Bein	TM	TM
CBS 855.71	Z98011	<i>T. schoenleinii</i> R	Mensch, Haar	TSC	TSC
KMU 4136	AB048192	<i>A. benhamiae</i> P	ND		AB
KMU 4137	AB048193	<i>A. benhamiae</i> P	Kaninchen		AB
CBS 280.83	Z98016	<i>A. benhamiae</i> P	Mensch, Hand		AB
IFM 54425	AB458217	<i>A. benhamiae</i> P	ND		AB
KMU 5-46	AB088676	<i>A. benhamiae</i> Amer.-europäischer Typ P	ND		AB
	AF170457	<i>A. benhamiae</i> Amer.-europäischer Typ P	ND		AB
RV 30001	AB236409	<i>A. benhamiae</i> Afrikanischer Typ P	Ascospore		AB
RV 30000	AF170456	<i>A. benhamiae</i> Afrikanischer Typ P	Ascospore		AB
CBS 807.72	AB458213	<i>A. benhamiae</i> R	Mensch	AB	AB

Fortsetzung nächste Seite

^{||}P – Referenzstamm für phylogenetische Analyse

^{††}R – Referenzstamm für RFLP

Fortsetzung Tabelle 3.2

Isolat Nr.	Accession #	Identifizierung	Herkunft	RFLP	Sequenz
CBS 623.66	Z98015	<i>A. benhamiae</i> R	Mensch	AB	AB
CBS 806.72		<i>A. benhamiae</i>	Meerschwein	AB	AB
CBS 809.72		<i>A. benhamiae</i>	Hund	AB	AB
CBS 934.73		<i>A. benhamiae</i>	ND	AB	AB
IFM 51499	AB105782	<i>T. erinacei</i> P	<i>Atelerix albiventris</i>		TE
IFM 50998	AB078898	<i>T. erinacei</i> P	<i>Atelerix albiventris</i>		TE
IFM 51500	AB105793	<i>T. erinacei</i> P	<i>Atelerix albiventris</i>		TE
IFM 51419	AB105788	<i>T. erinacei</i> P	<i>Atelerix albiventris</i>		TE
IFM 51420	AB105789	<i>T. erinacei</i> P	<i>Atelerix albiventris</i>		TE
CBS 474.76	AB105794	<i>T. erinacei</i> R	Mensch, Arm	AB	TE
CBS 511.73	AB105793	<i>T. erinacei</i> R	<i>Erinaceus europaeus</i>	AB	TE
CBS 474.76	AB105794	<i>T. erinacei</i> R	Mensch, Arm	AB	TE
CBS 344.79	Z97996	<i>T. erinacei</i> R	Mensch, Arm	AB	TE
CBS 677.86	Z97997	<i>T. erinacei</i> R	Nagel	AB	TE
IHEM 22406	EU083908	<i>T. concentricum</i> P	Mensch, Haut		TC
IHEM 22408	EU083910	<i>T. concentricum</i> P	Mensch, Haut		TC
CBS 196.26	Z98012	<i>T. concentricum</i> P	ND		TC
CBS 554.84	Z98002	<i>T. verrucosum</i> P	Mensch, Haut		TV
CBS 134.66	Z98003	<i>T. verrucosum</i> P	Mensch, Haar		TV
CBS 564.50	Z98004	<i>T. verrucosum</i> P	Mensch		TV
CBS 220.25	FM992674	<i>T. eriotrephon</i> P	Mensch		TET
CBS 363.35	FM992675	<i>T. bullosum</i> P	ND		TB
CBS 557.50	FM992676	<i>T. bullosum</i> P	ND		TB
CBS 635.82	EF043274	<i>T. equinum</i> R	Pferd	TT	TEQ
CBS 333.32	FM986777	<i>T. mentagrophytes</i>	Mensch, Kopfhaut	TT	TT

Insgesamt konnte mithilfe der RFLP-Analyse folgende grobe Klassifizierung der 130 klinischen Proben erhoben werden: Trichophyton Anamorph von *A. benhamiae* (12), *T. simii* (3), *T. mentagrophytes* ss. *str.*(1) und *T. interdigitale* (86, alle Sequenztypen) als zugehörig zu *T. mentagrophytes* ss. *lato*, des Weiteren *T. rubrum*(11) und *T. tonsurans*(2). Einige der untersuchten Stämme zeigten RFLP-Muster, die keinem Referenzstamm zugeordnet werden konnten. Die anschließende Sequenzierung konnte diese Isolate als *Fusarium* spp. (11), *Auxarthron* spp. (2), *Penicillium chrysogenum* (1) und *Debaryomyces* sp. (1) identifizieren. In Tabelle 3.3 sind detaillierte Informationen zu Herkunft und Klinik der untersuchten Proben dargestellt.

Tabelle 3.3: Übersicht der untersuchten klinischen Isolate

Isolat Nr.	Identifizierung	Herkunft	RFLP	Seq.	Accession #
SJEN6349*	<i>A. benhamiae</i>	Mensch Arm	AB	AB	FM986683
V129†	<i>A. benhamiae</i>	Meerschwein	AB	AB	FM986684
V199†	unbekannt	Meerschwein	AB	AB	FM986685
V25†	<i>A. benhamiae</i>	Meerschwein (Nagel)	AB	AB	FM986686
01UD338‡	<i>T. mentagrophytes</i>	Hund	AB	AB	FM986676
02UD358‡	<i>T. mentagrophytes</i>	Hund	AB	AB	FM986677
02UD51‡	<i>T. mentagrophytes</i>	Meerschwein	AB	AB	FM986678
03UD298‡	<i>T. mentagrophytes</i>	Katze	AB	AB	FM986679
03UD37‡	<i>T. mentagrophytes</i>	Meerschwein	AB	AB	FM986680
04UVF14‡	<i>T. mentagrophytes</i>	Meerschwein	AB	AB	FM986681
04UWF85‡	<i>T. mentagrophytes</i>	Kaninchen	AB	AB	FM986682
1253†	<i>A. benhamiae</i>	Schuppen Arm	AB	AB	FM986675
896†	<i>M. ferrugineum</i>	Nagel	TI	I	FM986698
1538†	<i>T. mentagrophytes</i>	Schuppen Fuß	TI	I	FM986688
2162 (3)†	<i>T. mentagrophytes</i>	unbekannt	TI	I	FM986696
2235†	<i>T. mentagrophytes</i>	Schuppen Fußsohle	TI	I	FM986689
2585†	<i>T. mentagrophytes</i>	Blase Fußrücken	TI	I	FM986690
2620†	<i>T. mentagrophytes</i>	Nagel	TI	I	FM986691
2664†	<i>T. mentagrophytes</i>	Nagel	TI	I	FM986692
3127†	<i>T. mentagrophytes</i>	Nagel	TI	I	FM986693
3287†	<i>T. mentagrophytes</i>	Nagel	TI	I	FM986694
3298†	<i>T. mentagrophytes</i>	Nagel	TI	I	FM986695
DH16786§	<i>T. mentagrophytes</i>	Zehnnagel	TI	II	FM986732
DH16787§	<i>T. mentagrophytes</i>	Nagel	TI	II	FM986733
DH16789§	<i>T. mentagrophytes</i>	Nagel	TI	II	FM986734
DH16791§	<i>T. mentagrophytes</i>	Nagel	TI	II	FM986735
SJEK4354*	<i>T. mentagrophytes</i>	Mensch Kinn	TI	II	FM986736
276†	<i>T. mentagrophytes</i>	Nagel	TI	II	FM986697
835 (2)†	<i>T. mentagrophytes</i>	Nagel	TI	II	FM986730
988 (1)†	unbekannt	unbekannt	TI	II	FM986731
1128†	<i>T. mentagrophytes</i>	Nagel	TI	II	FM986699
1266†	<i>T. mentagrophytes</i>	Nagel	TI	II	FM986700
1388†	<i>T. mentagrophytes</i>	Schuppen Fußsohle	TI	II	FM986701
1400†	<i>T. mentagrophytes</i>	Nagel	TI	II	FM986702
1402†	<i>T. mentagrophytes</i>	Nagel	TI	II	FM986703
1470†	<i>T. mentagrophytes</i>	Nagel	TI	II	FM986704
1496 (2)†	<i>T. mentagrophytes</i>	Schuppen interdigital Fuß	TI	II	FM986725
1506†	<i>T. mentagrophytes</i>	Nagel	TI	II	FM986705
1528†	<i>T. mentagrophytes</i>	Nagel	TI	II	FM986706
1536†	<i>T. mentagrophytes</i>	Schuppen Fuß	TI	II	FM986707
1544†	<i>T. mentagrophytes</i>	Schuppen Fußsohle	TI	II	FM986708
1583 (2)†	<i>T. mentagrophytes</i>	Schuppen Inguinalfalte	TI	II	FM986726
1582†	<i>T. mentagrophytes</i>	Schuppen interdigital Fuß	TI	II	FM986709
1620†	<i>T. mentagrophytes</i>	Schuppen Fußsohle	TI	II	FM986710
1684†	<i>T. mentagrophytes</i>	Nagel	TI	II	FM986711
1695†	<i>T. mentagrophytes</i>	Schuppen Fußsohle	TI	II	FM986712
1959†	<i>T. mentagrophytes</i>	T. unguium	TI	II	FM986713

Fortsetzung nächste Seite

*Mary Moore, Department of Medical Mycology, Kings College London, UK

†Dr. Michel Monod, Faculté de biologie et médecine d'Université de Lausanne, Schweiz

‡Fachtierarzt Peter Kutzer, Landeslabor Brandenburg, Fachbereich T2, Frankfurt (Oder), Deutschland

§Dr. Shu Wen Deng, Department of Dermatology, First Hospital and Xinjiang Medical University, Urumqi, PR China

Fortsetzung Tabelle 3.3

Isolat Nr.	Identifizierung	Herkunft	RFLP	Seq.	Accession #
1964†	<i>T. mentagrophytes</i>	T. pedis	TI	II	FM986714
1988†	<i>T. mentagrophytes</i>	T. corporis	TI	II	FM986715
2075†	<i>T. mentagrophytes</i>	T. pedis	TI	II	FM986716
2095†	<i>T. mentagrophytes</i>	T. unguium	TI	II	FM986717
2129†	<i>T. mentagrophytes</i>	T. unguium	TI	II	FM986718
2134†	<i>T. mentagrophytes</i>	T. unguium	TI	II	FM986719
2312†	<i>T. mentagrophytes</i>	Blase Fuß	TI	II	FM986720
2316†	<i>T. mentagrophytes</i>	Nagel	TI	II	FM986721
2353 (1)†	<i>T. mentagrophytes</i>	Nagel	TI	II	FM986727
2701 (2)†	<i>T. mentagrophytes</i> + Bakterien	Schuppen Fuß	TI	II	FM986728
2762†	<i>T. mentagrophytes</i>	Schuppen interdigital Fuß	TI	II	FM986722
2778†	<i>T. mentagrophytes</i>	Nagel	TI	II	FM986723
3242†	<i>T. mentagrophytes</i>	Nagel	TI	II	FM986724
3251 (2)†	<i>T. mentagrophytes</i>	Nagel	TI	II	FM986729
V122†	<i>T. mentagrophytes</i>	Katze	TI	III	FM986761
V140†	<i>T. mentagrophytes</i>	Katze	TI	III	FM986762
V158†	<i>T. mentagrophytes</i>	Katze	TI	III	FM986763
V17†	<i>T. mentagrophytes</i>	Katze	TI	III	FM986764
V220†	<i>T. mentagrophytes</i>	Katze	TI	III	FM986765
V221†	<i>T. mentagrophytes</i>	Hund (Cocker)	TI	III	FM986766
V35†	<i>T. mentagrophytes</i>	Hund	TI	III	FM986767
V39†	<i>T. mentagrophytes</i>	Katze	TI	III	FM986768
V46†	<i>T. mentagrophytes</i>	Katze	TI	III	FM986769
42†	<i>T. mentagrophytes</i>	Schuppen Hand	TI	III	FM986738
133†	<i>T. mentagrophytes</i>	Schuppen Wange	TI	III	FM986739
213†	<i>T. mentagrophytes</i>	Schuppen	TI	III	FM986740
464†	<i>T. mentagrophytes</i>	Schuppen	TI	III	FM986741
497†	<i>T. mentagrophytes</i>	Schuppen	TI	III	FM986742
716†	<i>T. mentagrophytes</i>	Schuppen	TI	III	FM986743
2111†	<i>T. mentagrophytes</i>	unbekannt	TI	III	FM986745
2258†	<i>T. mentagrophytes</i>	Schuppen Ellenbogen	TI	III	FM986746
2380†	<i>T. mentagrophytes</i>	Schuppen Wade	TI	III	FM986747
2471†	<i>T. mentagrophytes</i>	Schuppen Wange	TI	III	FM986748
255†1	<i>T. mentagrophytes</i>	Schuppen Wange	TI	III	FM986749
2642†	<i>T. mentagrophytes</i>	Schuppen Arm	TI	III	FM986750
2657 (2)†	<i>T. rubrum</i> + Bakterien	Schuppen interdigital Fuß	TI	III	FM986754
2671†	<i>T. rubrum</i>	Nagel	TI	III	FM986751
2788 (2)†	<i>T. mentagrophytes</i>	Schuppen Arm	TI	III	FM986756
2788 (1)†	<i>T. mentagrophytes</i>	Schuppen Bein	TI	III	FM986755
3128†	<i>T. mentagrophytes</i>	Schuppen Rücken	TI	III	FM986752
3261†	<i>T. mentagrophytes</i>	Schuppen	TI	III	FM986753
Pelo1¶	<i>T. mentagrophytes</i>	unbekannt	TI	III*	FM986759
Pelo3¶	<i>T. mentagrophytes</i>	unbekannt	TI	III*	FM986760
SJEH5824*	<i>T. mentagrophytes</i>	Tier	TI	III*	FM986757
SJEZ5146*	<i>T. mentagrophytes</i>	Kaninchen	TI	III*	FM986758
SJK51*	<i>T. mentagrophytes</i>	Mensch Hals	TI	III*	FM986737
1567†	<i>T. mentagrophytes</i>	Schuppen Arm	TI	III*	FM986744
SJEK1471*	<i>T. mentagrophytes</i>	Mensch Brust	TI*	IV	FM986772
SJEK4836*	<i>T. mentagrophytes</i>	Mensch Gesicht	TI*	IV	FM986773
8/891¶	<i>T. mentagrophytes</i>	Nagel	TI*	IV	FM986771
8/890¶	<i>T. mentagrophytes</i>	Nagel	TI*	IV	FM986770

Fortsetzung nächste Seite

¶Prof. Dr. Antonio Rezusta, Microbiología, Medicina Preventiva y Salud Pública, Zaragoza, Spanien

Fortsetzung Tabelle 3.3

Isolat Nr.	Identifizierung	Herkunft	RFLP	Seq.	Accession #
SJED0001*	<i>T. quinckeanum</i>	unbekannt	TM	TM	FM991863
DH16793§	<i>T. mentagrophytes</i>	Nagel	TR		
132†	<i>T. mentagrophytes</i>	Nagel	TR		
1574†	<i>T. mentagrophytes</i>	Schuppen Gesäß	TR		
1589†	<i>T. rubrum</i>	Nagel	TR		
1601†	<i>T. mentagrophytes</i>	Schuppen Hals	TR		
2381†	<i>T. mentagrophytes</i>	Schuppen interdigital Fuß	TR		
2657 (1)†	<i>T. rubrum</i> + Bakterien	Nagel	TR		
2769†	<i>T. mentagrophytes</i>	Schuppen Inguinalfalte	TR		
3275 (1)†	<i>T. mentagrophytes</i>	Schuppen interdigital Fuß	TR		
3325†	<i>T. mentagrophytes</i>	Nagel	TR		
2162 (1)†	<i>T. mentagrophytes</i>	unbekannt	TR	TR	FM986774
SJEQ9302*	<i>T. simii</i>	Sri Lanka	TS	TS	FM986687
SJEQ9304*	<i>T. simii</i>	Sri Lanka	TS	TS	FM991864
SJEQ9305*	<i>T. simii</i>	Sri Lanka	TS	TS	FM991865
DH16792§	<i>T. mentagrophytes</i>	Nagel	TT	TT	FM986776
1564†	<i>T. mentagrophytes</i>	Schuppen Gesäß	TT	TT	FM986775

3.2 Polymorphismen

3.2.1 *Trichophyton interdigitale*

Bei der Sequenzanalyse der 86 *T. interdigitale* Proben zeigten sich vier verschiedene Sequenztypen, die durch bestimmte Polymorphismen gekennzeichnet waren.

Sequenztyp I unterschied sich von Typ II nur durch eine einzige Guanin-Insertion in der 5.8S rDNA an Position 404 (Abb. 3.2). Sequenztyp III war durch drei Substitutionen in der ITS-1-Region (G 8 A; A 105 C und C 148 T; Abb. 3.2) und eine Substitution in der ITS-2-Region (C 460 T; Abb. 3.3) charakterisiert und ließ sich somit ganz klar von Typ I/II differenzieren. Sequenztyp IV zeigte die für Typ III charakteristischen Polymorphismen an Position 8 und 105. Es fehlte jedoch die Substitution an Position 148. Zusätzlich zeigte Typ IV drei weitere Substitutionen (G 22 C; C 139 T; A 176 C) und eine Adenosin-Insertion an Position 217, die diesen Genotyp von den Typen I-III unterschieden.

Sechs Isolate wiesen einen Genotyp auf, der nicht eindeutig den o.g. zuzuordnen war. Aufgrund seiner Nähe zu Genotyp III wird dieser im Weiteren als *T. interdigitale* Typ III* bezeichnet. Diese sechs Isolate zeigten zwar die für Typ III charakteristischen Polymorphismen an Position 8 und 105 und stammen von Patienten mit Tinea corporis oder von einem Tier, jedoch besaßen diese Isolate drei Substitutionen (C 144 T, C 455 T und C 544 T). Die Sequenz

ähnelt an diesen Stellen eher denen des Genotyp I/II.

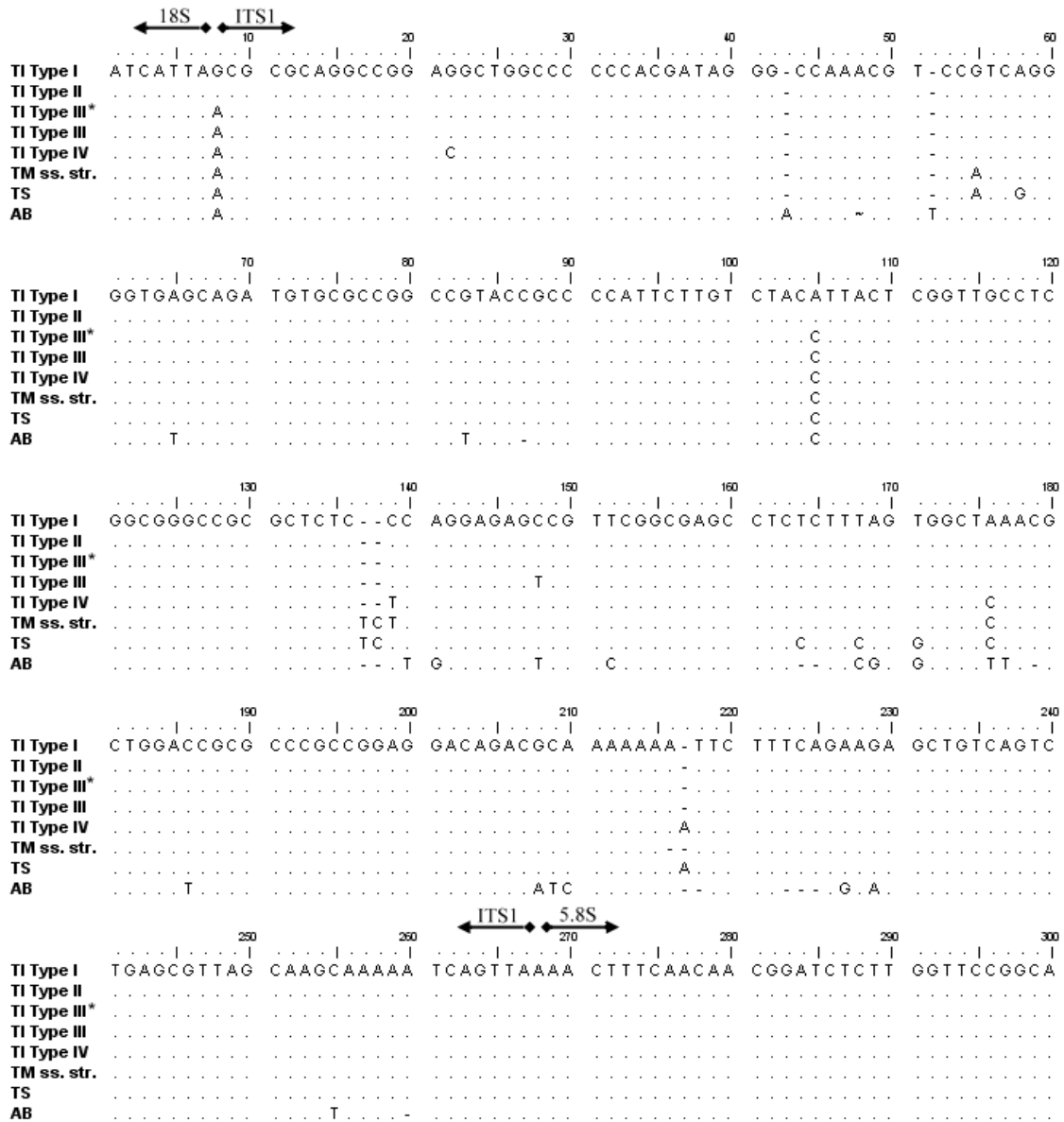


Abbildung 3.2: Multiple Alignment der *internal transcribed spacer 1*-Region

TI Typ I - AF506033, TI Typ II - AF506036, TI Typ III* - FM986758, TI Typ III - AF506034, TI Typ IV - AB246678, TM ss. str. - AY185126, TS - AF170475, AB- Z98016

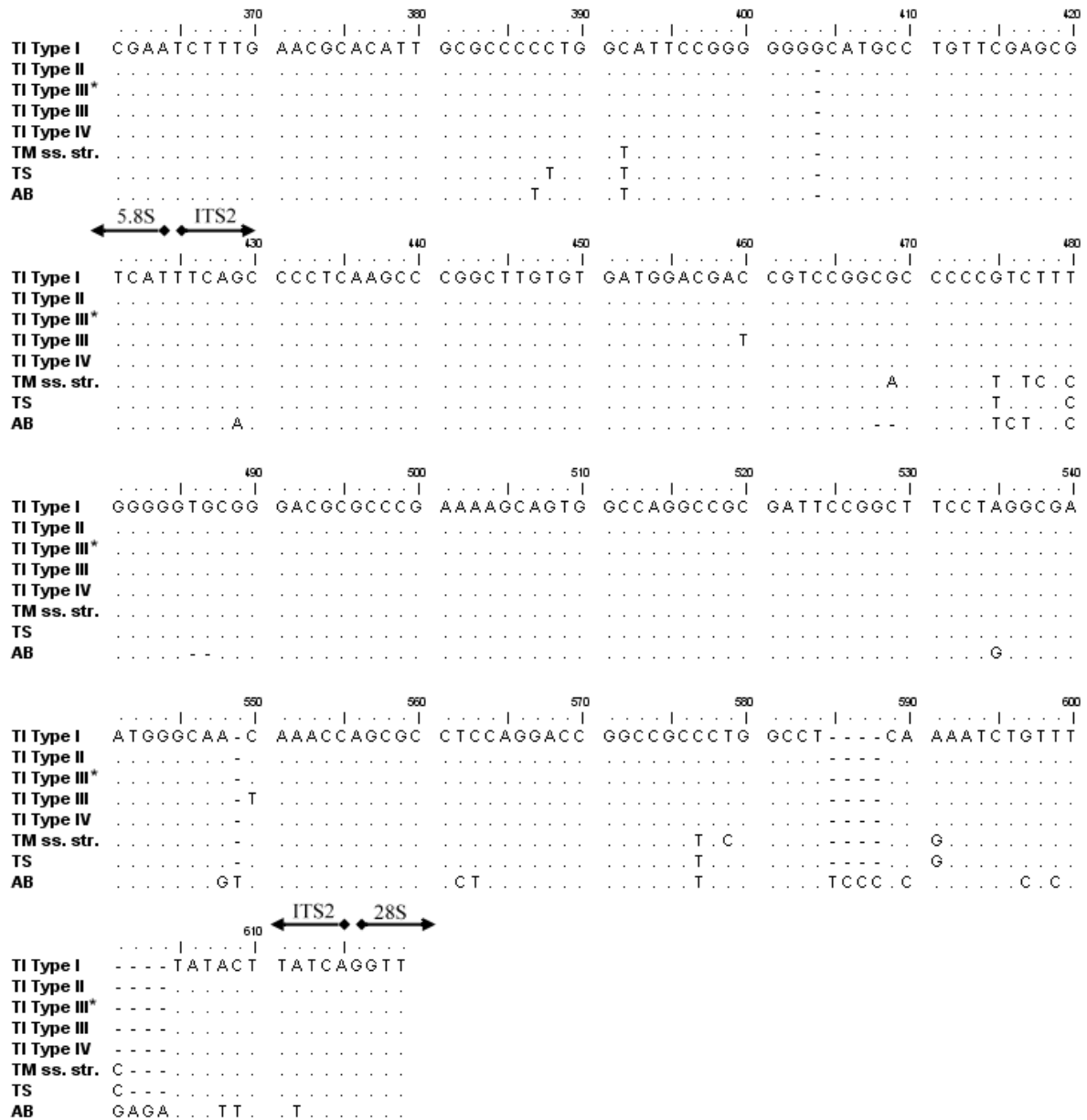


Abbildung 3.3: Multiple Alignment der 5.8S rDNA und der *internal transcribed spacer 2*-Region

TI Typ I - AF506033, TI Typ II - AF506036, TI Typ III* - FM986758, TI Typ III - AF506034, TI Typ IV - AB246678, TM ss. str. - AY185126, TS - AF170475, AB- Z98016

3.2.2 *Trichophyton mentagrophytes* und *Trichophyton simii*

In Abb. 3.2 und Abbildung 3.3 sind *T. mentagrophytes ss. str.* und *T. simii* ebenfalls dargestellt. Sie zeigen auch die für *T. interdigitale* Typ III charakteristischen Substitutionen an Position 8 und 105 im ITS-1, es fehlt aber – wie bei *T. interdigitale* Typ IV – die

Substitution an Position 148. Zwar weisen diese beiden Spezies noch weitere Polymorphismen auf, eine Aussage über Stabilität derselbigen ist jedoch aufgrund der geringen Probenzahl nicht möglich. Demzufolge werden sie nicht weiter betrachtet.

3.2.3 *Arthroderma benhamiae*

Da es sich bei *A. benhamiae* um eine primär zoophile Spezies handelt, wurde auf eine gezielte Polymorphismensuche zur Unterscheidung anthropophiler und zoophiler Stämme verzichtet. *A. benhamiae* Stämme zeigten nichtsdestotrotz die, für die zoophilen *T. interdigitale* Stämme typischen Signaturpolymorphismen (Pos. 8, 105, 148).

3.3 Phylogenie

Abbildung 3.4 zeigt einen Übersichtsbaum der Gruppierung aller analysierten Stämme. Die phylogenetische Analyse basiert bei allen Stämmen auf den Sequenzen von ITS-1, 5.8S und ITS-2. Im Weiteren soll die genaue Einordnung der einzelnen Stämme in diese Gruppierungen dargestellt werden. In der Übersicht ist jedoch schon deutlich die Abrenzung von *A. benhamiae* gegenüber *T. interdigitale*, *T. mentagrophytes ss. str.* und *T. simii* zu erkennen. Deshalb sollen diese im Folgenden auch gesondert besprochen werden.

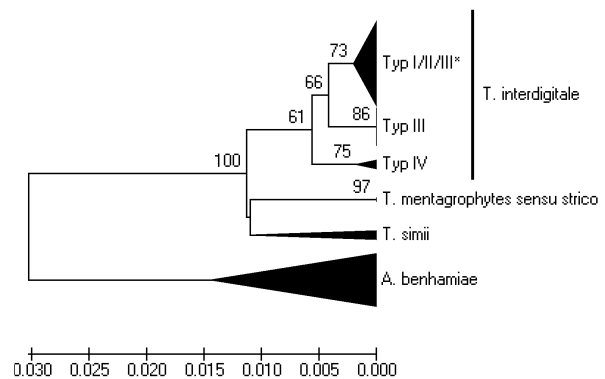


Abbildung 3.4: Phylogenetischer Übersichtsbaum

3.3.1 *Trichophyton interdigitale*, *Trichophyton mentagrophytes* und *Trichophyton simii*

Abbildung 3.5 stellt die Neighbor-Joining-Analyse von *T. interdigitale*, *T. mentagrophytes ss. str.* und *T. simii* dar. Diese drei Spezies bilden die zwei großen Gruppen des phylogenetischen Baums. Die größere Gruppe besteht aus den *T. interdigitale* Isolaten. Hier besteht eine große Untergruppe aus Typ I/II und eine Untergruppe aus Typ III und eine weitere aus Isolaten des Typs IV. Die sechs Isolate des Typs III* clusterten zwischen Typ I/II und Typ III. In der

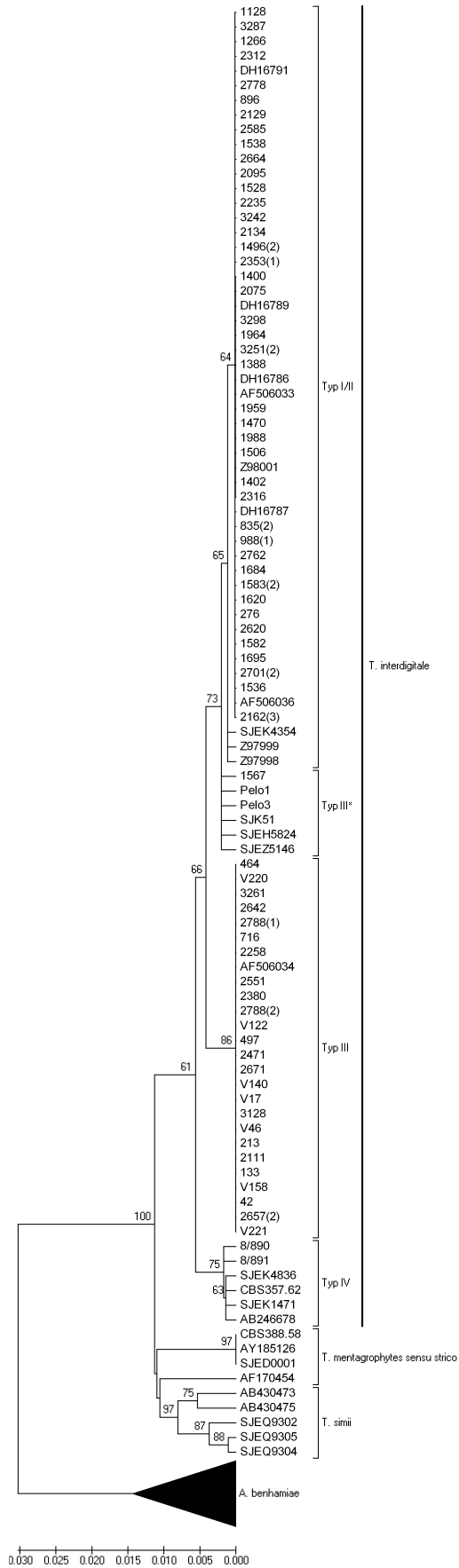


Abbildung 3.5: Phylogenetischer Baum (NJ) von *T. interdigitale*, *T. mentagrophytes ss. str.* und *T. simii*. Bootstrap-Werte über 50 % sind in Prozenten angegeben.

Gruppe von *T. mentagrophytes ss. str.* und *T. simii* bilden die beiden Spezies jeweils zwei kleinere Untergruppen und zeigen so die nahe phylogenetische Verwandtschaft dieser beiden Spezies.

3.3.2 *Arthroderma benhamiae*

Die untersuchten *A. benhamiae* Isolate wurden mit allen bereits bekannten Genotypen dieser Spezies, die in der NCBI Datenbank gefunden werden konnten verglichen. Der beste Überblick über diese Gruppe konnte mit Hilfe der Maximum-Parsimony-Analyse gewonnen werden (Abbildung 3.6). Die Gruppe bildete fünf Cluster. Die Stämme RV30000 und RV30001 (AF170456, AB236409) sind als afrikanische Rasse von *A. benhamiae* bekannt und bilden gemeinsam mit *T. bullosum* die phylogenetisch am weitesten entfernte Gruppe dieser Spezies, sogar noch entfernter als Stämme von *T. verrucosum* (Z98002-Z98004), *T. concentricum* (Z98012, EU083908, EU083910) und *T. erinacei* (Z97996, Z97997). *T. erinacei* wird zusätzlich durch Isolate von japanischen (AB105782/83 und AB078898), kenianischen Igel (AB105788/89) und europäischen Isolaten von Menschen (AB105793/94) repräsentiert. *T. concentricum* ist am nächsten mit der amerikanisch-europäischen Rasse von *A. benhamiae* verwandt, obwohl Mating-Versuche der beiden Spezies nicht möglich waren [56, 61]. Auch unsere Stämme, die von Katzen, Hunden und Meerschweinchen isoliert wurden, clusterten in dieser Gruppe.

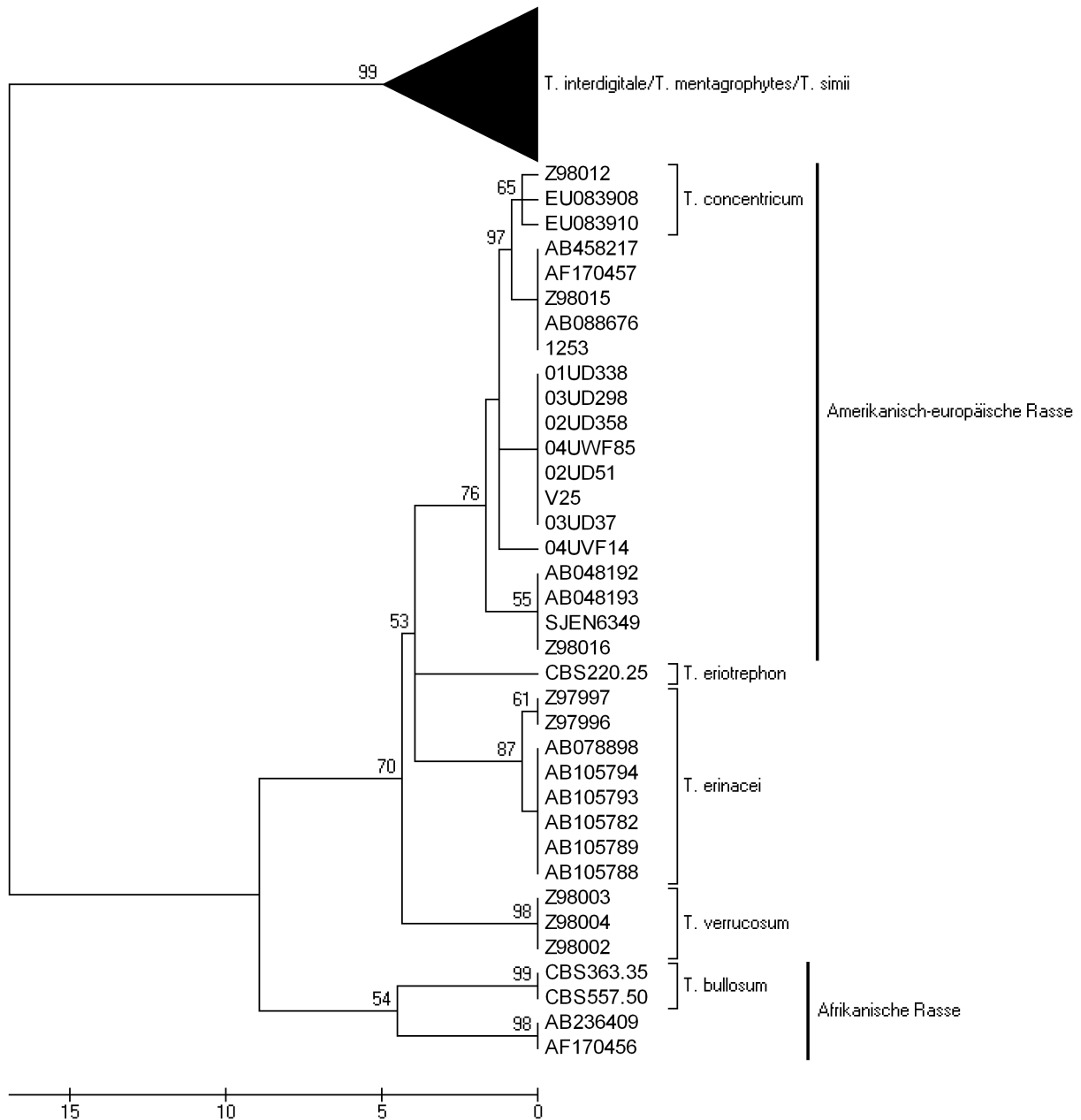


Abbildung 3.6: Phylogenetischer Baum (MP) von Spezies des *A. benhamiae*-Komplexes. Bootstrap-Werte über 50 % sind in Prozenten angegeben.

3.4 Morphologie

Es waren Kulturen von 86 der 102 Isolate vorhanden. Von 11 Isolaten existierte nur die bereits extrahierte DNA und bei fünf Kulturen war es aufgrund sekundärer Kontamination nicht möglich ausreichend Material für die mikroskopische Untersuchung zu gewinnen. Detaillierte morphologische Merkmale sind in Tabelle 3.4 aufgelistet.

Tabelle 3.4: Morphologie der untersuchten Isolate

Isolat Nr.	Seq.	Wachstum	Pigmentierung	Mikrokonidien		Makrokonidien	Spiralhyphen
				Form	Menge		
01UD338	AB	wattig, granulär	braun	rund	++	+	++
02UD358	AB	wattig, granulär	braun	rund	++	++	++
02UD51	AB	wattig	braun, orange	rund	+	-	++
03UD298	AB	wattig	braun	rund	+	-	++
03UD37	AB	granulär	dunkelbraun	rund	++	-	++
04UVF14	AB	granulär	dunkelbraun	rund	++	-	++
04UWF85	AB	wattig, granulär	braun	rund	++	-	++
1253	AB	lamellär	orange	-	-	-	-
V129	AB	wattig	gelb	rund-oval	+	++	-
V199	AB	granulär	gelb	-	-	-	-
V25	AB	granulär	orange, braun	rund	++	-	++
896	I	wattig, granulär	braun	ND	ND	ND	ND
1538	I	wattig	hell	tropfenförmig	++	-	-
2162 (3)	I	wattig	orange	rund	++	-	++
2235	I	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2585	I	wattig, granulär	dunkelbraun	rund	++	+	++
2620	I	pudrig	dunkelbraun	rund	++	+	++
2664	I	wattig, granulär	dunkelbraun	rund	++	+	+
3127	I	wattig	gelb	oval	+	-	-
3287	I	wattig	gelb	oval	+	-	+
3298	I	wattig	gelb	oval	+	-	+
1128	II	ND	ND	ND	ND	ND	ND
1266	II	wattig	orange	ND	ND	ND	ND
1388	II	granulär	braun	tropfenförmig-rund	+	-	++
1400	II	granulär	braun	tropfenförmig-rund	+	-	+
1402	II	wattig, granulär	braun	tropfenförmig	++	-	++
1470	II	ND	ND	ND	ND	ND	ND
1496 (2)	II	granulär	hell	ND	ND	ND	ND
1506	II	granulär	braun	rund	++	+	-
1528	II	granulär	braun	tropfenförmig-rund	+	-	+
1536	II	granulär	braun	rund	++	-	+
1544	II	granulär	hell	tropfenförmig	+	-	+
1582	II	granulär	braun	tropfenförmig	+	++	+
1583 (2)	II	granulär	braun	tropfenförmig-rund	++	-	-

Fortsetzung nächste Seite

Ergebnisse

Fortsetzung Tabelle 3.4

Isolat Nr.	Seq.	Wachstum	Pigmentierung	Mikrokonidien		Makrokonidien	Spiralhyphen
				Form	Menge		
1620	II	granulär	bräunlich	tropfenförmig-rund	++	-	-
1684	II	granulär	braun	tropfenförmig-rund	++	-	+
1695	II	granulär	braun	tropfenförmig-rund	++	-	-
1959	II	wattig, granulär	dunkelbraun	rund	++	++	+
1964	II	wattig	bräunlich	rund	++	-	++
1988	II	granulär	dunkelbraun	rund	++	+	++
2075	II	granulär	dunkelbraun	rund	++	++	++
2095	II	wattig, pudrig	braun	rund	++	-	++
2129	II	wattig, granulär	dunkelbraun	rund	++	+	+
2134	II	granulär	dunkelbraun	rund	++	++	++
2312	II	wattig, granulär	dunkelbraun	rund	++	++	+
2316	II	wattig	orange	rund	++	-	++
2353 (1)	II	wattig, granulär	dunkelbraun	rund	+	+	++
2701 (2)	II	granulär	orange	rund	++	-	++
276	II	granulär	dunkelbraun	rund	+++	-	-
2762	II	wattig	gelb	rund	+	-	++
2778	II	granulär	dunkelbraun	rund	++	+	++
3242	II	wattig	gelb	oval	+	-	-
3251 (2)	II	wattig	gelb	oval	+	-	+
988 (1)	II	granulär	hell	-	-	-	-
DH16786	II	wattig	orange	rund	++	++	++
DH16787	II	wattig	braun	-	-	-	++
DH16789	II	wattig	orange	rund	+	+	++
DH16791	II	wattig	orange	rund	+	+	++
133	III	wattig	gelb	oval	+	-	-
2111	III	wattig	orange, hell	rund	+	-	++
213	III	wattig	gelb	rund	+	-	+
2258	III	wattig	hellbraun	rund	+	-	+
2380	III	granulär	dunkelbraun	rund	++	+++	-
2471	III	granulär	dunkelbraun	rund	++	+++	+
2551	III	granulär	dunkelbraun	rund	+	-	++
2642	III	granulär	dunkelbraun	rund	++	++	++
2657 (2)	III	wattig, granulär	orange, braun	rund	++	+	++
2671	III	granulär	hellbraun	rund	++	+	+
2788 (1)	III	wattig, granulär	dunkelbraun	rund	++	++	++
2788 (2)	III	granulär	dunkelbraun	rund	++	++	++
3128	III	wattig	orange	oval	+	-	+
3261	III	wattig	orange	oval	+	-	-
42	III	wattig	gelb	oval	+	-	+
464	III	wattig, granulär	dunkelbraun	rund	+++	-	+
497	III	wattig	braun	ND	ND	ND	ND
716	III	wattig	braun	tropfenförmig	+++	-	-
V122	III	granulär	dunkelbraun	rund-oval	+	-	+
V140	III	wattig	gelb	-	-	-	-
V158	III	granulär	braun	ND	ND	ND	ND
V17	III	granulär	orange	rund	++	+	++
V220	III	granulär	braun	rund	++	-	++

Fortsetzung nächste Seite

Ergebnisse

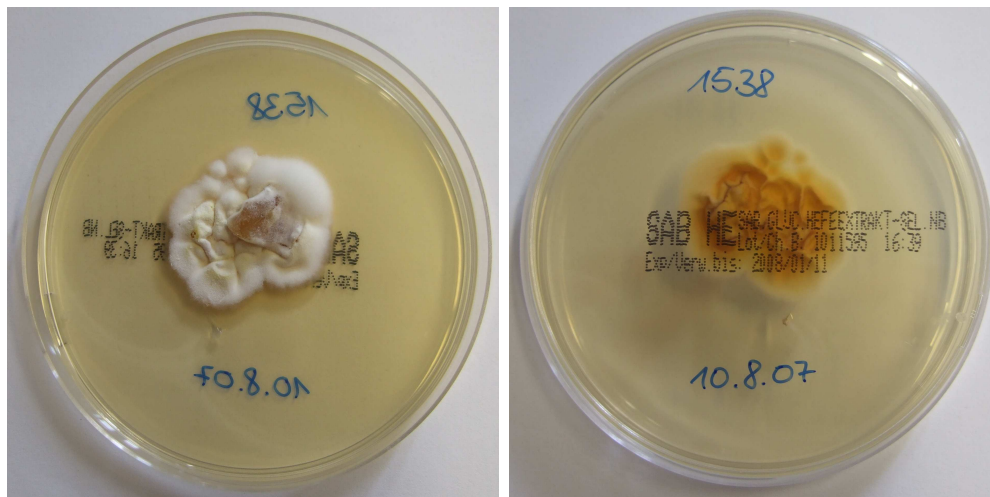
Fortsetzung Tabelle 3.4

Isolat Nr.	Seq.	Wachstum	Pigmentierung	Mikrokonidien		Makrokonidien	Spiralhyphen
				Form	Menge		
V221	III	granulär	braun	rund	++	+	++
V35	III	granulär	dunkelbraun	rund	+++	-	+
V39	III	wattig, granulär	dunkelbraun	rund	++	++	++
V46	III	wattig, granulär	braun	ND	ND	ND	ND
1567	III*	granulär	braun	tropfenförmig-rund	+	+	+++
Pelo1	III*	granulär	hell	tropfenförmig-rund	+	-	+
Pelo3	III*	granulär	hell	tropfenförmig-rund	+++	-	+
8/890	IV	granulär	braun	tropfenförmig-rund	+++	-	+
8/891	IV	wattig	hell	tropfenförmig-rund	+++	-	+

3.4.1 *Trichophyton interdigitale*

Genotyp I

Es wurden acht Isolate untersucht. Fünf von acht Kulturen zeigten wattiges Koloniewachstum. Diese Isolate wiesen keine Pigmentierung der Rückseiten auf (Abb. 3.7). Es konnte die Ausbildung von ovalen und tropfenförmigen Mikrokonidien beobachtet werden. Makrokonidien wurden nicht gefunden. Die Ausbildung von Spirallyphen wurde in drei Isolaten beobachtet. In drei von acht Isolaten wurde granuläres oder gemischtes Koloniewachstum beobachtet. Diese zeigten eine braune Pigmentierung der Rückseiten und produzierten runde Mikrokonidien, zigarrenförmige Makrokonidien und Spirallyphen.



(a)

(b)

Abbildung 3.7: *T. interdigitale* Typ I mit wattigem Koloniewachstum, ohne Pigmentierung der Rückseite

Genotyp II

Es wurden 36 Isolate untersucht. In 26 von 36 Fällen (72 %) wurde granuläres oder gemischtes Koloniewachstum (Abb. 3.8c) beobachtet. In drei Isolaten war keine Pigmentierung der Rückseiten erkennbar (Abb. 3.8b), alle anderen zeigten eine braune Verfärbung (Abb. 3.8d). Runde bis tropfenförmige Mikrokonidien wurden in 25 Isolaten beobachtet. Die Ausbildung zigarrenförmiger Makrokonidien war sporadisch nachweisbar. Spirallyphen konnten in 29 Isolaten gefunden werden.

Zehn Isolate zeigten wattiges Koloniewachstum. In keinem dieser Isolate wurde eine Pigmentierung der Rückseiten beobachtet. Die Ausbildung runder bis ovaler Mikrokonidien war

mäßig, zigarrenförmige Makrokonidien wurden nur in drei Isolaten beobachtet, Spirallyphen konnten in acht Isolaten gefunden werden.

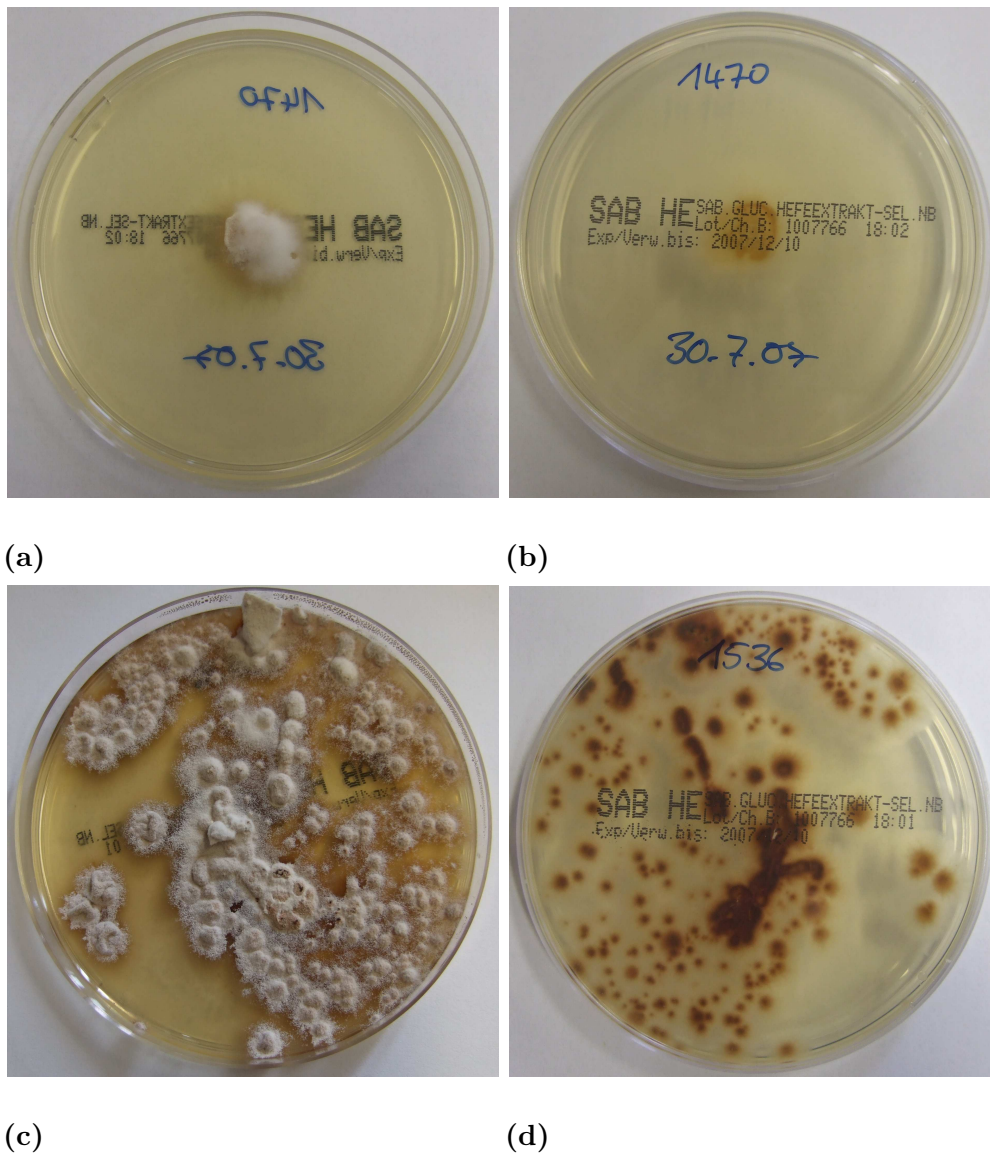
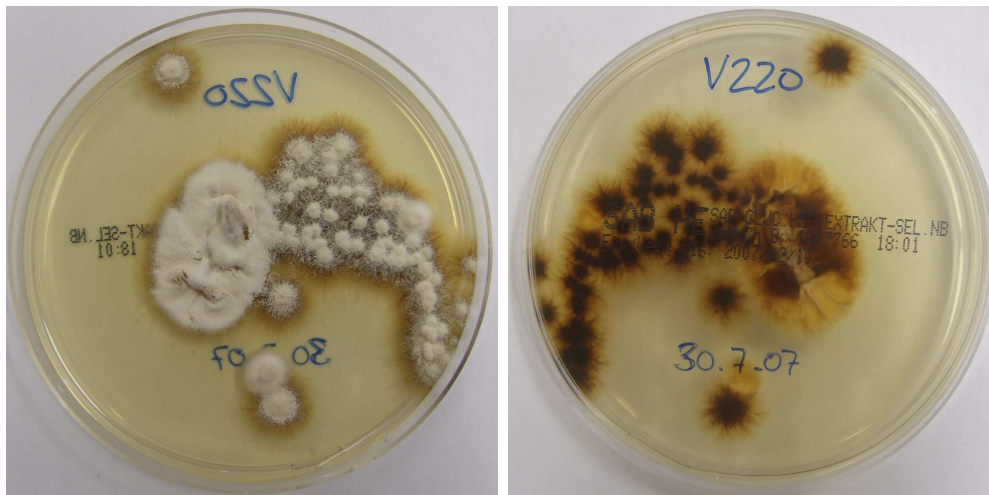


Abbildung 3.8: *T. interdigitale* Typ II, **3.8a** und **3.8b** zeigen wattiges Koloniewachstum und keine Pigmentierung der Rückseite, **3.8c** und **3.8d** zeigen granuläres Koloniewachstum und braune Pigmentierung der Rückseite

Genotyp III und III*

Es wurden 30 Isolate untersucht, davon Genotyp III (27) und Genotyp III* (3). 20 der 30 Isolate (66,7 %) zeigten granuläres oder gemischtes Koloniewachstum (Abb. 3.9a). Bei 16 dieser Isolate wurde eine braune Pigmentierung der Rückseiten beobachtet (Abb. 3.9b), vier zeigten keine Pigmentierung. In allen Isolaten konnte die Ausbildung runder (14 Isolate),

tropfenförmiger (1 Isolat) oder ovaler (ein Isolat) Mikrokonidien beobachtet werden. Zigarrenförmige Makrokonidien und Spirallyphen konnten in 11 bzw. 18 Isolaten gefunden werden. Zehn Isolate zeigten wattiges Koloniewachstum. Von diesen zeigten drei eine braune Pigmentierung der Rückseiten, bei allen anderen wurde keine Pigmentierung beobachtet. Außer in Isolat 716 und war die Ausbildung von Mikrokonidien (alle Formen) spärlich. Makrokonidien wurden nicht gefunden, Spirallyphen zeigten sich in fünf Isolaten.



(a)

(b)

Abbildung 3.9: *T. interdigitale* Typ III mit granulärem Oberflächenwachstum und brauner Pigmentierung der Rückseite

Genotyp IV

2 Isolate wurden morphologisch untersucht. Ein Isolat zeigte granuläres Koloniewachstum mit brauner Pigmentierung, das andere wattiges Koloniewachstum ohne Pigmentierung. Die Ausbildung runder bis tropfenförmiger Mikrokonidien war in beiden Isolaten stark ausgeprägt. Spirallyphen wurden vereinzelt beobachtet. Makrokonidien kamen nicht vor.

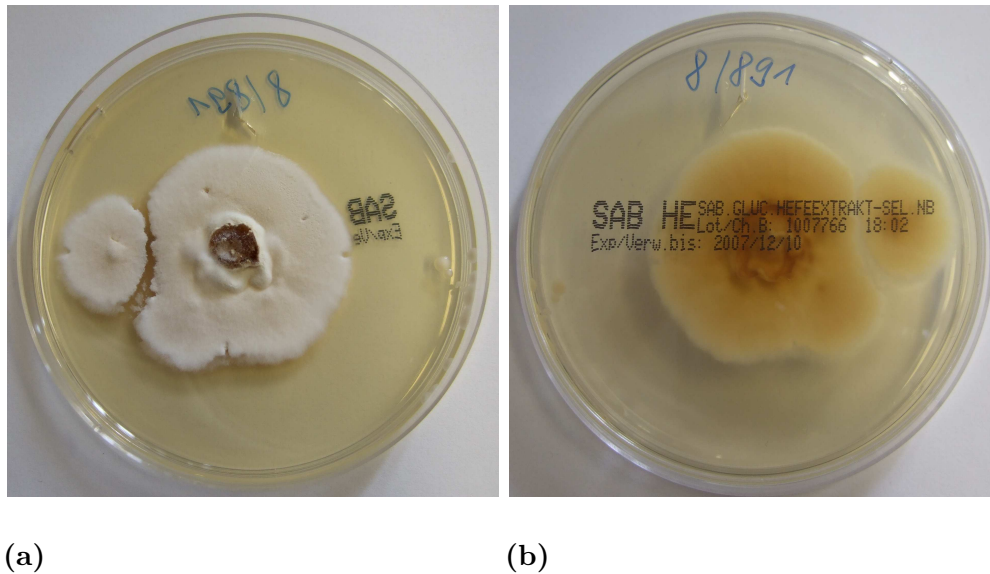


Abbildung 3.10: *T. interdigitale* Typ IV mit wattigem Oberflächenwachstum, ohne Pigmentierung der Rückseite

3.4.2 *Trichophyton* Anamorph von *Arthroderma benhamiae*

Es wurden 11 Isolate untersucht. Davon zeigten sieben ein granuläres bzw. gemischtes Koloniewachstum. Eine braune Pigmentierung und die Ausbildung runder Mikrokonidien sowie Spirallyphen konnten bei sechs dieser Isolate gefunden werden. Ein Isolat (V199) zeigte weder eine Pigmentierung der Rückseite noch die Ausbildung jeglicher mikroskopischer Merkmale. Drei Isolate wiesen ein wattiges Koloniewachstum mit brauner (zwei Isolate) bzw. fehlender (ein Isolat) Pigmentierung der Rückseiten auf. Runde Mikrokonidien waren in allen Isolaten spärlich vorhanden. Zigarrenförmige Makrokonidien wurden in dem Isolat mit fehlender Pigmentierung gefunden, Spirallyphen wurden nur in den Isolaten mit brauner Pigmentierung beobachtet.

Ein Isolat (1253) unterschied sich makroskopisch erheblich von den anderen. Das Koloniewachstum zeigte eine lamelläre Struktur des Agars mit samtiger Oberfläche. Es konnte weder eine Pigmentierung noch die Ausbildung mikroskopischer Merkmale nachgewiesen werden.

3.5 Assoziation zwischen Krankheitsbild und Genotyp

Die in dieser Arbeit untersuchten Stämme wurden nach bestimmten Kriterien ausgewählt. Aus diesem Grund werden im folgenden Abschnitt nur *T. mentagrophytes ss. lato*-Stämme betrachtet.

3.5.1 Tinea pedis

Es wurden 17 Isolate untersucht. Die Verteilung auf die verschiedenen Spezies ist in Abb. 3.11 dargestellt. Es wird deutlich, dass die meisten Infektionen durch anthropophile *T. interdigitale* Typ I (n=4) und Typ II (n=11) ausgelöst wurden.

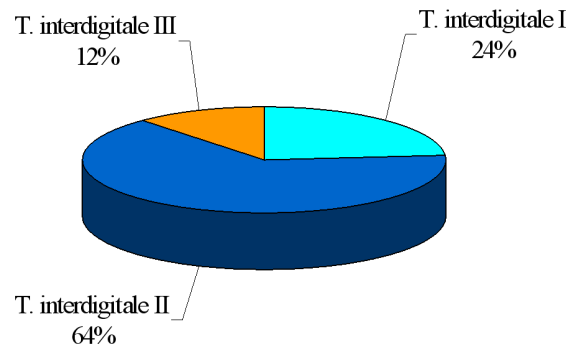


Abbildung 3.11: Tinea pedis

3.5.2 Onychomykose

Es wurden 30 Isolate untersucht. Die Verteilung ist in Abb. 3.12 dargestellt. *T. interdigitale* Typ I (n=6) und Typ II (n=23) sind die Hauptauslöser dieses Krankheitsbildes. Die zoophile Spezies von *T. interdigitale* macht mir nur einem Isolat einen geringen Anteil der Infektionserreger aus.

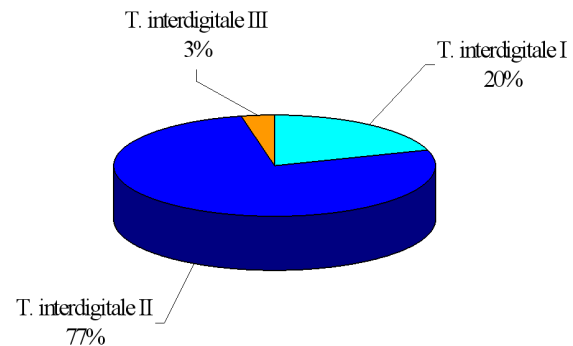


Abbildung 3.12: Onychomykose

3.5.3 Tinea corporis

Es wurden 25 Isolate untersucht. Die Verteilung ist in Abb. 3.13 dargestellt. Die zoophilen Spezies von *T. interdigitale*, Typ III und IV (n=18), und das *Trichophyton* Anamorph von *A. benhamiae* (n=2) sind zusammen in

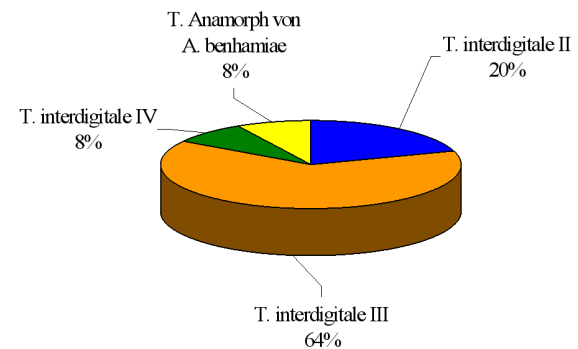


Abbildung 3.13: Tinea corporis

mehr als 2/3 der Fälle Infektionserreger.

3.5.4 Assoziation zwischen Wirtsspezies und dem *Trichophyton* Anamorph von *A. benhamiae* bzw. den zoophilen Stämmen von *T. interdigitale*

Insgesamt wurden 25 Isolate von Tieren untersucht. Zehn Isolate von Meerschweinen, acht von Katzen, vier von Hunden, zwei von Kaninchen und ein Isolat von einem unbekannten Tier. Die Verteilung der Erreger auf die einzelnen Wirte ist in Abb. 3.14 dargestellt. Hier wird deutlich, dass das *Trichophyton* Anamorph von *A. benhamiae* der Haupterreger (60 %) bei Meerschweinen ist. Bei Katzen dominiert *T. interdigitale* Typ III (87,5 %) als Erreger. Weiterhin ist ersichtlich, dass die Infektionen ausschließlich durch Erreger hervorgerufen werden, die als primär zoophil beschrieben sind.

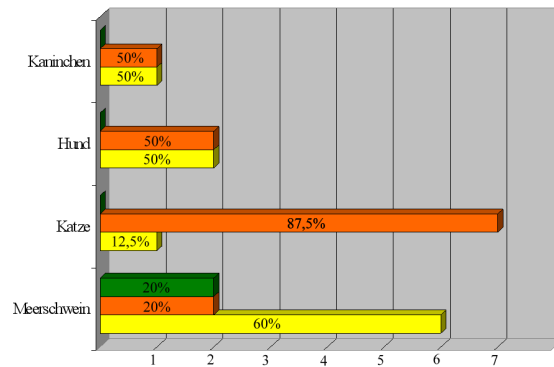


Abbildung 3.14: Zoophile Infektionen

gelb – *Trichophyton* Anamorph von *A. benhamiae*

orange – *T. interdigitale* Typ III

grün – *T. interdigitale* Typ IV

4 Diskussion

Im Folgenden sollen zunächst Anwendung, Möglichkeiten und Grenzen der Methodik diskutiert werden. Im zweiten Teil wird dann ausführlicher auf die Ergebnisse und die damit verbundenen Erkenntnisse eingegangen.

4.1 Molekulargenetische Methodik

4.1.1 DNA-Extraktion

In dieser Arbeit wurde eine im Vergleich zu den heutigen Möglichkeiten recht aufwändige DNA-Extraktion betrieben. Die Pilzkulturen wurden über einen Zeitraum von einer bis drei Wochen kultiviert um ausreichend Pilzmaterial für eine umfangreiche DNA-Extraktion zu erhalten. Die Wahl für das Extraktionsverfahren fiel auf die bereits beschriebene CTAB-Methode, um möglichst viel und vor allem reine genomische DNA zu erhalten. Die extrahierte DNA wurde nicht einzig für diese Arbeit extrahiert, sondern soll auch weiterhin zu Forschungszwecken zur Verfügung stehen.

4.1.2 *Polymerase chain reaction*

Für die PCR wurde in dieser Arbeit ebenfalls auf ein bereits etabliertes Schema zurückgegriffen. Dies ist darauf zurückzuführen, dass die Suche nach geeigneten Zielen in der DNA zur Diagnostik von Dermatophyten in den letzten Jahren bereits intensiv betrieben worden ist und gezeigt hat, dass die ITS-Region eine ausreichend variable Region für die Identifizierung entsprechend des neuen Spezieskonzeptes ist [24].

Die Primer für die primäre PCR der ITS-Region (V9D und LSU266) sind die Standardprimer für das Konsiliarlabor für Dermatophyten am Institut für Mikrobiologie und Hygiene der Charité Universitätsmedizin Berlin. Aufgrund der Tatsache, dass eine große Anzahl Proben

untersucht wurde, verzichteten wir auf eine *Taq*-Polymerase mit Korrekturfunktion, da eventuelle Fehler der *Taq*-Polymerase nicht konsequent in allen Proben auftreten würden.

4.1.3 *Restriction fragment length polymorphism*

Abbildung 3.1 zeigt, dass die grobe Differenzierung zwischen einzelnen Spezies von *T. mentagrophytes ss. lato* gut möglich ist. Die Subtypisierung von *T. interdigitale* (mit Ausnahme von Genotyp IV) und die Differenzierung zwischen dem *Trichophyton* Anamorph von *A. benhamiae* und *T. erinacei* bleibt der RFLP mit *Mva*I verschlossen. Weiterhin ist es mittels RLFP möglich, *T. mentagrophytes ss. lato*-Stämme von nah verwandten Spezies, wie *T. tonsurans* und *T. rubrum* zu unterscheiden (Abb. 3.1 und Tab. 3.1).

Zur genaueren Differenzierung von *T. interdigitale* und *A. benhamiae* musste auf die Sequenzanalyse zurückgegriffen werden. Dies gilt auch für die unter Abschnitt 3.1.2 erwähnten Misidentifizierungen.

4.1.4 Sequenzierung

Die Sequenzierung erfolgte bei Dr. Martin Meixner mit dem Primer ITS-5 (ebenfalls Standardprimer des Konsiliarlabors). Die Sequenzierung wurde hierbei nur in 5'–3'-Richtung vorgenommen, da, wie schon bei der *Taq*-Polymerase erwähnt, Fehler nicht konsequent in allen DNA-Sequenzen auftreten würden. Die Sequenzdaten wurden mit Hilfe der SmartGene IDNS Datenbank und GenBank ausgewertet. In der IDNS-Datenbank erfolgte ein manuelles Korrekturlesen gegen den wahrscheinlichsten Referenzstamm, und es konnten Basenfehlbestimmungen mithilfe des Chromatogramms ausgeschlossen bzw. korrigiert werden. Alle korrigierten Sequenzen wurden in der SmartGene Datenbank gespeichert und im Anschluss in der GenBank Datenbank der Öffentlichkeit zugänglich gemacht (Accession Nr. siehe Tab. 3.2 und 3.3).

4.2 Erkenntnisse durch Sequenzanalyse und phylogenetische Betrachtungen

4.2.1 *Trichophyton interdigitale*

In dieser Arbeit zeigte sich, dass *T. interdigitale* Typ I/II Stämme die ursächlichen Erreger von Tinea pedis (78 %) und Onychomykose (83 %) waren. Auffällig war zudem, dass Typ II weitaus häufiger (insgesamt 42 Isolate) als Typ I (8 Isolate) auftrat. *T. interdigitale* Typ III hingegen trat vor allem in tierischen Isolaten und als Erreger von Tinea corporis in Erscheinung, konnte aber auch in zwei Fällen von Tinea pedis und in einer Nagelmykose als Erreger identifiziert werden. Im Gegensatz dazu fehlten bei fünf von 25 Tinea corporis Isolaten, die für die zoophilen *T. interdigitale*-Stämme typischen Signaturpolymorphismen (G 8 A und A 105 C).

Die phylogenetische Analyse zeigt eine Gruppe von zunächst als Typ III identifizierten Isolaten, die zwischen Typ I/II und Typ III clustern. Diese wiesen zwar die für zoophile Stämme charakteristischen Polymorphismen an Position 8 und 105 auf, es fehlten aber die restlichen Substitutionen an Position 148 und 460, die Typ I/II vom eigentlichen Typ III unterscheiden. Da alle sechs Typ III*-Stämme entweder von Tieren oder von Menschen mit Tinea corporis isoliert wurden, zeigt dies, dass die Polymorphismen an Position 8 und 105 für die Differenzierung anthropophiler von zoophilen Stämmen verlässlicher sind, als die anderen Polymorphismen der ITS-Region.

Andere Studien [45, 11] haben analog zur ITS-Region Polymorphismen der 28S rDNA für die Identifizierung von Dermatophyten genutzt. Hier wurden erstmals einige der Genotypen von Isolaten des *T. mentagrophytes*-Komplexes beschrieben. Vier Typen von 28S rDNA Sequenzen konnten auch in Stämmen von *T. mentagrophytes ss. lato* gefunden. Es zeigte sich jedoch, dass Polymorphismen in der ITS-1 und ITS-2-Region sowie der 5.8S rDNA weitaus nützlicher für die Differenzierung innerhalb der einzelnen Spezies sind. Die in der 28S rDNA beschriebenen ersten drei Genotypen von *T. mentagrophytes* entsprechen den hier beschriebenen Genotypen I-III von *T. interdigitale* als der am häufigsten vorkommenden Spezies des *T. mentagrophytes*-Komplexes. Darüberhinaus existiert in der 28S rDNA nur ein Polymorphismus der Genotyp I/II von Genotyp III unterscheidet, ein weiterer differenziert Genotyp I und II. Der durch Ninet et al. [45] als Typ IV beschriebene Genotyp entspricht jedoch der Spezies *T. mentagrophytes ss. str.* und nicht dem in der vorliegenden Arbeit als

Typ IV bezeichneten *T. interdigitale*-Genotypen.

4.2.2 *Trichophyton mentagrophytes sensu stricto* und *Trichophyton simii*

Im Gegensatz zur Vielzahl der als *T. interdigitale* oder *Trichophyton* Anamorph von *A. benhamiae* identifizierten Stämme steht die geringe Anzahl der als *T. mentagrophytes ss. str.* identifizierten Isolate. Nur eines der klinischen Isolate und zwei weitere Isolate des CBS konnten als Mitglieder dieser Spezies identifiziert werden. Andere Studien [11] konnten keinen einzigen Fall einer Infektion mit *T. mentagrophytes ss. str.* aufzeigen. Dieses Ergebnis bestätigt die frühere Vermutung, dass diese Spezies zumindestens in Westeuropa eher selten als Infektionserreger auftritt und somit keine Assoziation mit normalen Haustieren, wie Hunden, Katzen und Meerschweinchen, vorhanden ist. Obwohl *T. mentagrophytes ss. str.* historisch als ursächlicher Erreger von Mäusefavus beschrieben wird [5], scheint es, als sei diese Spezies nicht unbedingt mit Mäusen oder anderen Nagern, sondern eher mit Kamelen in Verbindung zu bringen [50].

Auch *T. simii* ist in unseren Breitengraden offensichtlich weniger verbreitet. Dies zeigt unter anderem auch die Tatsache, dass der Untersuchung dieser Spezies momentan wenig Aufmerksamkeit geschenkt wird. Am häufigsten kommt diese Spezies in Indien vor und infiziert dort primär Affen [34], jedoch wird aufgrund der Form (makroskopisch und mikroskopisch) und des Matings dieser Spezies eine Verbindung mit Tieren vermutet, die am Boden oder unter der Erde leben [54].

4.2.3 *Arthroderma benhamiae*

Wie bereits erwähnt, war nicht RFLP, sondern nur die Sequenzanalyse in der Lage die genaue Differenzierung der Stämme innerhalb des *A. benhamiae*-Komplexes vorzunehmen. Alle von uns untersuchten Stämme zeigten die für die amerikanisch-europäische Rasse charakteristische ITS-Sequenz. Dies ist nicht überraschend, da alle Isolate von Tieren aus dem westeuropäischen Bereich stammen. Infektionen von Menschen mit Erregern aus diesem Spektrum entstehen vor allem durch intensiven Kontakt mit erkrankten Haustieren, wie Katzen, Hunden und Meerschweinchen, die die Hauptvektoren dieser Infektionen sind. In der Vergangenheit wurde

vermutet, dass hauptsächlich Nagetiere und Kaninchen Überträger der Erreger seien [15, 55], jedoch stammt von den 10 *A. benhamiae*-Isolaten, die von uns untersucht wurden, nur eines von einem Kaninchen. Sechs Isolate stammten von Meerschweinchen, zwei von Hunden und ein weiteres von einer Katze. Dies legt die Vermutung nahe, dass heutzutage Meerschweinchen der Hauptwirt für diesen Erreger sind. Die beiden einzigen Studien, in denen Erreger zoophiler Infektionen molekulargenetisch untersucht wurden zeigten, dass diese Spezies in mehr als 80 % [14] bzw. 75 % [11] bei Meerschweinchen auftritt.

Die phylogenetische Analyse verschiedener Stämme von *T. erinacei*, *T. verrucosum*, *T. concentricum*, und selteneren Entitäten, wie *T. eriotrephon* und *T. bullosum*, sowie Stämme der afrikanischen und amerikanisch-europäischen Rassen von *A. benhamiae* gibt einen repräsentativen Überblick über die Verwandtschaft innerhalb des *A. benhamiae*-Komplexes (Abb. 3.6). *T. erinacei* ist nicht Synonym für die afrikanische Rasse von *A. benhamiae*, sondern vielmehr eine Spezies, die für afrikanische Igel (*Atelerix albiventris*) spezifisch ist. Isolate dieser Igel aus Japan und Kenia clustern in derselben Gruppe wie Isolate europäischer Igel (*Erinaceus europaeus*) und sind nur durch zwei Substitutionen voneinander getrennt.

T. concentricum scheint erst vor Kurzem, vermutlich durch einen *founder effect*, aus der amerikanisch-europäischen Rasse von *A. benhamiae* (zwei Substitutionen) entstanden zu sein. Diese Vermutung wird zum einen dadurch gestützt, dass diese Spezies epidemiologisch begrenzt, vor allem in Südostasien, Ozeanien und Zentralamerika, als Verursacher der sog. *Tinea imbricata* in Erscheinung tritt und zum anderen dadurch, dass sie die einzige anthropophile Spezies in diesem Komplex ist.

Der CBS-Stamm 363.35 ist mit großer Wahrscheinlichkeit die Typkultur für *T. bullosum*, die erstmals von Lebasque [39] beschrieben wurde. Insgesamt wurden sieben Stämme dieser Spezies in Tunesien, Sudan und Syrien von Pferden und von Menschen mit *Tinea faciei* isoliert. Das klinische Bild entspricht einer Infektion mit zoophilen Stämmen. Im Gegensatz dazu ist *T. eriotrephon* näher mit der amerikanisch-europäischen Rasse von *A. benhamiae* verwandt, bildet aber ein eigenes Cluster. Das einzige weltweit erhaltene Isolat dieser Spezies ist der CBS-Stamm 220.25 und wurde von Papegaay in Amsterdam isoliert. Es stammt von einem Patienten, der an *Tinea circinata* litt, und war wahrscheinlich die Folge einer Infektion zoophilen Ursprungs. Die separate Gruppierung dieser Spezies in einem eigenen Cluster lässt vermuten, dass noch andere Genotypen von *A. benhamiae* existieren, und zwar nicht nur in Afrika, sondern auch in Europa, wo die Asservierung von Dermatophytenstämmen intensiver

betrieben wird.

4.2.4 Validität der Polymorphismen

Aufgrund des großen Probenkollektivs wurde auf bestimmte methodische Vorgehensweisen verzichtet, die normalerweise zur Validitätsüberprüfung von DNA-Polymorphismen angewendet werden. Für jeden Genotyp von *T. interdigitale* sind mindestens sieben Sequenzen (Typ IV) bis 39 Sequenzen (Typ II) vorhanden, so dass zumindestens bei den als Signaturpolymorphismen (Pos. 8, 105 und 404) deklarierten Basen die Validität gegeben ist, da diese bei allen erwähnten zoophilen Arten vorhanden sind.

4.2.5 Fehlidentifizierungen

Bei den Isolaten, die in der Sequenzanalyse als *P. chrysogenum* und *Debaryomyces* sp. identifiziert wurden, ist von sekundärer Kontamination der Kultur auszugehen. Neun der 11 als *Fusarium* spp. identifizierten Stämme wurden hingegen aus Onychomykosen (7) oder Tinea pedis (2) isoliert, so dass hier auch von einer primären Fehlidentifizierung ausgegangen werden kann. Neuere Studien haben dahingehend gezeigt, dass *Fusarium* spp., eine Spezies, die sonst eher Pflanzen befällt, immer häufiger von Patienten mit Onychomykosen isoliert werden [41, 12].

Eine Weitere – genauer der CBS-Stamm 333.32 – sollte hier noch besprochen werden. Dieser wird in der CBS-Datenbank als *T. mentagrophytes* geführt und wurde deshalb in die Untersuchung mit eingeschlossen. Bereits in der RFLP zeigte sich ein Schnittmuster, dass keinem *T. mentagrophytes* ss. *lato*-Mitglied zuzuordnen war. Vielmehr entsprach das Schnittmuster dem von *T. tonsurans*. Die anschließend durchgeführte Sequenzanalyse bestätigte in der BLAST-Suche die Zugehörigkeit zu *T. tonsurans* mit einer 100 % Übereinstimmung zum Referenzstamm von *T. tonsurans*. Weitere Nachforschungen zu diesem Stamm ergaben, dass CBS 333.32 von Milochevitch in die Kollektion eingereicht wurde. Dieser beschreibt den Stamm in der dazugehörigen Publikation als *T. langeronii*, ein veraltetes Taxon, welches in neueren Studien mit dem Synonym *T. mentagrophytes* ss. *str.* bezeichnet wird. Isoliert wurde dieser Stamm von der Kopfhaut eines israelischen Kindes in Belgrad, welches Plaques und Schuppung der Kopfhaut gezeigt hatte. Weiterhin war ein endotricher Befall der Haare beschrieben worden. All diese Symptome sind auch Merkmale einer Tinea capitis durch *T. tonsurans*.

Dieses Beispiel zeigt, wie leicht eine falsche Identifizierung aufgrund morphologischer Merkmale möglich ist. Der genannte Stamm sollte nunmehr nicht als *T. mentagrophytes*, sondern als *T. tonsurans* geführt werden. Die ermittelte Sequenz ist unter der Accession Nr. FM986777 bei GenBank hinterlegt. Weiterhin macht dies deutlich, wie wichtig die Sequenzanalyse in Bezug auf die Auswahl der Referenzstämme für Arbeiten dieser Art ist. Als solche sollten nur Isolate verwendet werden, deren Identifizierung mittels Sequenzanalyse bestätigt wurde.

4.2.6 Morphologie

Der Phenotyp von *T. mentagrophytes* ss. lato-Stämmen ist sehr variabel. Dies haben auch die Untersuchungen morphologischer Merkmale in dieser Arbeit gezeigt. Die Oberflächenstruktur ist sowohl zwischen *T. interdigitale* und dem *Trichophyton* Anamorph von *A. benhamiae* zwischen den zoophilen und anthropophilen Stämmen von *T. interdigitale* uneinheitlich. Die Kulturen variierten von granulärem (pudrig), über gemischtes bis zu wattigem („fluffy coat“) Wachstum mit gelben, orangen, braunen oder dunkelbraunen Rückseiten. Die Subkultivierung mag dazu beigetragen haben, da bekannt ist, dass Dermatophyten in der Subkultur die Ausprägung bestimmter Merkmale verlieren [44]; d.h. Kulturen, die zuvor granulär wachsend erschienen, können in der Subkultur zu wattigem Wachstum übergehen.

Mikrokonidien wurden in fast allen Proben beobachtet, die vorherrschende Form waren hier rundliche Mikrokonidien. Vereinzelt konnten auch querovale (in der Literatur oft als „clavate“ bezeichnet) Mikrokonidien beobachtet werden, jedoch traten diese nur bei *T. interdigitale* mit wattiger Oberfläche und gelber bzw. oranger Rückseite auf. Gekammerte Makrokonidien wurden insgesamt seltener (35 %) beobachtet und sind auch eher für die Gattung Epidermophyton und Microsporum typisch. Spirallyphen, früher das Hauptmerkmal von *T. mentagrophytes*, konnten in den meisten *T. interdigitale*-Stämmen und in acht von 11 *A. benhamiae*-Stämmen gefunden werden. Dies ist insofern besonders, als dass das Vorkommen von Spirallyphen bei *A. benhamiae* eher selten beschrieben wird.

4.3 Klinische Relevanz

Erstmals konnte auf molekulargenetischer Ebene gezeigt werden, dass unterschiedliche Krankheitsbilder (Tinea pedis/Onychomykose und Tinea corporis) von ökologisch unterschiedlichen Erregern, nämlich zoophilen und anthropophilen Stämmen, ausgelöst werden. Über 2/3 aller

Tinea corporis Isolate gehörten der zoophilen Spezies von *T. interdigitale* an. Nur ein *T. interdigitale* Typ III-Isolat wurde jeweils von Tinea pedis bzw. Onychomykose isoliert. Für die anthropophilen *T. interdigitale*-Isolate wurde Ähnliches gefunden, ihr Wirkungskreis beschränkt sich hauptsächlich auf Tinea pedis und Onychomykose. Nur fünf der 49 anthropophilen Stämme (10,2 %) wurden aus Tinea corporis isoliert. Dies zeigt, dass eine gewisse Wirtsspezifität innerhalb der Spezies *T. interdigitale* vorhanden ist.

In Tierversuchen wurde dies schon früher von Georg et al. [16] vermutet. Hier wurde beschrieben, dass die wattige Variante von *T. mentagrophytes* weniger virulent ist, als jene mit granulärem Koloniewachstum. Dies lässt sich nun in sofern bestätigen, als dass die anthropophilen Stämme in ihrer Kultur weitaus weniger häufig sporulieren und somit wattiges Koloniewachstum zeigen, als die zoophilen Stämme, die meist gut sporulieren und dadurch granulär wachsen. So ist es auch nicht verwunderlich, dass Infektionen mit anthropophilen Erregern zumeist einen viel milderen Krankheitsverlauf nehmen als Infektionen mit zoophilen Erregern, die oft eine inflammatorische und heftige Dermatomykose auslösen können [59]

Als zoophile *T. interdigitale*-Stämme, die primär von Tieren stammten wurden erstaunlicherweise sieben von acht Stämmen von Katzen isoliert. Dies ist in insofern besonders, als dass Katzen eher mit Infektionen durch *M. canis* in Verbindung gebracht werden. Ebenso haben Drouot et al. [11] eine hohe Frequenz zoophiler *T. interdigitale*-Stämme bei infizierten Katzen (europäische Kurzhaarkatzen), die in der Natur auf die Jagd gehen festgestellt. Demgegenüber steht eine geringe Frequenz dieser Erreger bei Katzen die ausschließlich im Haus bzw. in der Wohnung gehalten werden. Leider waren wir nicht in der Lage zu eruieren, ob bei den an Tinea corporis erkrankten Personen ein Kontakt mit infizierten Haustieren vorangegangen war. Betrachtet man die Ergebnisse dieser Arbeit, erscheint dieses Szenario jedoch sehr wahrscheinlich, denn besonders bei Kindern, die zu Hause engen Kontakt mit Tieren haben, werden Infektion mit denselben Erregern beobachtet, die auch Haustiere, wie Meerschweinchen, Kaninchen und Katzen, befallen [1, 59].

Für die Diagnostik ist neu, dass zoophile und anthropophile Isolate von *T. interdigitale* nun leicht durch Sequenzvergleich voneinander zu unterscheiden sind. Sie lassen sich durch zwei Signaturpolymorphismen im ITS-1 Bereich sicher differenzieren. Diese Polymorphismen sind nicht nur in zoophilen *T. interdigitale*-Stämmen zu finden, sondern lassen sich u.a. auch in anderen als primär zoophil beschriebenen Spezies, wie *A. benhamiae* und *T. mentagrophytes* ss. *str.* Innerhalb der beiden Gruppen (zoophil, anthropophil) lässt sich noch weiter diffe-

renzieren. Diese Differenzierungen sind für die Therapie allerdings nicht weiter von Bedeutung.

4.4 Ausblick

Die phylogenetischen Gegebenheiten innerhalb des Komplexes *T. mentagrophytes ss. lato*, insbesondere der Spezies *T. interdigitale* und *A. benhamiae*, sind erstmals mit einer großen Anzahl Stämme untersucht worden und haben gerade für *A. benhamiae* zu einem besseren Verständnis der Verwandtschaftsgrade der einzelnen Stämme und Gruppen untereinander geführt. Für den klinischen Mykologen mögen manche Erkenntnisse – die Phylogenie von *A. benhamiae* beispielsweise – nur eine untergeordnete Rolle spielen.

Die Entdeckung der Polymorphismen zur molekularen Diagnostik von zoophilen und anthropophilen *T. interdigitale*-Isolaten werden jedoch im zukünftigen klinischen Alltag eine größere Rolle spielen, da die Infektionen schon zu Beginn der Therapie adäquat medikamentös behandelt werden könnten. Das Problem dieser Situation besteht aber dennoch darin, dass viele mikrobiologische Labore nicht die Ressourcen zur molekulargenetischen Diagnostik von Dermatophyten haben, wie sie im Konsiliarlabor für Dermatophyten der Charité Universitätsmedizin Berlin vorhanden sind. In solchen Fällen müsste dafür Sorge getragen werden, dass ein Teil der eingegangenen klinischen Proben (Nagel, Hautgeschabsel etc.) sofort an ein Labor verschickt wird, in dem entsprechende Methoden zur Verfügung stehen. Oftmals wird erst nach Ausschöpfung der eigenen (konventionellen) Ressourcen der Schritt zur molekulargenetischen Diagnostik in Erwägung gezogen. Zu diesem Zeitpunkt sind jedoch häufig bereits mehrere Tage oder gar Wochen vergangen, in denen eine inadäquate Therapie appliziert worden ist.

Studien der vergangenen Jahre haben gezeigt, dass einzelne Dermatophytenspezies einem Wandel unterliegen, z.B. Änderung des Wirtsspektrums [50, 24], Resistenzentwicklung gegen Antimykotika [18, 26, 42] etc. Aus diesem Grund ist es wichtig, die weitere Entwicklung im Auge zu behalten. Bei klinisch relevanteren Pilzen wie *Candida albicans* ist dies von noch größerer Bedeutung als bei den weniger virulenten Dermatophyten. Hier wurde im letzten Jahrzehnt eine starke Resistenzentwicklung gegenüber Azol-Antimykotika, die bis dato die *first-line*-Therapie bei systemischen Mykosen mit *Candida albicans* sind. Auch bei Dermatophyten, insbesondere bei zoophilem *T. interdigitale*, ist diese Tendenz beobachtet

worden.

Falsche Therapieschemata fördern, ähnlich wie bei der Entwicklung bakterieller Resistenzmechanismen, die Ausbildung von Resistenzen gegenüber Antimykotika [42]. Dazu kommt noch, dass einige Azol-Antimykotika auch in der Landwirtschaft zur Pilzprophylaxe und -bekämpfung eingesetzt werden. Auch dies fördert eine zunehmend verstärkte Resistenzlage gegenüber dieser Antimykotikagruppe [3].

Literaturverzeichnis

- [1] BECK, W. ; CLARK, H. H.: Zoophile Dermatophyten als Epizoonoseerreger und ihre Bedeutung in der Dermatologie. In: *Der Hautarzt* 49 (1998), Nr. 6, S. 457–461
- [2] BEIFUSS, B. ; BORELLI, C. ; KORTING, H. : Mykologisches Labor. In: *Der Hautarzt* 57 (2006), Nr. 6, S. 487–492
- [3] BGVV: *Problematik der Entwicklung von Resistenzen humaner Mykosen gegenüber Azol-Antimykotika und eventueller Wechselwirkungen mit den als Fungizid eingesetzten Pflanzenschutzmitteln - Bericht des Bundesinstituts für Verbraucherschutz und Veterinärmedizin vom 7.6.2001.* http://www.bfr.bund.de/cm/218/problematik_der_entwicklung_von_resistenzen_humaner_mykosen_gegenueber_azol_antimykotika.pdf
- [4] BÖHLEN, L. ; ROOIJEN, M. van ; BRAATHEN, L. : Übersicht über die Häufigkeit, Bedeutung, Klinik und Behandlung der Tinea pedis. In: *Schweiz Med Forum* 35 (2001), S. 875–879
- [5] BLANK, F. : Favus of mice. In: *Can J Microbiol* 3 (1957), Nr. 6, S. 885–96
- [6] BONIFAZ, A. ; ARCHER-DUBON, C. ; SAÚL, A. : Tinea imbricata or Tokelau. In: *Int J Dermatol* 43 (2004), Jul, Nr. 7, S. 506–510
- [7] BRASCH, J. : Dermatophytenspezies. In: *Der Hautarzt* 59 (2008), Nr. 12, S. 971–979
- [8] CAS, E. D. ; VERNES, A. : Parasitic adaptation of pathogenic fungi to mammalian hosts. In: *Crit Rev Microbiol* 13 (1986), Nr. 2, S. 173–218
- [9] CHERMETTE, R. ; FERREIRO, L. ; GUILLOT, J. : Dermatophytoses in animals. In: *Mycopathologia* 166 (2008), Nr. 5-6, S. 385–405

- [10] CRISSEY, J. T. ; LANG, H. ; PARISH, L. C.: *Manual of medical mycology*. Cambridge, Mass., USA : Blackwell Science, 1995
- [11] DROUOT, S. ; MIGNON, B. ; FRATTI, M. ; ROOSJE, P. ; MONOD, M. : Pets as the main source of two zoonotic species of the Trichophyton mentagrophytes complex in Switzerland, *Arthroderma vanbreuseghemii* and *Arthroderma benhamiae*. In: *Vet Dermatol* 20 (2009), Feb, Nr. 1, S. 13–18
- [12] 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. In: *Br J Dermatol* (2009), Apr
- [13] FACHIN, A. L. ; FERREIRA-NOZAWA, M. S. ; MACCHERONI, W. ; MARTINEZ-ROSSI, N. M.: Role of the ABC transporter TruMDR2 in terbinafine, 4-nitroquinoline N-oxide and ethidium bromide susceptibility in *Trichophyton rubrum*. In: *J Med Microbiol* 55 (2006), Aug, Nr. Pt 8, S. 1093–1099
- [14] FREALLE, E. ; RODRIGUE, M. ; GANTOIS, N. ; ALIOUAT, C. M. ; DELAPORTE, E. ; CAMUS, D. ; DEI-CAS, E. ; KAUFFMANN-LACROIX, C. ; GUILLOT, J. ; DELHAES, L. : Phylogenetic analysis of *Trichophyton mentagrophytes* human and animal isolates based on MnSOD and ITS sequence comparison. In: *Microbiology* 153 (2007), Nr. Pt 10, S. 3466–77
- [15] FUMEAUX, J. ; MOCK, M. ; NINET, B. ; JAN, I. ; BONTEMS, O. ; LECHENNE, B. ; LEW, D. ; PANIZZON, R. G. ; JOUSSON, O. ; MONOD, M. : First report of *Arthroderma benhamiae* in Switzerland. In: *Dermatology* 208 (2004), Nr. 3, S. 244–50
- [16] GEORG, L. K.: The relationship between the downy and granular forms of *Trichophyton mentagrophytes*. In: *J Invest Dermatol* 23 (1954), Nr. 2, S. 123–41
- [17] GEORG, L. K. ; MAECHLING, E. H.: *Trichophyton mentagrophytes*, variety nodular, a mutant with brilliant orange-red pigment isolated in nine cases of ringworm of the skin and nails. In: *J Invest Dermatol* 13 (1949), Nr. 6, S. 339–50, illust
- [18] GOH, C. L. ; TAY, Y. K. ; ALI, K. B. ; KOH, M. T. ; SEOW, C. S.: In vitro evaluation of griseofulvin, ketoconazole, and itraconazole against various dermatophytes in Singapore. In: *Int J Dermatol* 33 (1994), Oct, Nr. 10, S. 733–737

- [19] GRÄSER, Y. ; EL FARI, M. ; VILGALYS, R. ; KUIJPERS, A. F. ; DE HOOG, G. S. ; PRESBER, W. ; TIETZ, H. : Phylogeny and taxonomy of the family Arthrodermataceae (dermatophytes) using sequence analysis of the ribosomal ITS region. In: *Med Mycol* 37 (1999), Nr. 2, S. 105–14
- [20] GRÄSER, Y. ; FARI, M. el ; PRESBER, W. ; STERRY, W. ; TIETZ, H. J.: Identification of common dermatophytes (Trichophyton, Microsporum, Epidermophyton) using polymerase chain reactions. In: *Br J Dermatol* 138 (1998), Nr. 4, S. 576–82
- [21] GRÄSER, Y. ; HOOG, S. D. ; SUMMERBELL, R. C.: Dermatophytes: recognizing species of clonal fungi. In: *Med Mycol* 44 (2006), May, Nr. 3, S. 199–209
- [22] GRÄSER, Y. ; KUIJPERS, A. F. ; EL FARI, M. ; PRESBER, W. ; HOOG, G. S.: Molecular and conventional taxonomy of the *Microsporum canis* complex. In: *Med Mycol* 38 (2000), Nr. 2, S. 143–53
- [23] GRÄSER, Y. ; KUIJPERS, A. F. ; PRESBER, W. ; DE HOOG, G. S.: Molecular taxonomy of *Trichophyton mentagrophytes* and *T. tonsurans*. In: *Med Mycol* 37 (1999), Nr. 5, S. 315–30
- [24] GRÄSER, Y. ; SCOTT, J. ; SUMMERBELL, R. : The new species concept in dermatophytes—a polyphasic approach. In: *Mycopathologia* 166 (2008), Nr. 5-6, S. 239–256
- [25] GUPTA, A. K. ; EINARSON, T. R. ; SUMMERBELL, R. C. ; SHEAR, N. H.: An overview of topical antifungal therapy in dermatomycoses. A North American perspective. In: *Drugs* 55 (1998), May, Nr. 5, S. 645–674
- [26] GUPTA, A. K. ; TOMAS, E. : New antifungal agents. In: *Dermatol Clin* 21 (2003), Jul, Nr. 3, S. 565–576
- [27] HALL, T. : Bio Edit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. In: *Nucleic Acids Res* 41 (1999), S. 95–98
- [28] HANTSCHKE, D. : [Morphology and biology of *Trichophyton mentagrophytes* (Robin) Blanchard var *goetzii* var. nova]. In: *Mykosen* 12 (1969), Nr. 2, S. 97–104
- [29] HOOG, G. S. ; ENDE, A. H. d.: Molecular diagnostics of clinical strains of filamentous Basidiomycetes. In: *Mycoses* 41 (1998), Nr. 5-6, S. 183–9

- [30] HUGHES, A. D. ; LORUSSO, G. D. ; GREER, D. L.: The 'double-layer tape prep': an improvement to a standard technique. In: *J Med Microbiol* 53 (2004), Nr. Pt 5, S. 455
- [31] JACKSON, C. J. ; BARTON, R. C. ; EVANS, E. G.: Species identification and strain differentiation of dermatophyte fungi by analysis of ribosomal-DNA intergenic spacer regions. In: *J Clin Microbiol* 37 (1999), Nr. 4, S. 931–6
- [32] JACKSON, C. J. ; MOCHIZUKI, T. ; BARTON, R. C.: PCR fingerprinting of *Trichophyton mentagrophytes* var. *interdigitale* using polymorphic subrepeat loci in the rDNA nontranscribed spacer. In: *J Med Microbiol* 55 (2006), Nr. Pt 10, S. 1349–55
- [33] 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. In: *J Dermatol Sci* 34 (2004), Feb, Nr. 1, S. 35–48
- [34] KANE, J. : *Laboratory handbook of dermatophytes : a clinical guide and laboratory handbook of dermatophytes and other filamentous fungi from skin, hair, and nails.* Belmont, CA : Star Pub, 1997
- [35] KANO, R. ; OKABAYASHI, K. ; NAKAMURA, Y. ; OOKA, S. ; KASHIMA, M. ; MIZOGUCHI, M. ; WATANABE, S. ; HASEGAWA, A. : Differences among chitin synthase I gene sequences in *Trichophyton rubrum* and *T. violaceum*. In: *Med Mycol* 38 (2000), Feb, Nr. 1, S. 47–50
- [36] KAWAI, M. : [Diagnosis of dermatophytoses: conventional methods and recent molecular biological methods]. In: *Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi* 44 (2003), Nr. 4, S. 261–264
- [37] KAWASAKI, M. ; ANZAWA, K. ; MOCHIZUKI, T. ; ISHIZAKI, H. ; HEMASHETTAR, B. M.: Successful mating of a human isolate of *Arthroderma simii* with a tester strain of *A. vanbreuseghemii*. In: *Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi* 50 (2009), Nr. 1, S. 15–18
- [38] KORTING, H. C. ; OLLERT, M. ; ABECK, D. : Results of German multicenter study of antimicrobial susceptibilities of *Trichophyton rubrum* and *Trichophyton mentagrophytes* strains causing tinea unguium. German Collaborative Dermatophyte Drug Susceptibility Study Group. In: *Antimicrob. Agents Chemother.* 39 (1995), Nr. 5, S. 1206–1208
- [39] LEBASQUE, J. : Les champignons des Teignes du Cheval et des Bovidés. (1933), S. 55

- [40] LI, H. C. ; BOUCHARA, J. P. ; HSU, M. M. ; BARTON, R. ; SU, S. ; CHANG, T. C.: Identification of dermatophytes by sequence analysis of the rRNA gene internal transcribed spacer regions. In: *J Med Microbiol* 57 (2008), Nr. Pt 5, S. 592–600
- [41] LÓPEZ, N. C. ; CASAS, C. ; SOPO, L. ; ROJAS, A. ; PORTILLO, P. D. ; GARCÍA, M. C. C. ; RESTREPO, S. : Fusarium species detected in onychomycosis in Colombia. In: *Mycoses* (2008), Sep
- [42] MARTINEZ-ROSSI, N. M. ; PERES, N. T. A. ; ROSSI, A. : Antifungal resistance mechanisms in dermatophytes. In: *Mycopathologia* 166 (2008), Nr. 5-6, S. 369–383
- [43] MÜGGE, C. ; HAUSTEIN, U.-F. ; NENOFF, P. : [Causative agents of onychomycosis—a retrospective study]. In: *J Dtsch Dermatol Ges* 4 (2006), Mar, Nr. 3, S. 218–228
- [44] NENOFF, P. ; HERRMANN, J. ; GRASER, Y. : Trichophyton mentagrophytes sive interdigitale? A dermatophyte in the course of time. In: *J Dtsch Dermatol Ges* 5 (2007), Nr. 3, S. 198–202
- [45] NINET, B. ; JAN, I. ; BONTEMS, O. ; LECHENNE, B. ; JOUSSON, O. ; PANIZZON, R. ; LEW, D. ; MONOD, M. : Identification of dermatophyte species by 28S ribosomal DNA sequencing with a commercial kit. In: *J Clin Microbiol* 41 (2003), Nr. 2, S. 826–30
- [46] NISHIO, K. ; KAWASAKI, M. ; ISHIZAKI, H. : Phylogeny of the genera Trichophyton using mitochondrial DNA analysis. In: *Mycopathologia* 117 (1992), Nr. 3, S. 127–132
- [47] OSBORNE, C. S. ; LEITNER, I. ; FAVRE, B. ; RYDER, N. S.: Amino acid substitution in Trichophyton rubrum squalene epoxidase associated with resistance to terbinafine. In: *Antimicrob Agents Chemother* 49 (2005), Jul, Nr. 7, S. 2840–2844
- [48] PETRA BECKHEINRICH, M. R. . U.-F. H. P. Nenoff N. P. Nenoff: Tinea corporis und Kerion Celsi des Mons pubis durch Trichophyton mentagrophytes. In: *Akt Dermatol* 27 (2001), S. 37–41
- [49] PRIESTLEY: Ringworm and allied parasitic skin-diseases in Australia. In: *Med. J. Australia* 2 (1917), S. 471–475
- [50] PROBST, S. ; DE HOOG, G. S. ; GRASER, Y. : Development of DNA markers to explore host shifts in dermatophytes. In: *Stud. Mycol.* 47 (2002), S. 57–74

- [51] SEEBACHER, C. ; BOUCHARA, J.-P. ; MIGNON, B. : Updates on the epidemiology of dermatophyte infections. In: *Mycopathologia* 166 (2008), Nr. 5-6, S. 335–352
- [52] SHARMA, R. ; RAJAK, R. C. ; PANDEY, A. K. ; GRASER, Y. : Internal Transcribed Spacer (ITS) of rDNA of appendaged and non-appendaged strains of *Microsporum gypseum* reveals *Microsporum appendiculatum* as its synonym. In: *Antonie Van Leeuwenhoek* 89 (2006), Nr. 1, S. 197–202
- [53] SMITH, J. M. ; MARPLES, M. J.: *Trichophyton mentagrophytes* var. *erinacei*. In: *Sabouraudia* 3 (1963), Nr. 1, S. 1–10
- [54] SUMMERBELL, R. : Form and function in the evolution of dermatophytes. In: Kushawa RKS, Guarro J, editors. *Biology of dermatophytes and other keatinophilic fungi*. In: *Revista Iberoamericana de Micología* 17 (2000), S. Suppl: 30–43
- [55] TAKAHASHI, Y. ; SANO, A. ; TAKIZAWA, K. ; FUKUSHIMA, K. ; MIYAJI, M. ; NISHIMURA, K. : The epidemiology and mating behavior of *Arthroderma benhamiae* var. *erinacei* in household four-toed hedgehogs (*Atelerix albiventris*) in Japan. In: *Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi* 44 (2003), Nr. 1, S. 31–8
- [56] TAKASHIO, M. : Taxonomy of dermatophytes based on their sexual states. In: *Mycologia* 71 (1979), Nr. 5, S. 968–76
- [57] TAMURA, K. ; DUDLEY, J. ; NEI, M. ; KUMAR, S. : MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. In: *Mol Biol Evol* 24 (2007), Nr. 8, S. 1596–9
- [58] THOMPSON, J. D. ; HIGGINS, D. G. ; GIBSON, T. J.: CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. In: *Nucleic Acids Res* 22 (1994), Nr. 22, S. 4673–80
- [59] TIETZ, H. J.: [Current treatment recommendations in tinea corporis?]. In: *Med Monats-schr Pharm* 29 (2006), Nr. 7, S. 264–5
- [60] TIETZ, H.-J. ; STERRY, W. : *Antimykotika von A-Z*. 3. überarbeitete Auflage. Georg Thieme Verlag, 2004. – 121–134 S.

- [61] VANBREUSEGHEM, R. ; VROEY, C. D.: Three round tables of mycological importance.
In: *Ann Soc Belg Méd Trop.* 54 (1974), S. 129–40
- [62] WEINSTEIN, A. ; BERMAN, B. : Topical treatment of common superficial tinea infections.
In: *Am Fam Physician* 65 (2002), Nr. 10, S. 2095–102
- [63] WEITZMAN, I. ; SUMMERBELL, R. C.: The dermatophytes. In: *Clin Microbiol Rev* 8
(1995), Nr. 2, S. 240–59

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Selbständigkeitserklärung

„Ich, Stefan Heidemann, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: ‚DNA-Polymorphismen der *internal transcribed spacer*-Region zur Differenzierung anthropophiler und zoophiler Spezies von *Trichophyton mentagrophytes sensu lato*‘ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

9. Februar 2010

Unterschrift

Publikationsliste

HEIDEMANN, S.; MONOD, M.; GRÄSER, Y. : Signature polymorphisms in the internal transcribed spacer region relevant for the differentiation of zoophilic an anthropophilic strains of *Trichophyton interdigitale* and other species of *T. mentagrophytes sensu lato*. In: *Br J Dermatol* 162 (2010), Nr. 2, S. 282–295