

TAXONOMY OF DERMATOPHYTES – THE CLASSIFICATION SYSTEMS MAY CHANGE BUT THE IDENTIFICATION PROBLEMS REMAIN THE SAME

Sebastian Gnat^{1,*}, Aneta Nowakiewicz¹, Przemysław Zięba²

¹ University of Life Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Institute of Biological Bases of Animal Diseases, Sub-Department of Veterinary Microbiology, Akademicka 12, 20-033 Lublin, Poland

² State Veterinary Laboratory, Słowicza 2, 20-336 Lublin, Poland

Received in August, accepted in November 2018

Abstract: Fungal infections of the skin, hair, and nails are the most prevalent among all fungal infections, currently affecting over 20–25% of the world's human and animal populations. Dermatophytes are the etiological factors of the most superficial fungal infections. Among other pathogenic filamentous fungi, what distinguishes them is their unique attribute to degrade keratin. The remarkable ability of this group of fungi to survive in different ecosystems results from their morphological and ecological diversity as well as high adaptability to changing environmental conditions. Dermatophytes, although they are one of the oldest groups of microorganisms recognised as pathogens, have not been classified in a stable taxonomic system for a long time. In terms of diagnostics, dermatophytes still pose a serious problem in the identification procedure, which is often related to therapeutic errors. The increasing number of infections (including zoonoses), the lack of taxonomic stability, and the ambiguous clinical picture of dermatomycosis cases necessitate the search for new methods for the rapid, cheap, and reproducible species identification of these fungi. In turn, the species identification is determined by the clarity of classification criteria combined with the taxonomic division generally accepted by microbiologists and referring to the views expressed by clinicians, epidemiologists, and scientists. In this paper, the authors present the evolution of taxonomic systems for dermatophytes over the history of microbiology development. The discovery of new facts about the biology and ecology of dermatophytes and the development of techniques applied in a mycological diagnosis laboratory facilitated the development of new identification strategies at various points in the history. The modern molecular classification system of these pathogens seems to be stable and widely accepted. However, will it end the long-standing classification confusion and the period of hundreds of nomenclatural changes, which are a diagnostician's nightmare? It can be argued that the taxonomy of dermatophytes, in particular that of anthropophilic species, is sufficiently established and stable for the benefit of both clinicians and scientists.

1. Introduction. 2. First dermatophyte classification systems. 3. Phenotypic classification systems. 4. "Biological" era in the classification. 5. Ecological division of dermatophytes. 6. Molecular revolution in the taxonomy of dermatophytes. 7. Taxonomic problems in mycology. 8. Clinical aspect of the taxonomy of dermatophytes. 9. Current classification system. 10. Indistinguishable «species complexes». 11. Summary

TAKSONOMIA DERMATOFITÓW – SYSTEMY KLASYFIKACYJNE SIĘ ZMIENIAJĄ, PROBLEMY IDENTYFIKACYJNE POZOSTAJĄ TE SAME

Streszczenie: Infekcje grzybicze skóry, włosów i paznokci cechuje najwyższa prevalencja wśród wszystkich grzybic dotykając obecnie ponad 20–25% populacji ludzi i zwierząt na świecie. Czynniki etiologiczne większości grzybiczych infekcji powierzchniowych są dermatofity. Spośród innych patogennych grzybów strzępkowych wyróżnia je unikalna właściwość rozkładu keratyny. Ogromna zdolność przetrwania w różnych ekosystemach grzybów tej grupy wynika z ich różnorodności morfologicznej, ekologicznej, jak również możliwości adaptacji do zmieniających się warunków środowiska. Dermatofity chociaż stanowią jedną z najstarszych grup mikroorganizmów długo nie doczekały się stabilnego systemu taksonomicznego. Co najważniejsze z klinicznego punktu widzenia, dermatofity wciąż przysparzają problemów diagnostycznych, co skutkuje błędami terapeutycznymi. Rosnąca liczba zakażeń, w tym również odzwierzęcych, brak stabilności taksonomicznej i niejednoznaczny obraz kliniczny niektórych przypadków dermatomikoz powodują konieczność poszukiwania nowych metod szybkiej, taniej i powtarzalnej identyfikacji gatunkowej tych grzybów. Z kolei identyfikacja gatunkowa determinowana jest jasnością kryteriów klasyfikacyjnych uwzględniających poglądy klinicystów, epidemiologów i mykologów. W niniejszej pracy Autorzy przedstawiają ewolucję systemów taksonomicznych dermatofitów na przestrzeni dziejów rozwoju mikrobiologii. Odkrywanie nowych faktów z zakresu biologii i ekologii dermatofitów, jak również rozwój technik możliwych do zastosowania w laboratorium diagnostyki mykologicznej skutkowało opracowaniem nowych strategii identyfikacyjnych. Współczesny system klasyfikacyjny tych patogenów oparty na badaniach molekularnych wydaje się być stabilny i szeroko akceptowany, czy jednak zakończy wiekowe zamieszanie klasyfikacyjne i okres setek zmian nomenklaturowych, będących koszmarem diagnostów? Można wnioskować, że taksonomia dermatofitów, zwłaszcza gatunków antropofilnych, jest już wystarczająco dojrzała, aby ustabilizować się z korzyścią zarówno dla klinicystów, jak i naukowców.

1. Wprowadzenie. 2. Pierwsze systemy klasyfikacji dermatofitów. 3. Fenotypowe systemy klasyfikacyjne. 4. „Biologiczna” era w klasyfikacji. 5. Ekologiczny podział dermatofitów. 6. Molekularna rewolucja w taksonomii dermatofitów. 7. Problemy taksonomiczne w mykologii. 8. Kliniczny aspekt taksonomii dermatofitów. 9. Obecnie obowiązujący system klasyfikacyjny. 10. Nierozróżnialne „kompleksy gatunków”. 11. Podsumowanie

Key words: dermatophytes, taxonomy, identification methods, classification system, nomenclature

Słowa kluczowe: dermatofity, taksonomia, metody identyfikacji, system klasyfikacyjny, nomenklatura

* Corresponding author: dr Sebastian Gnat, University of Life Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Institute of Biological Bases of Animal Diseases, Sub-Department of Veterinary Microbiology, 12 Akademicka Street, 20-033 Lublin, Poland; phone: 81 4456093; e-mail: sebastian.gnat@up.lublin.pl

1. Introduction

Fungal infections of skin, hair and nails are the largest and most widespread group of all mycoses. The incidence of superficial fungal infections has increased to such a level in recent decades that skin mycoses currently affect more than 20–25% of the world’s population, which is why they are among the most common fungal infections [4, 16, 17, 27, 45]. The etiological factors of most mycotic superficial infections are dermatophytes [7, 11, 12, 22, 46, 60, 65, 66].

Although the term “dermatophyte” is widely used, there is no common definition which is acceptable for microbiologists. Its use is rather intentional in character, employed to describe species of pathogenic fungi capable of degrading keratin [28, 37, 65]. Howard et al. [28] describe dermatophytes as a large group of closely related keratinophilic fungi of the genus *Epidermophyton* (Sabour. 1907), *Microsporum* (Fat 1843) and *Trichophyton* (Malmsten 1848), which cause infections of skin, hair, nails and other products of the epidermis and dermis. All dermatophyte species belong to the *Arthrodermataceae* family (Locq. Ex Currah 1985) and the order *Onygenales* (Cif. Ex Benny and Kimbr. 1980). Within a definition drawn in such a way, doubts are raised when terming dermatophytes and saprophytic species of these types as non-pathogenic, e.g. *Epidermophyton stockdaleae* (Prochacki and Eng.-Zas. 1974), *Microsporum boullardi* (Dominik and Majchr. 1965), *Trichophyton ajelloi* (Ajello 1968), *T. terrestre* (Durie and D. Frey 1957). The term “dermatophytoids” [32, 34] was proposed in order to distinguish these non-pathogenic species from the pathogens proper and to indicate their biological connection at the same time.

2. First dermatophyte classification systems

Dermatophytes were described as one of the first microorganisms being pathogenic agents of the then observed skin lesions in humans and animals [34].

Taxonomic studies of these fungi were initiated in 1841 by Robert Remak and David Gruby [26]. The five main species of dermatophytes recognised today as epidemiologically the most important ones, namely *Microsporum audouinii* (Gruby 1843), *Epidermophyton floccosum* (Langeron and Miloch. 1930), *Trichophyton schoenleinii* (Langeron and Miloch. Ex Nann. 1934), *T. tonsurans* (Malmsten 1848) and *T. mentagrophytes* (Sabour. 1895) were described over the period of 1841–1875 [51]. It is worth mentioning that the first classification of dermatophytes was compiled several decades before Louis Pasteur developed the method of obtaining pure cultures, which indicates how significant the observation of dermatomycosis in those days was [51]. *Trichophyton rubrum* is the only known dermatophyte, which is missing from the list of R. Remak and D. Gruby (Sabour, 1911) and was only classified in the twentieth century [49].

Breeding and description of pure dermatophyte cultures helped mycology enter a period comparable to the Renaissance. Newly classified dermatophytes were determined on the basis of combined observations of different clinical changes of the ringworm caused by various ecological groups of dermatophytes and descriptions of the morphology of colonies performed *in vitro* [50]. Using Sabouraud’s methodology as a standard [50], in 1870–1920, further sixteen species of dermatophytes were identified, mainly associated with human infections. Applying the same methodological standard to the classification of dermatophytes led to an increase in the number of descriptions of new species and nomenclature confusion in the following decades. The general concept of determining membership in the dermatophyte group was disturbed and taxonomic rules became inconsistent, resulting in multiple changes in the nomenclature. In 1950 this brought about 350 changes in species names (Fig. 1) [12]. Classification rules for dermatophytes and consistent nomenclature of anamorphs were established only after extensive consultations in the community of mycologists, and the genera *Epi-*

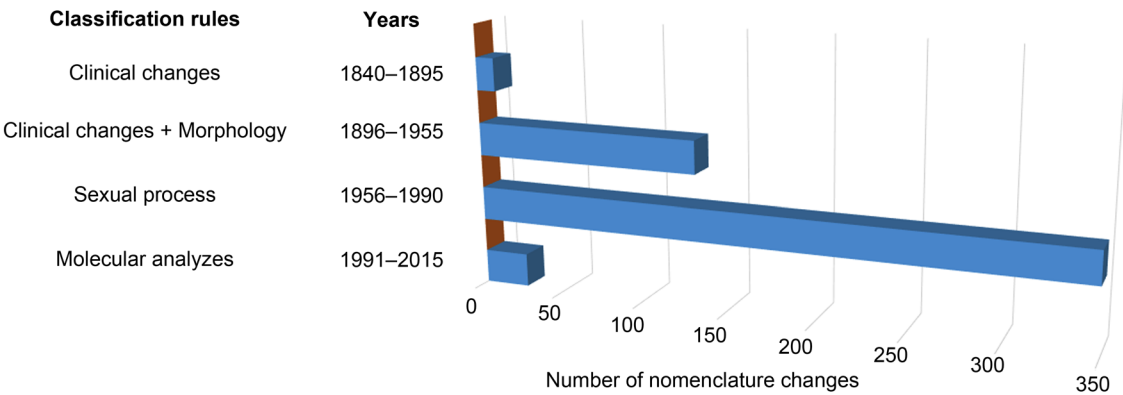


Fig. 1. Number of nomenclature changes of dermatophyte species with the criterion of classification and development period of taxonomy.

dermophyton, *Microsporum* and *Trichophyton* became taxa gathering all previously known species of dermatophytes [11, 12, 60].

3. Phenotypic classification systems

Pasteur's method of obtaining pure cultures was quickly implemented in mycology and taxonomy of dermatophytes [51]. The morphology of a single fungal colony constituted good diagnostic parameters in combination with its microscopic image [11]. Doubts about the possibility of using descriptions of macro and micromorphologies of pure cultures in the identification of dermatophytes appeared only during the tests of the repeatability of these traits [22, 34, 60]. It was proven that isolates derived directly from clinical changes feature characteristic morphology, which is diagnostically useful. At the same time this morphology changes as a result of culture passaging [11, 12, 18]. The standardisation of reference strains was therefore difficult, which in turn led to the introduction of numerous taxa, which, however, are now considered synonymous with the previously described species [12, 64]. At present, only with historical significance, at least twenty different synonymous species names can be indicated for *T. mentagrophytes*, six *T. verrucosum* (E. Bodin 1902) and three for *M. canis* and *E. floccosum*. Additionally, various types of morphological variations have been described as separate taxa, e.g. *Keratinomyces longifusus* (Flórián and Galgoczy 1964), which is actually *Microsporum fulvum* (Uriburu 1909) characterised by strongly coherent conidia [41].

Incorrect classification was therefore an unavoidable consequence of a diagnostic system based solely on the phenotype [16, 17, 22, 66]. Moreover, there are at least a few species of dermatophytes which do not show sporulation at all or sporulate very poorly in *in vitro* culture. Such species can certainly include *Trichophyton concentricum* (R. Blanch. 1895) and *T. schoenleinii* (Langeron and Miloch. Ex Nann. 1934), which due to the lack of specific phenotypic traits in *in vitro* cultures are often identified based on the characteristic image and location of clinical changes [12, 29].

In the last decades of the twentieth century, it became evident that species-based identification based on morphology has its limitations and cannot be further used. That is why Weitzman et al. [59] introduced an additional set of physiological tests to the diagnosis of dermatophytes. The use of so-called "*Trichophyton-agar*" allowed one to demonstrate the variation in the ability of individual strains to assimilate the vitamin panel. In addition, the ability to grow at different temperatures and the ability to liquefy gelatine resulted in the introduction of additional criteria in the differen-

tiation of isolates. The new "conventional approach" applied in the description of dermatophyte species was a combination of the clinical picture of infection, macroscopic and microscopic features of pure cultures and their physiology. The only aspect which has not been taken into consideration in this approach was strain serology, which has never really been introduced into the diagnosis of dermatophytes [11, 15, 32].

4. "Biological" era in the classification

Descriptions of teleomorphic phases of dermatophytes by Christine Dawson, Jeremy Gentles [9] and Phyllis Stockdale [52] led to the introduction of the biological concept of species into mycology. These researchers claimed that some geophilic and zoophilic dermatophytes, as well as related non-pathogenic species such as *Trichophyton terrestre* and *T. ajelloi*, reproduce in a sexual process. In order to determine the phases of the perfect (teleomorphic) fungi, the generic names *Arthroderma* (Curr. 1860) and *Nannizzia* were introduced (Stockdale 1961) [9, 11, 52, 53]. As a consequence, the number of taxa increased, and the classification and identification became complicated by the introduction of a double nomenclature for these fungi (Fig. 2). The determination of sexual types among dermatophytes began in an unusual way when Stockdale [53] discovered that in the representatives of many, seemingly unrelated, species the sexual process can be induced in the presence of the test strain *Arthroderma simii* (Stockdale, DWR Mack and Austwick 1965). Most species of dermatophytes, whose perfect (teleomorphic) stages are known, can be identified with this method. In the course of the conducted research it turned out that *Trichophyton rubrum* possesses the mating type known as (-), while a closely related species *T. megninii* (R. Blanch. 1895), currently used as a synonym of the former, is of the (+) mating type [52, 53]. Teleomorphic stages have not yet been described for only a few epidemiologically important species of dermatophytes, such as *Epidermophyton floccosum* (Langeron and Miloch. 193) and *T. soudanense* (Joyeux 1912) [11]. Summerbell [55] pointed out the obvious ecological factor linking species with unknown teleomorphic stages, namely, all of them were capable of causing infection in animals and/or humans. However, to date, no reproductive structures have been found on keratin plant or animal remains that would allow them to undergo sexual processes later on.

The knowledge of the genome sequences of many dermatophyte species allowed for determining the *loci* responsible for mating types [36]. Using partial amplification of each *locus*, Kano et al. [31] confirmed molecularly that the 22 tested strains of *T. verrucosum*

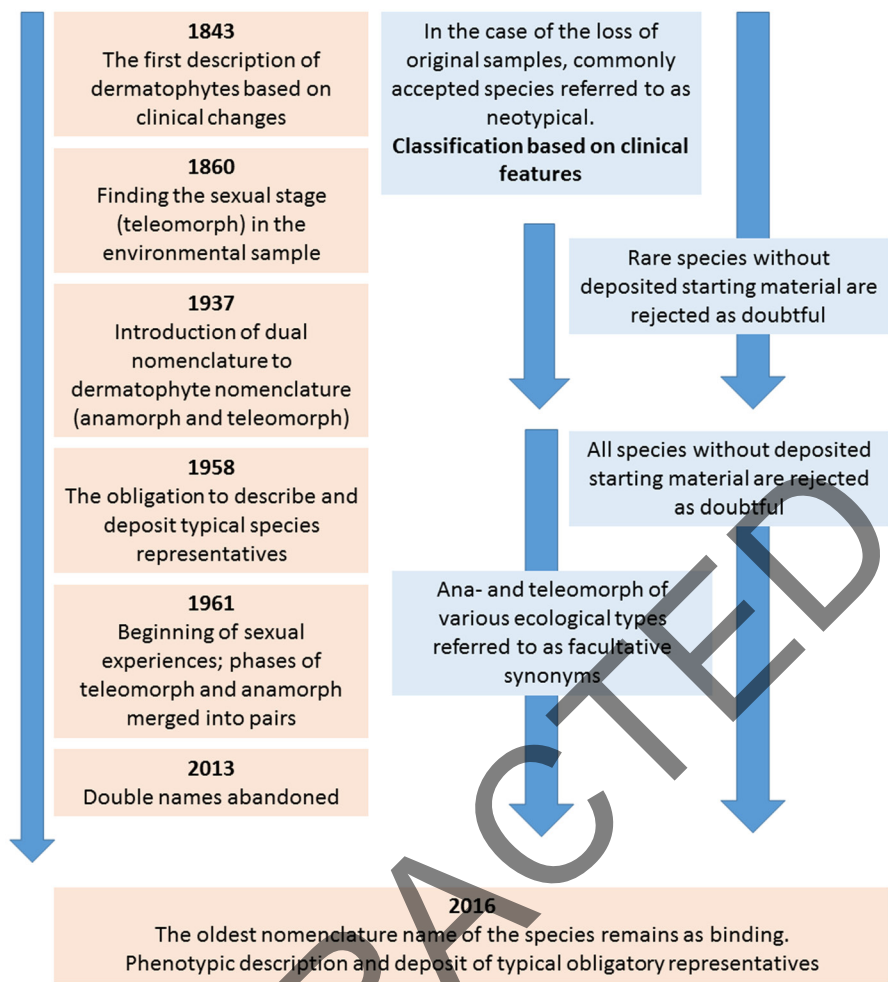


Fig. 2. Representatives of species and their importance in the history of taxonomy of dermatophytes.

exhibit only one mating type. Other scientific reports [11, 12, 25] revealed that a single mating type occurs in many species, including: *T. tonsurans* (Malmsten 1848), *T. equinum* (Geddoelst 1902), *T. interdigitale* (Priestley 1917), *T. schoenleinii* (Langeron & Miloch. Ex Nann. 1934), *T. rubrum*, *T. violaceum* (Sabour, ex E. Bodin 1902), *T. erinacei* (AA Padhye and JW Carmich. 1969), *T. concentricum*, *M. audouinii* and *M. ferrugineum* (M. Ota 1921). It corroborates the view that the dominant method of reproduction among these fungi is asexual clonal reproduction, which appeared as a consequence of losing one of the mating types (+) or (-) at the species level [12, 31, 36]. The only exception are zoophilic species, such as *T. benhamiae* (Y. Gräser and de Hoog 2016) and *T. mentagrophytes*, where both types were present, but in different proportions [56, 57]. Based on these studies, it may be inferred that clonal asexual processes are the dominant reproduction method of all anthropophilic dermatophytes and most zoophilic ones [12, 36]. The difference in the types of the propagules of asexual reproduction (conidia), dependent on the life stage of the fungus, should be emphasised [16, 19]. While developing within hair

or epidermal structures, the fungal hyphae undergo fragmentation in order to produce a number of small, persistent arthroconidia, which also constitute infectious elements [40]. In turn, the asexual reproduction of fungi *in vitro* yields a completely different generation of spores, defined by macro and microconidia [11, 16, 17, 21, 22].

Anzawa et al. [2] made some interesting observations and demonstrated the possibility of the sexual process between the highly competent *A. simii* test strain producing a fertile generation and *T. rubrum* strain. As a result of crossbreeding between these strains, ascospores were obtained, one of which turned out to be a hybrid of both crossbred strains of these two species. It seems that dermatophytes obtained an atavistic ability to exchange genetic material as a result of sexual reproduction in response to unfavourable conditions, e.g. stressful conditions of a newly settled (colonised) environment [12]. In fact, different ecological niches in the case of anthropophilic (*T. rubrum*) and zoophilic (*A. simii*) species limit the possibility of encountering strains with different ecological preferences in nature [2].

Table I
Characteristics of ecological groups of dermatophytes

Characteristic	Ecological group		
	Anthropophile	Zoophile	Geophile
Evolutionary origin	distant	intermediate	close
Sexual process	lack	possible	frequent
Infectious changes	little	moderate	severe
Source of infection	human	animals (also possible environment)	environment (mainly soil)
Treatment	chronic	easy, short	self-healing

5. Ecological division of dermatophytes

Considerable differences between the species of dermatophytes can be seen in relation to their natural habitat. Three ecological groups of dermatophytes have been described so far: anthropophilic, zoophilic and geophilic (Table I). It is often impossible to classify individual species to an ecological type due to insufficient phenotypic differences and the lack of a molecular determinant [40, 43, 44]. Anthropophilic species colonise the products of the human epidermis in a natural way, moving between hosts and causing chronic but mild infections, mainly within the *Homo sapiens* species [15, 40]. Transmission of infection to animals, albeit sporadic, is considered possible [40].

Zoophilic species live on animals, but their transfer to humans is possible and frequent. It usually takes place through reservoirs, which may be the animals themselves, their fur or objects they came into contact with [16–20, 40, 43, 44]. Zoophilic dermatophytes isolated from animals are responsible for symptomatic infections, but they are also often asymptomatic, making an animal a carrier. In this case they may become a source of epidemics [19, 20]. The natural place where geophilic dermatophytes dwell is soil, often around habitats (burrows, caves) of specific terrestrial mammals [5]. This group of fungi can be transmitted by animals mechanically on the outer coverings [5, 15, 19], imitating asymptomatic carriage, hence the difference between geophilic and zoophilic dermatophytes is not always clear. Additionally, when the transmission onto a human takes place, zoo and geophilic species cause acute mycoses with strongly expressed symptoms of inflammatory response [16, 20, 22]. Scientific evidence points to the phenomenon of high infectivity of zoophilic dermatomycoses among humans. They often lead to the formation of acute foci of infection with a distinct ring along the edge of the lesion, which indicates a strong inflammatory process [20, 54]. In turn, most of the infections caused by geophilic dermatophytes are mild and the foci are of self-limiting character [15, 54].

During the recent studies on the phylogeny of dermatophytes, an evolutionary tendency has been observed, indicating a noticeable adaptive trend, from

the oldest geophilic dermatophytes through zoophilic to anthropophilic dermatophytes. The last one on the list is considered to be the youngest evolutionarily, the least adapted to various ecological niches, and at the same time narrowly specialised for development on human skin [27, 64]. The biological explanation of this phenomenon seems to be simple. Adaptation to life in a constant host tissue environment resulted in the secondary loss of many adaptive mechanisms, which is clearly noticeable in the loss of e.g. mating types in anthropophilic species [25, 64]. However, geophilic dermatophytes, living in variable soil conditions and subjected to continuous competition from other microorganisms, show a number of adaptive features, including the capability of sexual reproduction [2, 64]. Zoophilic dermatophytes constitute the intermediate link. The animal fur coat is more difficult to control as an ecological niche for fungi than the keratinised human tissues, but it is certainly milder than the soil exposed to changing physiochemical conditions [47, 64]. It seems that the common ancestor of all dermatophytes should be sought among geophilic species [25, 63]. The characteristics of individual dermatophyte groups, presented in such a way, designate three ecological types, which have fundamentally different adaptation to the natural habitat and also have other clinical significance (Table I), even though they are not clearly phenotypically distinguishable.

6. Molecular revolution in the taxonomy of dermatophytes

In the last decade of the 20th century the use of molecular methods revolutionised the taxonomy of dermatophytes and other fungi, just as in the times of Louis Pasteur, when pure cultures revolutionised microbiology. The first molecular markers in mycology were DNA sequences encoding proteins of small and large ribosome subunit [23, 33, 39, 47, 61]. Gräser et al. [22, 24] used the ITS rDNA (Internal Transcribed Spacer ribosomal DNA) in the taxonomic studies of fungi, which allowed them to classify a significant number of species. This molecular marker was repeatedly used in later studies [10, 16–20, 25, 35, 42, 61, 63, 66], also

in combination with other ones, such as the tubulin beta gene [47, 48] or the gene of the translational factor 1 [38]. Based on these studies, it was found that the main topology of the *Arthrodermataceae* family is molecularly stable, but does not fully correspond to the morphology, because the genus *Trichophyton* appears to be polyphyletic [24, 38, 47, 48]. Phylogenetically, anthropophilic species of dermatophytes are evolutionarily the youngest ones and are limited to several closed clusters, whereas zoophilic species, especially those infecting farm animals, hold the intermediate position in terms of the evolutionary age, constituting a link that connects them with the ancestors – geophilic species [12]. The new taxonomic system formalised these differences in evolutionary origin, which was intended to translate into greater utility in laboratory diagnostics.

While the molecular approach to the taxonomy of dermatophytes was able to determine the main trends of their evolution, it turned out to be unreliable in the classification and identification of several epidemiologically relevant species [25]. Pairs of species which are established in mycology, such as *Trichophyton rubrum*/*T. violaceum*, *T. equinum*/*T. tonsurans* and also, to some extent, the trio of *M. audouinii*/*M. canis*/*M. ferrugineum* remained indistinguishable molecularly, even with the employment of multilocus analysis [12]. Because of this, the only solution to this taxonomic problem can be a multi-directional approach which combines molecular, ecological and phenotypic data, and also takes into account the life cycles of these fungi.

7. Taxonomic problems in mycology

The main taxonomic problem which is often found in the case of environmental fungi, is the unexpected diversity of phylogenetic isolates, which earlier appeared to be phenotypically monomorphic [22, 25, 63, 64]. The isolates with a similar macro and micro-morphology are repeatedly proven to belong to completely different species, genera and even ecological groups [22, 40, 60]. It is necessary to indicate that dermatophytes classified according to phenotype, despite the differentiation of traits within equivalent taxa, always belong to one evolutionary lineage, that is *Arthrodermataceae* family [25]. The common phylogeny of all dermatophytes can be demonstrated by their keratinophilic properties, which represent a rare feature in the kingdom of fungi [64]. In turn, the evolution within this family shows strong coherence with natural hosts, animals or humans supplying the basic nutrient-keratin [63]. The relationship between the dermatophyte species and the host has been reported in the literature long before the introduction of molecular methods into the taxonomy, and the reasons are seen in the diversification of keratin struc-

ture in particular host species and the phenomenon of the pathogen's adaptation to the host [8].

The second currently relevant taxonomic problem in mycology is the concept of molecular species [22, 25]. Many years after the introduction of the genetic criterion into taxonomy, the rule stating that in the kingdom of fungi the number of species determined on the basis of molecular research is much higher than that defined on the basis of conventional phenotypic methods was in force [3, 13, 21]. Literature provides data in relation to the multiplicity of the genetic types of *Aspergillus fumigatus* (Fresen. 1863) [3], *Candida parapsilosis* (Langeron and Talice 1932) [13] or *Aureobasidium pullulans* (G. Arnaud 1918) [21], which confirm this view. Dermatophytes, however, seem to be unique in this respect. In the last 150 years of mycological research, concentrated mainly in European centres due to the high frequency and variety of diseases caused by these fungi, a large number of phenotypes and genotypes of dermatophytes has been described [21]. Currently, 10 species of anthropophilic dermatophytes have been identified on the European continent, based on genetic criteria [12]. However, 103 taxa of this type are listed in Atlas of Clinical Fungi [11, 12], and in the literature researchers use as many as 242 synonymous names to describe the same 10 species [12, 15]. Thus, it seems that in the case of dermatophytes species diversity observed on the basis of the results of classical identification is much greater than the genetic diversity actually existing. We can conclude that anthropophilic, and presumably also zoophilic, dermatophytes were artificially classified, which led to the accumulation of equivalent taxa, without phylogenetic justification [64]. Similar phenomena of inflating the number of species are visible in other fungi groups of practical significance, which were therefore investigated *in extenso*. For example, the species of *Rhizopus* (Ehrenb. 1821) grow easily in *in vitro* culture, and their industrial use began immediately after the Pasteur period, due to their important role in the fermentation processes of Asian soy-based food products [30]. 43 synonymous species of *Rhizopus microsporus* have been described phenotypically (Tiegh. 1875) as well as *R. arrhizus* (A. Fisch. 1892), which were molecularly reduced to only two [14]. Another example is the ubiquitous *Alternaria alternata* (Keissl. 1912), reduced to one species on the basis of genomic analyses, from originally numerous synonymous species isolated on the basis of conidia and conidiophore morphology [62].

8. Clinical aspect of the taxonomy of dermatophytes

Currently three main types of dermatophytes such as *Epidermophyton*, *Microsporum* and *Trichophyton* are classified on the basis of morphological characteristics.

It only partially corresponds to their phylogenesis [22]. The best example are species belonging to the genus of *Trichophyton*, in which, despite the fact that the fungi meeting the morphological criteria are classified, the anthropophilic and zoophilic dermatophytes are partly located, and partly also their ancestors which are mostly geophilic species [23, 24]. Therefore, an array of geophilic species of *Trichophyton*, phylogenetically distant from representatives of the two other ecological groups and almost never causing infections in humans and animals, is currently considered in routine diagnostics on a par with pathogens [12, 15, 22]. From an ecological and clinical point of view, the difference between these groups is huge because anthropophilic and zoophilic species are considered to be “true” (obligatory) pathogens, due to the fact that they have an evolutionary advantage and are transferred between humans or their transmission takes place from animals to humans [27, 64]. However, the overwhelming majority of geophilic species are opportunists, and their natural habitat is soil [60]. The combination of such highly evolutionarily distant fungi of one type is not optimal and can lead to diagnostic errors. Molecular phylogenesis clearly separates geophilic dermatophytes from anthropophilic and zoophilic ones, which is confirmed by previously published studies based on analysis of ITS sequence [22], the translational factor 1 gene (*TEF1*) [38] and the calmodulin gene (*CAL*) [1]. A system of dermatophyte taxonomy, being useful in clinical diagnostics and constituting a modern understanding of identification, needs to reflect molecular phylogeny, additionally supported by data from phenotypic studies and assessment of the clinical picture – thus it should be omnidirectional [12]. The main criteria for the optimal determination of species should be based on the concept of biological species, i.e. the possibility of random mating between strains of the same species and producing fertile offspring as well as the lack of such possibility between separate species [43, 44]. In microbiological practice, however, this criterion is not often easy to apply. Sexual crossbreeding experiments were particularly helpful in identifying the species *Microsporum gypseum* (Guiart and Grigoraki 1928) and the *T. mentagrophytes* complex [56–58]. Sexual reproduction of many species of dermatophytes has often not been described *ex vivo* because the conditions, in which teleomorphs are produced, are unknown or possibly specific environmental conditions for this process do not exist naturally [25, 43, 44]. In the case of the population of these fungi, the prevalence of one mating type can lead to the preference for asexual reproduction and can explain the lack of intraspecies diversity [22, 25]. Then the species will be a population of individuals with a high degree of genetic compatibility, and the concept of biological species will be expressed *in silico* on the

basis of genomic similarity analysis [22, 64]. Using this concept, De Hoog et al. [12] proposed a system of dermatophyte taxonomy which is based on the sequences of the four regions of the genome: ITS fragment, ribosomal 60S fragment, gene of large ribosomal subunit (*LSU*) and beta-tubulin gene (*TUB*). Each of them was characterised by a different specificity, enabling the identification of different number of taxa according to the dependence of ITS > *TUB* > 60S > *LSU* [12]. The results of these studies indicate that the ITS rDNA sequence is sufficiently informative for dermatophyte genomic analyses, thus constituting an optimal marker in routine diagnostics, although it is necessary to base the species identification on the analysis of additional genes and phenotypic traits [12] to distinguish individual *varietas* of some “species complexes”.

9. Current classification system

The conclusions from mycological workshops organised in 2016 by CBS KNAW Fungal Biodiversity Centre (The Centraalbureau voor Schimmelcultures Fungal Biodiversity Centre, Institute of the Royal Netherlands Academy of Arts and Sciences) in Utrecht, The Netherlands, enabled the team led by Sybren De Hoog [12], to propose a new classification system for dermatophytes based mainly on the molecular criterion. The taxonomic relationship between the members of the *Arthrodermataceae* family in this system is presented in a model way by a phylogenetic tree constructed on the basis of the analyses of the ITS sequence located within the rDNA (Fig. 3). One can distinguish seven main clades within the phylogram included. The largest one of these includes species of the genus *Trichophyton*, characterised by a polyphyletic evolutionary origin. Within this genus there are four collective species (morphologically variable): *Trichophyton mentagrophytes* complex, *Trichophyton benhamiae* complex (Y. Gräser and de Hoog 2016), *Trichophyton bulbosum* (Lebasque 1933) and *Trichophyton rubrum* complex. The second clade contains a single species *Epidermophyton floccosum*, which is paraphyletic and evolutionarily distant from other dermatophytes. A separate clade contains dermatophytes classified as *Microsporum canis* complex, and the other three include the genera of *Lophophyton* (Matr. And Dassonv. 1899), *Paraphyton* (Y. Gräser, Dukik and de Hoog 2016) and *Nannizzia* (Stockdale 1961). The most diverse clade contains many species currently known under the teleomorphic name of *Arthroderma*. The external branch of the phylogenetic tree is the new taxon of the *Guarromyces* (Y. Gräser and de Hoog 2016), to which the previously described anthropophilic species of *Keratinomyces cere-tanicus* has been transferred.

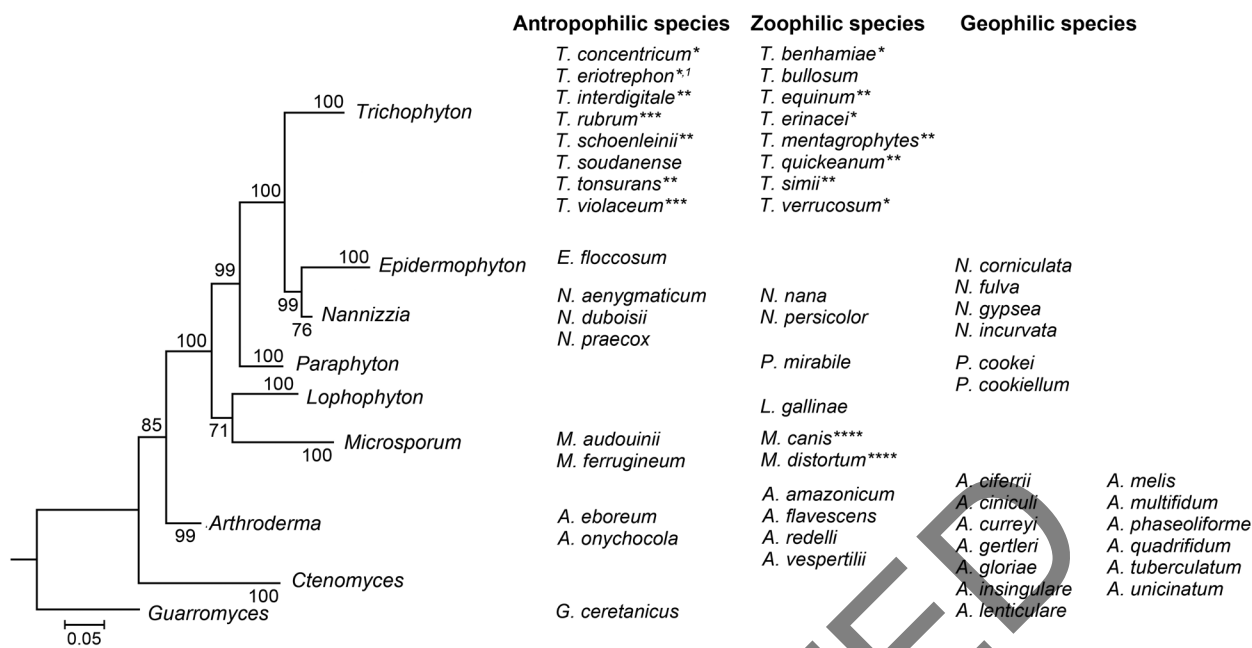


Fig. 3. Phylogeny and ecological classification of the most isolated dermatophyte species.

Legend: **T. benhamiae* complex, ***T. mentagrophytes* complex, ****T. rubrum* complex, *****M. canis* complex, ¹ species classified only molecular.

10. Indistinguishable “species complexes”

So-called “species complexes”, which have been differentiated on the basis of ITS sequence analysis within the rDNA, constitute a taxon of a higher rank gathering the species which are indistinguishable at the level of ITS [12, 15]. Chen et al. [6] defined a species complex as a population of different species which are doubtfully distinct. In the case of dermatophytes, a species complex means a taxon that differs genomically in an unambiguous way from other taxa of species rank, while, using the same criterion, there is no differentiation between individual species which are included in the composition of the complex [12, 25, 35, 47].

The greatest difficulty in differentiating species within a species complex is the ecological specificity of dermatophytes. Let us consider the *T. mentagrophytes* complex, being a genomically consistent complex of the species *T. mentagrophytes* and *T. interdigitale* (Priestley 1917) [22]. These two species show completely separate ecological adaptations, as the first of them is strictly anthropophilic, the second – zoophilic [22]. Similarly, the classification criterion based on ITS rDNA does not allow zoophilic differentiation of *T. equinum* from anthropophilic *T. tonsurans* [12, 22]. The above-mentioned examples touch upon the fundamental problem in medical mycology, since it is believed that the infection caused by zoophilic dermatophytes in humans has an acute course with significant inflammation, as opposed to benign dermatomycoses, whose etiological factors are anthropophilic species [5]. Reliable establishment of the boundaries of dermatophyte species, and

thus accurate species identification, requires a multi-directional approach. Then the cumulative analysis of molecular, phenotypic and clinical data will allow for determining the biological framework of individual taxa of dermatophytes in this taxon in accordance with the ecological specificity of this group of fungi [12, 16, 18–20]. Without doubt, further detailed research on this subject is necessary.

11. Summary

It can be concluded that the taxonomy of dermatophytes, especially of the anthropophilic species, is already mature enough to achieve stabilisation for the benefit of clinicians. The currently defined taxa will probably not undergo drastic changes in the near future, and the presented phylogeny will not turn out to be wrong in the course of ongoing research. Has the stability of the nomenclature for dermatophytes been finally achieved? An overview of the current scientific literature does not give such certainty. In the near future one can expect a complete description of the rare species of *Trichophyton eriotrephon*, similarly, an extensive research on the *Microsporium aenygmaticum*, being hard to identify, is still underway, and species introduced from geographically distant areas, such as *Trichophyton concentricum* will likely be reclassified. The attention of mycologists is directed particularly towards the group of geophilic dermatophytes, which are still not sufficiently researched in comparison to the large number of their potential hosts and ecologi-

cal niches occupied. Today, these species do not have a greater clinical significance, but, as the experts on the topic claim, evolution does not take breaks along the road towards life.

Acknowledgements

The article was translated by EURO-ALPHABET from Polish into English under agreement 659/P-DUN/2018 and funded by the Ministry of Science and Higher Education.

References

- Ahmadi B., Mirhendi H., Makimura K., de Hoog G.S., Shidfar M.R., Nouripour-Sisakht S., Jalalizand N.: Phylogenetic analysis of dermatophyte species using DNA sequence polymorphism in calmodulin gene. *Med. Mycol.* **54**, 500–514 (2016)
- Anzawa K., Kawasaki M., Mochizuki T., Ishizaki H.: Successful mating of *Trichophyton rubrum* with *Arthroderma simii*. *Med. Mycol.* **48**, 629–634 (2010)
- Balajee S.A., Gribskov J.L., Hanley E., Nickle D., Marr K.A.: *Aspergillus lentulus* sp. nov., a new sibling species of *A. fumigatus*. *Eukaryot. Cell.* **4**, 625–632 (2005)
- Barry I., Hainer M.D.: Dermatophyte infection. *Am. Fam. Physician.* **67**, 101–109 (2003)
- Cabañes F.J., Abarca M.L., Bragulat M.R., Castellá G.: Seasonal study of the fungal biota of the fur of dogs. *Mycopathologia*, **133**, 1 (1996)
- Chen M., Zeng J., de Hoog G.S., Stielow B., Ende A.H.G., Liao W., Lackner M.: The concept of 'species complex' illustrated by the *Scedosporium apiospermum* species complex. *Fungal Biol.* **120**, 137–146 (2015)
- Courtellemont L., Chevrier S., Degeilh B., Belaz S., Gangneux J.P., Gangneux R.: Epidemiology of *Trichophyton verrucosum* infection in Rennes University Hospital, France: A 12-year retrospective study. *Med. Mycol.* **55**, 720–724 (2017)
- Currah R.S.: Taxonomy of the onygenales: *Arthrodermataceae*, *Gymnoascaceae*, *Myxotrichaceae* and *Onygenaceae*. *Mycotaxon.* **24**, 1–216 (1985)
- Dawson C.O., Gentles J.C.: The perfect states of *Keratinomyces ajelloi* Vanbreuseghem, *Trichophyton terrestre* Durie and Frey and *Microsporium nanum* Fuentes. *Sabouraudia*, **1**, 49–57 (1961)
- De Baere T., Summerbell R., Theelen B., Boekhout T., Vaneechoutte M.: Evaluation of internal transcribed spacer 2-RFLP analysis for the identification of dermatophytes. *J. Med. Microbiol.* **59**, 48–54 (2010)
- de Hoog G.S., Guarro J., Gené J., Figueras M.J.: Atlas of clinical fungi, 3rd web-edition, 2015
- de Hoog G.S., Dukik, K., Monod, M., Packeu A., Stubbe D., Hendrickx M., Kupsch C., Stielow J.B., Freeke J., Göker M. et al.: Toward a Novel Multilocus Phylogenetic Taxonomy for the Dermatophytes. *Mycopathologia*, **182**, 5–31 (2017).
- Diezmann S., Cox C.J., Schönián G., Vilgaly R.J., Mitchell T.G.: Phylogeny and evolution of medical species of *Candida* and related taxa: a multigenic analysis. *J. Clin. Microbiol.* **42**, 5624–5635 (2004)
- Dolatabadi S., Walther G., Gerrits van den Ende A.H.G., de Hoog G.S.: Diversity and delimitation of *Rhizopus microsporus*. *Fungal Divers.* **64**, 145–163 (2014)
- Dworecka-Kaszak B., Dąbrowska I.: Dermatofity – nowa taksonomia i współczesne metody różnicowania. Przegląd aktualnego stanu wiedzy o mechanizmach patogenyzy i interakcjach patogen-gospodarz. *Med. Weter.* **73**, 613–617 (2017)
- Gnat S., Łagowski D., Nowakiewicz A., Trościańczyk A., Zięba P.: Infection of *Trichophyton verrucosum* in cattle breeders, Poland: A 40-year retrospective study on the genomic variability of strains. *Mycoses*, **61**, 681–690 (2018)
- Gnat S., Łagowski D., Nowakiewicz A., Zięba P.: Phenotypic characterization of enzymatic activity of clinical dermatophyte isolates from animals with and without skin lesions and humans. *J. Appl. Microbiol.* **125**, 700–709 (2018)
- Gnat S., Nowakiewicz A., Ziółkowska G., Majer-Dziedzic B., Trościańczyk A., Zięba P.: Evaluation of growth conditions and DNA extraction techniques used in the molecular analysis of dermatophytes. *J. Appl. Microbiol.* **122**, 1368–1379 (2017)
- Gnat S., Nowakiewicz A., Łagowski D., Trościańczyk A., Zieba P.: Multiple-strain *Trichophyton mentagrophytes* infection in a silver fox (*Vulpes vulpes*) from a breeding farm. *Med. Mycol.* DOI: 10.1093/mmy/myy011 (2018)
- Gnat S., Nowakiewicz A., Łagowski D., Zięba P.: *Tinea corporis* by *Microsporium canis* in mycological laboratory staff: Unexpected results of epidemiological investigation. *Mycoses*, DOI: 10.1111/myc.12832 (2018)
- Gostinčar C., Ohm R.A., Kogej T., Sonjak S., Turk M., Zajc J., Zalar P., Grube M., Sun H., Han J. i wsp.: Genome sequencing of four *Aureobasidium pullulans* varieties: biotechnological potential, stress tolerance, and description of new species. *BMC Genom.* **15**, 549 (2014)
- Gräser Y., de Hoog G.S., Summerbell R.C.: Dermatophytes: recognizing species of clonal fungi. *Med. Mycol.* **44**, 199–209 (2006)
- Gräser Y., Kuijpers A.F., Presber W., de Hoog G.S.: Molecular taxonomy of *Trichophyton mentagrophytes* and *T. tonsurans*. *Med. Mycol.* **37**, 315–330 (1999)
- Gräser Y., Kuijpers A.F., Presber W., de Hoog G.S.: Molecular taxonomy of the *Trichophyton rubrum* complex. *J. Clin. Microbiol.* **38**, 3329–3336 (2000)
- Gräser Y., Scott J., Summerbell R.: The New Species Concept in Dermatophytes – a Polyphasic Approach. *Mycopathologia*, **166**, 239 (2008)
- Gruby D.: Mémoire sur une végétation qui constitue la vraie teigne. *C. R. Acad. Sci.* **13**, 72–75 (1841)
- Havlickova B., Czaika V.A., Friedrich M.: Epidemiological trends in skin mycoses worldwide. *Mycoses*, **51**, 2–15 (2008)
- Howard D.H., Weitzman I., Padhye A.A.: *Onygenales Arthrodermataceae* (w) Pathogenic Fungi in humans and Animals, red. D.H. Howard (.), Marcel Dekker Inc, New York, 2002, s. 141–194
- Hubka V., Dobiasova S., Dobias R., Kolařík M.: *Microsporium aenigmaticum* sp. nov. from *M. gypseum* complex, isolated as a cause of *Tinea corporis*. *Med. Mycol.* **52**, 387–396 (2014)
- Jennessen J., Schnu J., Rer A., Olsson J., Samson R.A., Dijksterhuis J.: Morphological characteristics of sporangiospores of the temperate fungus *Rhizopus oligosporus* differentiate it from other taxa of the *R. microsporus* group. *Mycol. Res.* **112**, 547–563 (2008)
- Kano R., Yoshida E., Yaguchi T., Hubka V., Anzawa K., Mochizuki T., Hasegawa A., Kamata H.: Mating type gene (MAT1-2) of *Trichophyton verrucosum*. *Mycopathologia*, **177**, 87–90 (2014)
- Krzyściak P., Skóra M., Macura A.B.: Atlas grzybów chorobotwórczych człowieka. Medpharm Polska, Wrocław, 2011: 266–297
- Leclerc M.C., Philippe H., Guého E.: Phylogeny of dermatophytes and dimorphic fungi based on large subunit ribosomal RNA sequence comparisons. *J. Med. Vet. Mycol.* **32**, 331–341 (1994)
- Macura A.B.: Dermatophytes, pathogens ora saprophytes. *Int. J. Derm.* **34**, 529–539 (1995)
- Makimura K., Tamura Y., Mochizuki T., Hasegawa A., Tajiri Y., Hanazawa R., Uchida K., Saito H., Yamaguchi H.: Phylogenetic classification and species identification of dermatophyte strains based on DNA sequences of nuclear ribosomal Internal Transcribed Spacer 1 regions. *J. Clin. Microbiol.* **37**, 920–924 (1999)

36. Martinez D.A., Oliver B.G., Gräser Y., Goldberg J.M., Li W., Martinez-Rossi N.M., Monod M., Shelest E., Barton R.C., Birch E. i wsp.: Comparative genome analysis of *Trichophyton rubrum* and related dermatophytes reveals candidate genes involved in infection. *MBio*, **3**, e00259-12 (2012)
37. Mercer D.K., Stewart C.S.: Keratin hydrolysis by dermatophytes. *Med. Mycol.* DOI: 10.1093/mmy/myx160 (2018)
38. Mirhendi H., Makimura K., de Hoog G.S., Rezaei-Matehkolaei A., Najafzadeh M.J., Umeda Y., Ahmadi B.: Translation elongation factor 1- α gene as a potential taxonomic and identification marker in dermatophytes. *Med. Mycol.* **53**, 215–224 (2015)
39. Mochizuki T., Takeda K., Anzawa K.: Molecular markers useful for epidemiology of dermatophytes. *J. Dermatol.* **42**, 232–235 (2015)
40. Moriello K.A., Deboer D.J.: Fungal flora of the coat of pet cats. *Am. J. Vet. Res.* **52**, 602–606 (1991)
41. Negroni R., Bonvehi P., Arechavala A.: Historia y descripción de *Microsporium fulvum*, una especie válida del género descubierta en la República Argentina. *Rev. Argentina Microbiol.* **40**, 47 (2008)
42. Neji S., Trabels H., Hadrich I., Cheikhrouhou F., Sellami H., Makni F., Ayadi A.: Molecular characterization of strains of the *Trichophyton verrucosum* complex from Tunisia. *Med. Mycol.* **54**, 787–793 (2016)
43. Nenoff P., Herrmann J., Gräser Y.: *Trichophyton mentagrophytes sive interdigitale*? A dermatophyte in the course of time. *J. Deutsch. Dermatol. Ges.* **5**, 198–202 (2007)
44. Nenoff P., Krüger C., Ginter-Hanselmayer G., Tietz, H.: Mycology – an update. Part 1: Dermatophytes: Causative agents, epidemiology and pathogenesis. *JDDG: J. Deutsch. Dermatol. Ges.* **12**, 188–210 (2014)
45. Nweze E.I.: Dermatophytoses in domesticated animals. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo*, **53**, 95–99 (2011)
46. Ovren E., Berglun L., Nordlind K., Rollman O.: Dermatophytosis: fluorostaining enhances speed and sensitivity in direct microscopy of skin, nail and hair specimens from dermatology outpatients. *Mycoses*, **59**, 436–441 (2016)
47. Pchelin I.M., Zlatogursky V.V., Rudneva M.V., Chilina G.A., Rezaei-Matehkolaei A., Lavnikovich D.M., Vasilyeva N.V., Taraskina A.E.: Reconstruction of phylogenetic relationships in dermatomycete genus *Trichophyton* Malmsten, 1848 based on ribosomal internal transcribed spacer region, partial 28S rRNA and beta-tubulin genes sequences. *Mycoses*, **59**, 566–575 (2016)
48. Rezaei-Matehkolaei A., Mirhendi H., Makimura K., de Hoog G.S., Satoh K., Najafzadeh M.J., Shidfar M.R.: Nucleotide sequence analysis of beta tubulin gene in a wide range of dermatophytes. *Med. Mycol.* **52**, 674–688 (2014)
49. Rippon J.W. The changing epidemiology and emerging patterns of dermatophyte species. *Curr. Top. Med. Mycol.* **1**, 208–234 (1985)
50. Sabouraud R.J.A.: *Maladies du cuir chevelu*. 3^{me} partie: Les teignes. Masson, Paris, 1910, 988 pp
51. Seeliger H.P.R.: The discovery of *Achorion schoenleinii*. *Mykosen*. **28**, 161–182 (1985).
52. Stockdale P.M.: *Nannizzia incurvata* gen. nov., sp. nov., a perfect state of *Microsporium gypseum* (Bodin) Guiart et Grigorakis. *Sabouraudia*, **1**, 41–48 (1961)
53. Stockdale P.M.: Sexual stimulation between *Arthroderma simii* Stockd., Mackenzie and Austwick and related species. *Sabouraudia*, **6**, 176–181 (1968).
54. Subelj M., Marinko J.S., Učakar V.: An outbreak of *Microsporium canis* in two elementary schools in a rural area around the capital city of Slovenia, 2012. *Epidemiol Infect.* **142**, 2662–2666 (2014).
55. Summerbell R.C.: Form and function in the evolution of dermatophytes. *Revta. Iberoam. Micol.* **17**, 30–43 (2000)
56. Symoens F., Jousson O., Packeu A., Fratti M., Staib P., Mignon B., Monod M.: The dermatophyte species *Arthroderma benhamiae*: intraspecies variability and mating behavior. *J Med Microbiol.* **62**, 377–385 (2013)
57. Symoens F., Jousson O., Planard C., Fratti M., Staib P., Mignon B., Monod M.: Molecular analysis and mating behaviour of the *Trichophyton mentagrophytes* species complex. *Int. J. Med. Microbiol.* **301**, 260–266 (2011)
58. Takashio M.: Une nouvelle forme sexuée du complexe *Trichophyton mentagrophytes*, *Arthroderma vanbreuseghemii*. *Annals Parasit.* **48**, 713–372 (1973)
59. Weitzman I., Salkin I.F., Rosenthal R.A.: Evaluation of *Trichophyton* agars for identification of *Trichophyton soudanense*. *J. Clin. Microbiol.* **18**, 203–205 (1983)
60. Weitzman I., Summerbell R.C.: The dermatophytes. *Clin. Microbiol. Rev.* **8**, 240–259 (1995)
61. White T.J., Bruns T., Lee S., Taylor J.W.: Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics (w) PCR protocols: a guide to methods and applications, red. M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky, T.J. White. New York Academic Press Inc; 2007, s. 315–322
62. Woudenberg J.H.C., Groenewald J.Z., Binder M., Crous P.W.: *Alternaria* redefined. *Stud. Mycol.* **75**, 171–212 (2013)
63. Wu Y., Yang Z., Yang F., Liu T., Leng W., Chu Y.: Recent dermatophyte divergence revealed by comparative and phylogenetic analysis of mitochondrial genomes. *BMC Genomics*, **10**, 238 (2009)
64. Zhan P., Liu W.: The changing face of dermatophytic infections worldwide. *Mycopathologia*, **182**, 77–86 (2017)
65. Ziółkowska G., Wawrzekiewicz K. Screening of the enzymatic activity of *Microsporium canis* field strains. *Annales UMCS Sect D. L*, 11–20 (1995)
66. Ziółkowska G., Nowakiewicz A., Gnat S., Trościańczyk A., Majer-Dziedzic B., Zięba P.: Molecular identification and classification of *Trichophyton mentagrophytes* complex strains isolated from humans and selected animal species. *Mycoses*, **58**, 118–126 (2015)

TAKSONOMIA DERMATOFITÓW – SYSTEMY KLASYFIKACYJNE ZMIENIAJĄ SIĘ, PROBLEMY IDENTYFIKACYJNE POZOSTAJĄ TE SAME

Sebastian Gnat^{1,*}, Aneta Nowakiewicz¹, Przemysław Zięba²

¹ Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, Wydział Medycyny Weterynaryjnej,
Instytut Biologicznych Podstaw Chorób Zwierząt, Zakład Mikrobiologii Weterynaryjnej

² Zakład Higieny Weterynaryjnej w Lublinie

Wpłynęło w sierpniu, zaakceptowano w listopadzie 2018 r.

Streszczenie: Infekcje grzybicze skóry, włosów i paznokci cechuje najwyższa prevalencja wśród wszystkich grzybic dotycząc obecnie ponad 20–25% populacji ludzi i zwierząt na świecie. Czynniki etiologiczne większości grzybiczych infekcji powierzchniowych są dermatofity. Spośród innych patogennych grzybów strzępkowych wyróżnia je unikalna właściwość rozkładu keratyny. Ogromna zdolność przetrwania w różnych ekosystemach grzybów tej grupy wynika z ich różnorodności morfologicznej, ekologicznej, jak również możliwości adaptacji do zmieniających się warunków środowiska. Dermatofity chociaż stanowią jedną z najstarszych grup mikroorganizmów długo nie doczekały się stabilnego systemu taksonomicznego. Co najważniejsze z klinicznego punktu widzenia, dermatofity wciąż przysparzają problemów diagnostycznych, co skutkuje błędami terapeutycznymi. Rosnąca liczba zakażeń, w tym również odzwierzęcych, brak stabilności taksonomicznej i niejednoznaczny obraz kliniczny niektórych przypadków dermatomycoz powodują konieczność poszukiwania nowych metod szybkiej, taniej i powtarzalnej identyfikacji gatunkowej tych grzybów. Z kolei identyfikacja gatunkowa determinowana jest jasnością kryteriów klasyfikacyjnych uwzględniających poglądy klinicystów, epidemiologów i mykologów. W niniejszej pracy Autorzy przedstawiają ewolucję systemów taksonomicznych dermatofitów na przestrzeni dziejów rozwoju mikrobiologii. Odkrywanie nowych faktów z zakresu biologii i ekologii dermatofitów, jak również rozwój technik możliwych do zastosowania w laboratorium diagnostyki mykologicznej skutkowało opracowaniem nowych strategii identyfikacyjnych. Współczesny system klasyfikacyjny tych patogenów oparty na badaniach molekularnych wydaje się być stabilny i szeroko akceptowany, czy jednak zakończy wiekowe zamieszanie klasyfikacyjne i okres setek zmian nomenklatury, będących koszmarem diagnostów? Można wnioskować, że taksonomia dermatofitów, zwłaszcza gatunków antropofilnych, jest już wystarczająco dojrzała, aby ustabilizować się z korzyścią zarówno dla klinicystów, jak i naukowców.

1. Wprowadzenie. 2. Pierwsze systemy klasyfikacji dermatofitów. 3. Fenotypowe systemy klasyfikacyjne. 4. „Biologiczna” era w klasyfikacji. 5. Ekologiczny podział dermatofitów. 6. Molekularna rewolucja w taksonomii dermatofitów. 7. Problemy taksonomiczne w mykologii. 8. Kliniczny aspekt taksonomii dermatofitów. 9. Obecnie obowiązujący system klasyfikacyjny. 10. Nierozróżnialne „kompleksy gatunków”. 11. Podsumowanie

TAXONOMY OF DERMATOPHYTES – CLASSIFICATION SYSTEMS CHANGE, IDENTIFICATION PROBLEMS REMAIN THE SAME

Abstract: Fungal infections of the skin, hair, and nails is characterized by the highest prevalence among all fungal infections currently affecting over 20–25% of the world's human and animal populations. Dermatophytes are the etiological factors of the most superficial fungal infections. Among other pathogenic filamentous fungi distinguishes them a unique attribute to degrade keratin. The remarkable ability of this group of fungi to survive in different ecosystems results from their morphological and ecological diversity as well as high adaptability to changing environmental conditions. Dermatophytes, although they are one of the oldest groups of microorganisms recognised as pathogens, nevertheless they have not been classified in a stable taxonomic system for a long time. In terms of diagnostics, dermatophytes still pose a serious problem in the identification procedure, which is often related to therapeutic errors. The increasing number of infections including zoonoses, lack of taxonomic stability, and ambiguous clinical picture of dermatomycosis cases necessitate a search for new methods for rapid, cheap, and reproducible species identification of these fungi. In turn, the species identification is determined by the clarity of classification criteria combined with the taxonomic division generally accepted by microbiologists and referring to the views expressed by clinicians, epidemiologists, and scientists. In this paper, the authors present the evolution of taxonomic systems for dermatophytes over the history of microbiology development. Discovery of new facts about the biology and ecology of dermatophytes and the development of techniques applicable applied in a mycological diagnosis laboratory facilitated development of new identification strategies at various points in the history. The modern molecular classification system of these pathogens seems to be stable and widely accepted. However, will it end the long-standing classification confusion and the period of hundreds of nomenclatural changes, which are diagnosticians' nightmare? It can be argued that the taxonomy of dermatophytes, in particular that of anthropophilic species, is sufficiently established to be stabilised for the benefit of both clinicians and scientists.

1. Introduction. 2. First dermatophyte classification systems. 3. Phenotypic classification systems. 4. “Biological” era in the classification. 5. Ecological division of dermatophytes. 6. Molecular revolution in the taxonomy of dermatophytes. 7. Taxonomic problems in mycology. 8. Clinical aspect of the taxonomy of dermatophytes. 9. Current classification system. 10. Indistinguishable “species complexes”. 11. Summary

Słowa kluczowe: dermatofity, taksonomia, metody identyfikacji, system klasyfikacyjny, nomenklatura

Key words: dermatophytes, taxonomy, identification methods, classification system, nomenclature

* Autor korespondencyjny: dr hab. Sebastian Gnat, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Instytut Biologicznych Podstaw Chorób Zwierząt, Zakład Mikrobiologii Weterynaryjnej, ul. Akademicka 12, 20-033 Lublin; tel. 81 445 60 93; e-mail: sebastian.gnat@up.lublin.pl

1. Wprowadzenie

Infekcje grzybicze skóry, włosów i paznokci stanowią najliczniejszą i najbardziej rozpowszechnioną grupę wszystkich grzybic. Częstość występowania powierzchniowych infekcji grzybiczych wzrosła w ostatnich dziesięcioleciach do takiego poziomu, że grzybicze skóry dotyczą obecnie ponad 20–25% światowej populacji, przez co są jedną z najczęstszych infekcji grzybiczych [4, 16, 17, 27, 45]. Czynniki etiologicznymi większości grzybiczych infekcji powierzchniowych są dermatofity [7, 11, 12, 22, 46, 60, 65, 66].

Chociaż nazwa dermatofity jest powszechnie stosowana, to nie ma jednej uniwersalnej i akceptowalnej przez środowisko mikrobiologów definicji, a jej używanie ma charakter raczej intencjonalny, do określania gatunków grzybów patogennych, posiadających zdolność rozkładu keratyny [28, 37, 65]. Howard i wsp. [28] dermatofitami określają liczną w gatunki grupę blisko spokrewnionych keratynofilnych grzybów z rodzaju *Epidermophyton* (Sabour. 1907), *Microsporum* (Gruby 1843) i *Trichophyton* (Malmsten 1848), które powodują infekcje skóry, włosów, paznokci i innych wytworów naskórka i skóry właściwej. Wszystkie gatunki dermatofitów należą do rodziny *Arthrodermataceae* (Locq. ex Currah 1985) i rzędu *Onygenales* (Cif. ex Benny i Kimbr. 1980). W tak ujętej definicji wątpliwości budzi nazywanie dermatofitami niepatogennych, saprofitycznych gatunków z wymienionych rodzajów, np. *Epidermophyton stockdaleae* (Prochacki i Eng.-Zas. 1974), *Microsporum boullardi* (Dominik i Majchr. 1965), *Trichophyton ajelloi* (Ajello 1968), *T. terrestre* (Durie i D. Frey 1957). Dla odróżnienia tych niepatogennych gatunków od właściwych patogenów, a jednocześnie wskazania ich biologicznego powiązania zaproponowano dla nich termin „dermatofitoidy” [32, 34].

2. Pierwsze systemy klasyfikacji dermatofitów

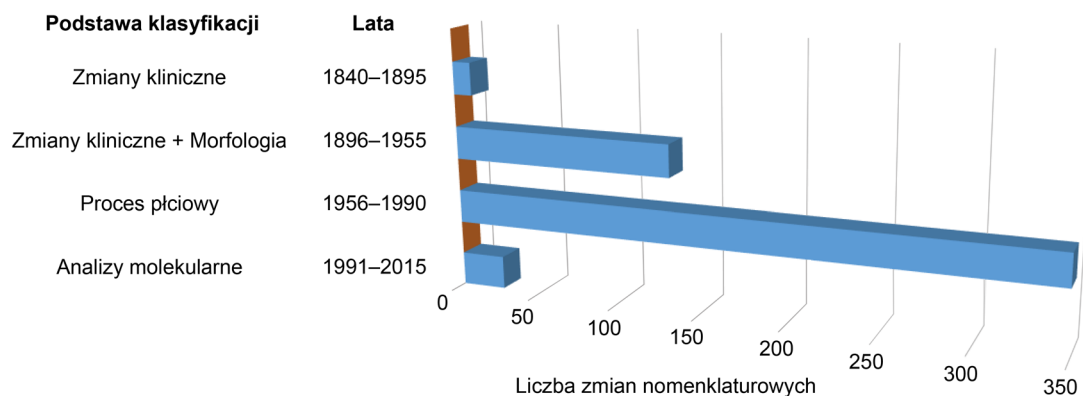
Dermatofity jako jedne z pierwszych mikroorganizmów zostały opisane jako czynniki chorobotwórcze ówczesnie obserwowanych zmian skórnych u ludzi i zwierząt [34]. Badania taksonomiczne tych grzybów zostały zapoczątkowane w 1841 roku przez Roberta Remaka i Davida Gruby'ego [26]. Pięć głównych gatunków dermatofitów uznawanych w dzisiejszych czasach za najistotniejsze epidemiologicznie, a mianowicie *Microsporum audouinii* (Gruby 1843), *Epidermophyton floccosum* (Langeron i Miloch. 1930), *Trichophyton schoenleinii* (Langeron i Miloch. ex Nann. 1934), *T. tonsurans* (Malmsten 1848) i *T. mentagrophytes* (Sabour. 1895) zostało opisanych w latach 1841–1875 [51]. Warto w tym miejscu zaznaczyć, że pierwsza klasyfikacja dermatofitów powstała kilka dekad przed opra-

cowaniem przez Ludwika Pasteura metody uzyskiwania czystych kultur, co wskazuje na istotną zauważalność problematyki dermatomykoz w tamtych czasach [51]. Jedynym współcześnie znanym gatunkiem dermatofita, którego brakuje na liście R. Remaka i D. Gruby'ego jest *Trichophyton rubrum* (Sabour. 1911), a który został sklasyfikowany dopiero w XX wieku [49].

Hodowla i opis czystych kultur dermatofitów wprowadziły mykologię w swoistą epokę renesansu. Nowo klasyfikowane dermatofity były określane na podstawie połączonych obserwacji różnicowanych zmian klinicznych liszaju obrączkowego (ringworm) powodowanego przez różne grupy ekologiczne dermatofitów i opisów morfologii kolonii przeprowadzanych *in vitro* [50]. Posługując się metodologią Sabourauda jako standardem [50], w latach 1870–1920 wyodrębniono kolejnych szesnaście gatunków dermatofitów, przede wszystkim związanych z infekcjami u ludzi. Stosowanie tego samego standardu metodologicznego klasyfikacji dermatofitów doprowadziło w następnych dziesięcioleciach do wzrostu liczby opisów nowych gatunków i zamieszania nomenklaturowego. Ogólna koncepcja określania przynależności do dermatofitów została wówczas zaburzona, a reguły taksonomiczne stały się niespójne, co skutkowało wielokrotnymi zmianami w nomenklaturze. Zaowocowało to łącznie około 350 zmianami w nazwach gatunkowych w 1950 roku (Ryc. 1) [12]. Zasady klasyfikacyjne dermatofitów i jednolita nomenklatura anamorf zostały ustabilizowane dopiero po szerokich konsultacjach w środowisku mykologów, a rodzaje *Epidermophyton*, *Microsporum* i *Trichophyton* stały się taksonami skupiającymi wszystkie dotąd poznane gatunki dermatofitów [11, 12, 60].

3. Fenotypowe systemy klasyfikacyjne

Pasterowska metoda otrzymywania czystych kultur została szybko implementowana do mykologii i taksonomii dermatofitów [51]. Morfologia pojedynczej kolonii grzyba, w połączeniu z jego obrazem mikroskopowym, stanowiły dobre parametry diagnostyczne [11]. Wątpliwości dotyczące możliwości wykorzystywania w identyfikacji dermatofitów opisów makro- i mikromorfologii czystych kultur pojawiły się dopiero w momencie badania powtarzalności tych cech [22, 34, 60]. Udowodniono, że izolaty pochodzące bezpośrednio ze zmian klinicznych cechuje charakterystyczna morfologia, która jest diagnostycznie użyteczna, ale jednocześnie morfologia ta zmienia się w wyniku pasażowania kultur [11, 12, 18]. Standaryzacja szczepów referencyjnych była zatem trudna, co w konsekwencji doprowadziło do wprowadzenia licznych taksonów, które jednak obecnie uważane są za synonimy wcześniej opisanych gatunków [12, 64]. Obecnie, już tylko historycznie, można wskazać



Ryc. 1. Liczba zmian nomenklaturowych gatunków dermatofitów z uwzględnieniem kryterium klasyfikacji i okresu rozwoju taksonomii

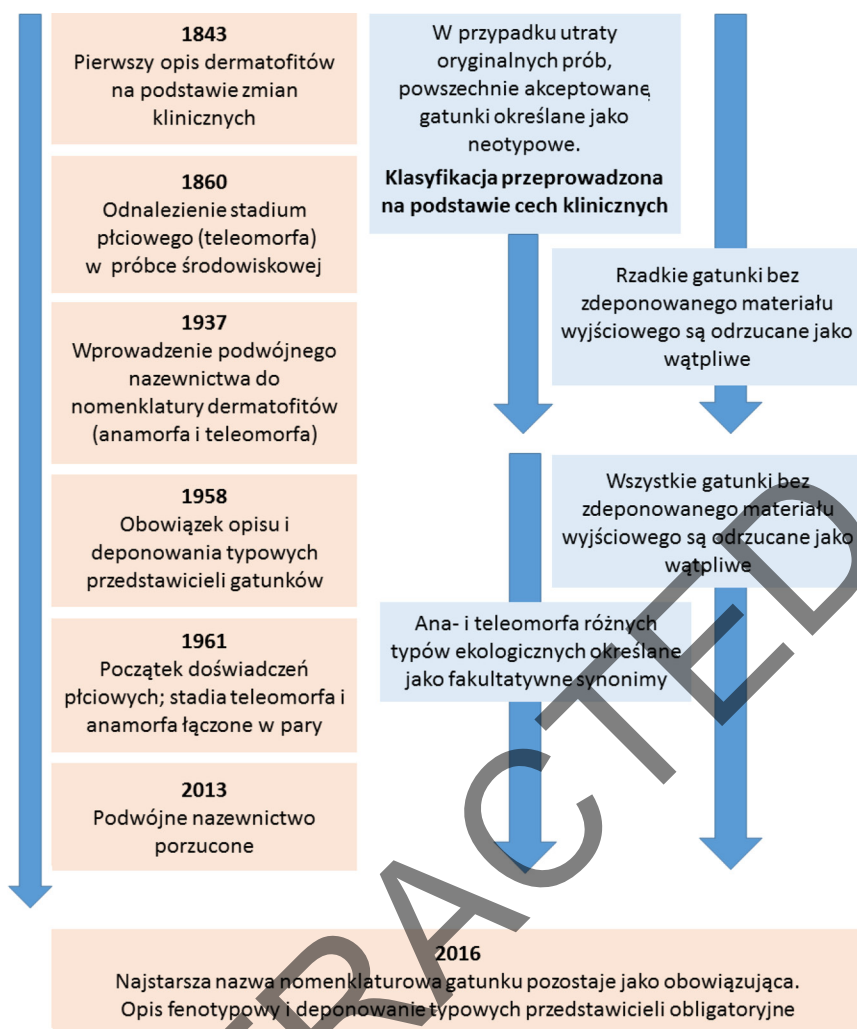
przynajmniej dwadzieścia różnych gatunkowych nazw synonimicznych *T. mentagrophytes*, sześć *T. verrucosum* (E. Bodin 1902) i po trzy dla *M. canis* oraz *E. floccosum*. Ponadto, różne rodzaje odmian morfologicznych opisywano jako osobne taksony, np. *Keratinomyces longifusus* (Flórián i Galgoczy 1964), będący w rzeczywistości *Microsporum fulvum* (Uriburu 1909) cechujący się silnie koherentnymi konidiami [41].

Błędna klasyfikacja była zatem nieuniknioną konsekwencją systemu diagnostycznego opartego wyłącznie na fenotypie [16, 17, 22, 66]. Co więcej, znanych jest obecnie co najmniej kilka gatunków dermatofitów, które zupełnie nie wykazują sporulacji lub bardzo słabo sporulują w hodowli *in vitro*. Do takich gatunków z pewnością można zaliczyć *Trichophyton concentricum* (R. Blanch. 1895) i *T. schoenleini* (Langeron i Miloch. ex Nann. 1934), które ze względu na brak swoistych cech fenotypowych w hodowlach *in vitro* często są identyfikowane w oparciu o charakterystyczny obraz i lokalizację zmian klinicznych [12, 29].

W ostatnich dziesięcioleciach XX wieku stało się oczywiste, że identyfikacja gatunkowa oparta na morfologii ma swoje ograniczenia i nie może być dalej wykorzystywana. Uwzględniając te problemy, Weitzman i wsp. [59] wprowadzili do diagnostyki dermatofitów dodatkowy zestaw testów fizjologicznych. Zastosowanie między innymi tak zwanych „*Trichophyton*-agarów” pozwoliło wykazać zróżnicowanie zdolności poszczególnych szczepów do asymilacji panelu witamin. Ponadto, zdolność wzrostu w różnych temperaturach i możliwość upłynniania żelatyny pozwoliły wprowadzić dodatkowe kryteria w różnicowaniu izolatów. Nowe „konwencjonalne podejście” stosowane przy opisie gatunków dermatofitów stanowiło połączenie obrazu klinicznego infekcji, cech makroskopowych i mikroskopowych czystych kultur oraz ich fizjologii. Jedynym nieuwzględnionym aspektem w tym podejściu była serologia szczepów, która nigdy tak naprawdę nie została wprowadzona do diagnostyki dermatofitów [11, 15, 32].

4. „Biologiczna” era w klasyfikacji

Opisy stadiów teleomorficznych dermatofitów autorstwa Christine Dawson i Jeremy Gentles’a [9] oraz Phyllis Stockdale [52] pozwoliły wprowadzić do mykologii biologiczną koncepcję gatunku. Owi badacze stwierdzili, że niektóre geofilne i zoofilne dermatofity, jak również pokrewne im niepatogenne gatunki, takie jak *Trichophyton terrestre* i *T. ajelloi*, rozmnażają się w procesie płciowym. Do określania stadiów doskonałych (teleomorficznych) tych grzybów zostały wprowadzone nazwy rodzajowe *Arthroderma* (Curr. 1860) i *Nannizzia* (Stockdale 1961) [9, 11, 52, 53]. W konsekwencji wzrosła liczba taksonów, a klasyfikacja i identyfikacja skomplikowały się przez wprowadzenie podwójnej nomenklatury dla tych grzybów (Ryc. 2). Określenie typów płciowych dermatofitów zaczęło się w niezwykle sposób, gdy Stockdale [53] odkrył, że u przedstawicieli wielu, pozornie niezwiązanych ze sobą gatunków, można indukować proces płciowy w obecności szczepu testowego *Arthroderma simii* (Stockdale, D.W.R. Mack. i Austwick 1965). Większość gatunków dermatofitów, dla których znane są stadia doskonałe (teleomorficzne) może być identyfikowana tą metodą. W toku prowadzonych badań okazało się, że *Trichophyton rubrum* posiada typ płciowy określany jako (–), podczas gdy gatunek blisko spokrewniony *T. megninii* (R. Blanch. 1895), obecnie uważany za synonim pierwszego z wymienionych, jest typu płciowego (+) [52, 53]. Tylko dla kilku ważnych epidemiologicznie gatunków dermatofitów, takich jak *Epidermophyton floccosum* (Langeron i Miloch. 193) i *T. soudanense* (Joyeux 1912) nie opisano do tej pory ich stadiów teleomorficznych [11]. Summerbell [55] zwrócił uwagę na oczywisty czynnik ekologiczny łączący gatunki o nieznanym stadiach teleomorficznych, mianowicie, wszystkie były zdolne do wywoływania infekcji u zwierząt i/lub człowieka. Natomiast do tej pory nie odnaleziono żadnych struktur rozrodczych pozostawianych na keratynowych szczątkach



Ryc. 2. Typowi przedstawiciele gatunków i ich miejsce w historii taksonomii dermatofitów

roślinnych bądź zwierzęcych, które umożliwiałyby im późniejsze procesy płciowe.

Znajomość sekwencji genomowych wielu gatunków dermatofitów pozwoliła określić loci odpowiedzialne za typy płciowe [36]. Stosując częściową amplifikację każdego locus, Kano i wsp. [31] potwierdzili molekularnie, że 22 badane przez nich szczepy *T. verrucosum* wykazują tylko jeden typ płciowy. Inne doniesienia naukowe [11, 12, 25] ujawniły, że pojedynczy typ płciowy występuje u wielu gatunków, m. in.: *T. tonsurans* (Malmsten 1848), *T. equinum* (Geddoelst 1902), *T. interdigitale* (Priestley 1917), *T. schoenleinii* (Langeron & Miloch. ex Nann. 1934), *T. rubrum*, *T. violaceum* (Sabour. ex E. Bodin 1902), *T. erinacei* (A.A. Padhye i J.W. Carmich. 1969), *T. concentricum*, *M. audouinii* i *M. ferrugineum* (M. Ota 1921). Potwierdza to pogląd, że dominującym sposobem rozmnażania tych grzybów jest bezpłciowa reprodukcja klonalna, która pojawiła się w konsekwencji utraty jednego z typów płciowych (+) lub (–) na poziomie gatunku [12, 31, 36]. Wyjątek stanowią tu gatunki zoofilne, takie jak *T. benhamiae* (Y. Gräser i de Hoog 2016) i *T. mentagrophytes*, gdzie obydwa typy

płciowe były obecne, ale w różnych proporcjach [56, 57]. Na podstawie tych badań można wnioskować, że klonalne procesy bezpłciowe są dominującym sposobem rozmnażania się wszystkich dermatofitów antropofilnych i większości zoofilnych [12, 36]. Podkreślenia wymaga też różnica w typach propagul rozmnażania bezpłciowego (konidiów) zależna od stadium życiowego, w którym znajduje się grzyb [16, 19]. W czasie rozwoju w obrębie struktur włosa lub naskórka strzępki grzyba ulegają fragmentacji w celu wytworzenia licznych przetrwalnych, małych artrokonidii, stanowiących zarazem elementy infekcyjne [40]. Z kolei bezpłciowe rozmnażanie grzybów *in vitro* daje zupełnie inne pokolenie zarodników, określanych makro- i mikrokonidiami [11, 16, 17, 21, 22].

Ciekawych obserwacji dokonali Anzawa i wsp., [2] którzy wykazali możliwość zachodzenia procesu płciowego pomiędzy wysoce kompetentnym szczepem testowym *A. simii*, wytwarzającym płodne pokolenie, a szczepem *T. rubrum*. W wyniku krzyżowania tych szczepów uzyskano 35 askospor, z których jedna okazała się hybrydą obydwu krzyżowanych szcze-

pów tych dwóch gatunków. Wydaje się, że dermatofity posiadły atawistyczną zdolność wymiany materiału genetycznego w wyniku rozmnażania płciowego w odpowiedzi na niekorzystne warunki, np. stresujące warunki nowo zasiedlonego (kolonizowanego) środowiska [12]. W rzeczywistości różne nisze ekologiczne w przypadku gatunków antropofilnych (*T. rubrum*) i zoofilnych (*A. simii*) ograniczają możliwości spotykania się w naturze szczepów o różnych preferencjach ekologicznych [2].

5. Ekologiczny podział dermatofitów

Duże różnice między gatunkami dermatofitów można dostrzec w odniesieniu do ich naturalnego środowiska występowania. Dotychczas opisano trzy grupy ekologiczne dermatofitów: antropofilne, zoofilne i geofilne (Tabela I). Niejednokrotnie zaklasyfikowanie poszczególnych gatunków do typu ekologicznego jest niemożliwe z powodu niewystarczających różnic fenotypowych i braku molekularnego wyznacznika [40, 43, 44]. Gatunki antropofilne naturalnie kolonizują wytwory naskórka człowieka, przenosząc się między gospodarzami i powodując przewlekłe, ale łagodnie przebiegające infekcje głównie w obrębie gatunku *Homo sapiens* [15, 40]. Transmisja zakażenia na zwierzęta aczkolwiek sporadyczna jest uznawana za możliwą [40].

Gatunki zoofilne bytują na zwierzętach, ich przeniesienie na ludzi jest możliwe i częste, a odbywa się zwykle poprzez rezerwuary, którymi mogą być same zwierzęta, ich sierść lub przedmioty, z którymi miały styczność [16–20, 40, 43, 44]. Dermatofity zoofilne izolowane od zwierząt, odpowiedzialne są za infekcje objawowe, ale niejednokrotnie bytują również bezobjawowo, czyniąc zwierzę nosicielem i w tym przypadku mogą stać się źródłem epidemii [19, 20]. Naturalnym miejscem bytowania dermatofitów geofilnych jest gleba, często wokół siedlisk (nor, jam) określonych ssaków lądowych [5]. Ta grupa grzybów może być przenoszona przez zwierzęta mechanicznie na powłokach zewnętrznych [5, 15, 19], imitując bezobjawowe nosicielstwo, stąd różnica między dermatofitami geofilnymi i zoofil-

nymi nie zawsze jest ostra. Dodatkowo, gdy transmisja odbywa się na człowieka, gatunki zoo- i geofilne powodują grzybice o ostrym przebiegu z silnie wyrażonymi objawami reakcji zapalnej [16, 20, 22]. Dowody naukowe wskazują na zjawisko wysokiej zakaźności dermatomykoz zoofilnych wśród ludzi. Niejednokrotnie prowadzą do powstawania ostrych ognisk infekcji z wyraźnym pierścieniem na brzegu zmiany świadczącym o silnym procesie zapalnym [20, 54]. Z kolei większość infekcji powodowanych przez dermatofity geofilne ma przebieg łagodny, a ogniska mają charakter samoograniczający się [15, 54].

W toku prowadzonych w ostatnich latach badań nad filogenezą dermatofitów została zaobserwowana tendencja ewolucyjna, wskazująca zauważalny trend adaptacyjny, od najstarszych dermatofitów geofilnych poprzez zoofilne do grupy dermatofitów antropofilnych. Ostatnia z wymienionych uchodzi za ewolucyjnie najmłodszą, najsłabiej przystosowaną do różnych nisz ekologicznych, a zarazem wąsko wyspecjalizowaną do rozwoju na skórze człowieka [27, 64]. Biologiczne wyjaśnienie tego zjawiska wydaje się być proste. Dostosowanie do życia w stałym środowisku tkanek żywiciela spowodowało wtórną utratę wielu mechanizmów adaptacyjnych, co wyraźnie zauważalne jest w utracie chociażby typów płciowych u antropofilnych gatunków [25, 64]. Natomiast dermatofity geofilne, bytujące w zmiennych warunkach glebowych i podlegające ciągłej konkurencji ze strony innych mikroorganizmów, wykazują szereg cech adaptacyjnych, w tym zdolność rozmnażania płciowego [2, 64]. Ogniwo pośrednie stanowi grupa dermatofitów zoofilnych. Okrywa włosowa zwierząt jako nisza ekologiczna dla grzybów jest bowiem trudniejsza do opanowania niż skeratynizowane tkanki ludzkie, ale z pewnością łagodniejsza niż gleba ekspozowana na zmienne warunki fizyko-chemiczne [47, 64]. Wydaje się, iż wspólnego przodka wszystkich dermatofitów należy poszukiwać pośród gatunków geofilnych [25, 63]. Tak przedstawiona charakterystyka poszczególnych grup dermatofitów wyznacza trzy typy ekologiczne, które chociaż nie są wyraźnie fenotypowo rozróżnialne, są zasadniczo odmiennie przystosowane do środowiska życia i mają również inne znaczenie kliniczne (Tabela I).

Tabela I
Charakterystyka grup ekologicznych dermatofitów

Cecha charakterystyczna	Grupa ekologiczna		
	Antropofile	Zoofile	Geofile
Pochodzenie ewolucyjne	odległe	pośrednie	bliskie
Proces płciowy	brak	możliwy	częsty
Zmiany infekcyjne	niewielkie	umiarkowane	nasilone
Źródło zakażenia	człowiek	zwierzęta (możliwe także środowisko)	środowisko (głównie gleba)
Leczenie	przewlekłe	łatwe, krótkie	samoistne

6. Molekularna rewolucja w taksonomii dermatofitów

Podobnie jak w czasach Ludwika Pasteura, kiedy czyste kultury zrewolucjonizowały mikrobiologię, tak w ostatniej dekadzie XX wieku zastosowanie metod molekularnych zrewolucjonizowało taksonomię dermatofitów i innych grzybów. Jako pierwsze markery molekularne w mykologii wykorzystano sekwencje DNA kodujące białka małej i dużej podjednostki rybosomu [23, 33, 39, 47, 61]. Gräser i wsp. [22, 24] zastosowali w badaniach taksonomicznych grzybów region ITS rDNA (Internal Transcribed Spacer ribosomal DNA), co pozwoliło im sklasyfikować znaczną liczbę gatunków. Ten marker molekularny był wielokrotnie wykorzystywany w późniejszych badaniach [10, 16–20, 25, 35, 42, 61, 63, 66], także w połączeniu z innymi, takimi jak gen beta tubuliny [47, 48] lub gen czynnika translacyjnego 1 [38]. Na podstawie tych badań stwierdzono, że główna topologia rodziny *Arthrodermataceae* jest molekularnie stabilna, ale nie w pełni odpowiada morfologii, ponieważ rodzaj *Trichophyton* wydaje się być polifiletyczny [24, 38, 47, 48]. Filogenetycznie, antropofilne gatunki dermatofitów są najmłodsze ewolucyjnie i ograniczone do kilku zamkniętych klastrow, gatunki zoofilne, zwłaszcza infekujące zwierzęta hodowlane, wiekiem ewolucyjnym zajmują pozycje pośrednią, stanowiąc ogniwo łączące z przodkami, gatunkami geofilnymi [12]. Nowy system taksonomiczny sformalizował te różnice pochodzenia ewolucyjnego, co w zamyśle miało przekładać się na większą użyteczność w diagnostyce laboratoryjnej.

Podczas gdy podejście molekularne w taksonomii dermatofitów było w stanie określić główne trendy ich ewolucji, okazało się ono zawodne w klasyfikacji i identyfikacji kilku epidemiologicznie istotnych gatunków [25]. Ugruntowane w mykologii pary gatunków, takie jak *Trichophyton rubrum* / *T. violaceum*, *T. equinum* / *T. tonsurans* i do pewnego stopnia także trójka *M. audouinii* / *M. canis* / *M. ferrugineum* pozostała nierozróżnialna molekularnie, nawet z zastosowaniem analizy wielolokusowej (multilocus) [12]. Z tego względu jedynym rozwiązaniem tego problemu taksonomicznego może być podejście wielokierunkowe, łączące dane molekularne, ekologiczne, fenotypowe i uwzględniające cykle życiowe tych grzybów.

7. Problemy taksonomiczne w mykologii

Głównym problemem taksonomicznym, często spotykanym w przypadku grzybów środowiskowych, jest nieoczekiwana różnorodność filogenetyczna izolatów, które wcześniej wydawały się fenotypowo monomorficzne [22, 25, 63, 64]. Izolaty o podobnej makro- i mikro-morfologii niejednokrotnie okazują się przynależać do zupełnie innych gatunków, rodzajów, a nawet

grup ekologicznych [22, 40, 60]. Należy zaznaczyć, że sklasyfikowane na podstawie fenotypu dermatofity, pomimo zróżnicowania cech w obrębie równoważnych taksonów, należą zawsze do jednej linii ewolucyjnej, tj. rodziny *Arthrodermataceae* [25]. O wspólnej filogenezie wszystkich dermatofitów świadczyć mogą ich keratynofilne właściwości, które stanowią rzadką cechę w królestwie grzybów [64]. Z kolei ewolucja w obrębie tej rodziny wykazuje silną koherencję z naturalnymi gospodarzami, zwierzętami lub ludźmi, dostarczającymi podstawowy składnik odżywczy – keratynę [63]. Zależność między gatunkiem dermatofitu a gospodarzem odnotowano w literaturze długo przed wprowadzeniem do taksonomii metod molekularnych, a przyczyny upatruje się w zróżnicowaniu struktury keratyny u poszczególnych gatunków żywicieli i zjawisku przystosowania patogenu do żywiciela [8].

Drugim, aktualnym w mykologii problemem taksonomicznym jest koncepcja gatunków molekularnych [22, 25]. Długie lata po wprowadzeniu genetycznego kryterium do taksonomii obowiązywała reguła mówiąca, że w królestwie grzybów liczba gatunków określonych na podstawie badań molekularnych jest znacznie większa niż ta, która została zdefiniowana w oparciu o konwencjonalne metody fenotypowe [3, 13, 21]. W literaturze dostępne są dane na temat mnogości typów genetycznych *Aspergillus fumigatus* (Fresen. 1863) [3], *Candida parapsilosis* (Langeron i Talice 1932) [13] lub *Aureobasidium pullulans* (G. Arnaud 1918) [21], które potwierdzają ten pogląd. Dermatofity wydają się być jednak wyjątkowe pod tym względem. W ciągu ostatnich 150 lat badań mykologicznych, skoncentrowanych głównie w ośrodkach europejskich z powodu dużej częstotliwości i różnorodności chorób powodowanych przez te grzyby, opisana została ogromna liczba fenotypów i genotypów dermatofitów [21]. Obecnie na kontynencie europejskim, w oparciu o kryteria genetyczne zidentyfikowano 10 gatunków dermatofitów antropofilnych [12]. Jednakże w Atlasie Grzybów Klinicznych [11, 12] wymienione zostało 103 taksony tego typu, a w literaturze badacze posługują się aż 242 nazwami synonimicznymi na opisanie tych samych 10 gatunków [12, 15]. Tym samym, wydaje się, że w przypadku dermatofitów różnorodność gatunkowa obserwowana na podstawie wyników klasycznej identyfikacji jest znacznie większa niż realnie istniejąca różnorodność genetyczna. Możemy wnioskować, że antropofilne, a przypuszczalnie także zoofilne, dermatofity zostały sklasyfikowane sztucznie, co doprowadziło do nagromadzenia równoważnych taksonów, nie mających filogenetycznego uzasadnienia [64]. Podobne zjawiska zawyżenia liczby gatunków widoczne są w innych grupach grzybów o znaczeniu praktycznym, które zostały w związku z tym zbadane *in extenso*. Przykładowo, gatunki *Rhizopus* (Ehrenb. 1821) łatwo rosną w hodowli

in vitro, a ich przemysłowe wykorzystanie rozpoczęło się natychmiast po okresie Pasteura, ze względu na ważną rolę w procesach fermentacji azjatyckich produktów spożywczych na bazie soi [30]. Fenotypowo opisano 43 gatunki synonimiczne *Rhizopus microsporus* (Tiegh. 1875) i *R. arrhizus* (A. Fisch. 1892), które molekularnie zredukowano do zaledwie dwóch [14]. Innym przykładem jest wszechobecna *Alternaria alternata* (Keissl. 1912), zredukowana na podstawie analiz genomów do jednego gatunku, z pierwotnie licznych synonimicznych gatunków wyodrębnionych w oparciu o morfologię konidiów i typów konidioforów [62].

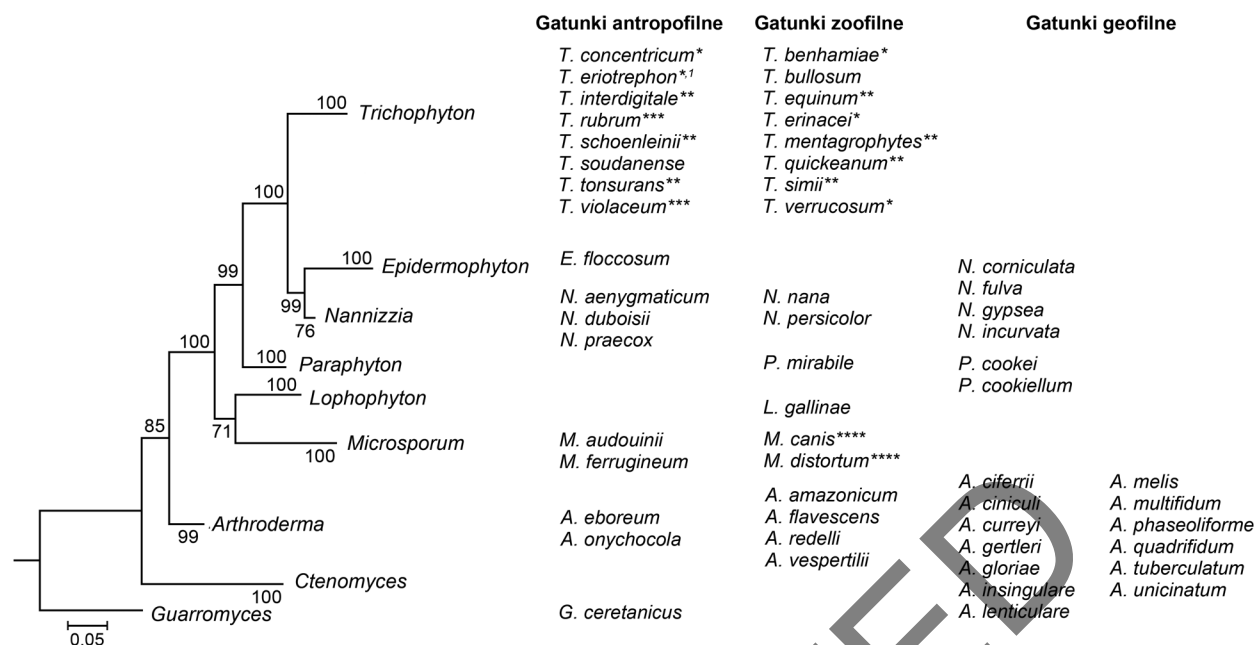
8. Kliniczny aspekt taksonomii dermatofitów

Obecne trzy główne rodzaje dermatofitów *Epidermophyton*, *Microsporum* i *Trichophyton* sklasyfikowane są na podstawie cech morfologicznych. Tylko częściowo odpowiada to ich filogenezie [22]. Najlepszym przykładem są gatunki należące do rodzaju *Trichophyton*, w którym, pomimo że sklasyfikowane są grzyby spełniające morfologiczne kryteria, częściowo mieszczą się dermatofity antropofilne i zoofilne, a częściowo także ich przodkowie, przeważnie gatunki geofilne [23, 24]. W związku z tym, szereg geofilnych gatunków *Trichophyton*, odległych filogenetycznie od przedstawicieli dwóch pozostałych grup ekologicznych i prawie nigdy niepowodujących infekcji u ludzi i zwierząt, jest obecnie rozpatrywanych w rutynowej diagnostyce na równi z patogenami [12, 15, 22]. Z punktu widzenia ekologicznego i klinicznego różnica między tymi grupami jest ogromna, ponieważ gatunki antropofilne i zoofilne są uważane za „prawdziwe” (obligatoryjne) patogeny, ponieważ mają przewagę ewolucyjną i są przenoszone między ludźmi bądź ich transmisja odbywa się ze zwierząt na ludzi [27, 64]. Natomiast przytłaczająca większość gatunków geofilnych jest oportunistami, a ich naturalnym środowiskiem bytowania jest gleba [60]. Połączenie tak wysoce ewolucyjnie odległych grzybów w jednym rodzaju nie jest optymalne i może prowadzić do błędów diagnostycznych. Filogeneza molekularna wyraźnie oddziela dermatofity geofilne od antropofilnych i zoofilnych, co potwierdzają opublikowane wcześniej badania oparte na analizie sekwencji ITS [22], genu czynnika translacyjnego 1 (*TEF1*) [38] i genu kalmoduliny (*CAL*) [1]. System taksonomiczny dermatofitów użyteczny w diagnostyce klinicznej, stanowiący nowoczesne rozumienie identyfikacji, musi odzwierciedlać filogenezę molekularną, dodatkowo popartą danymi pochodzącymi z badań fenotypowych i oceny obrazu klinicznego, a więc powinien być wielokierunkowy [12]. Główne kryteria optymalnego określania gatunków powinny opierać się na koncepcji gatunków biologicznych, tj. możliwości losowego łączenia się

między szczepami tego samego gatunku oraz wydawania płodnego potomstwa i brak takiej możliwości między odrębnymi gatunkami [43, 44]. W praktyce mikrobiologicznej to kryterium często nie jest jednak łatwe do zastosowania. Eksperymenty krzyżowania płciowego były szczególnie pomocne w wyznaczeniu gatunku *Microsporum gypseum* (Guiart i Grigoraki 1928) i kompleksu *T. mentagrophytes* [56–58]. Rozmnażanie płciowe wielu gatunków dermatofitów często nie zostało opisane *ex vivo*, ponieważ warunki, w których produkowane są teleomorfy, są nieznane lub być może naturalnie nie istnieją specyficzne uwarunkowania środowiskowe dla tego procesu [25, 43, 44]. W przypadku populacji tych grzybów przewaga liczebności jednego typu płciowego może prowadzić do preferowania rozmnażania bezpłciowego i wyjaśniać brak zróżnicowania wewnątrzgatunkowego [22, 25]. Wówczas gatunek będzie stanowiła populacja osobników o wysokim stopniu zgodności genetycznej, a koncepcja gatunków biologicznych zostanie wyrażona *in silico* na podstawie analizy podobieństwa genomów [22, 64]. De Hoog i wsp. [12] korzystając z tej koncepcji zaproponowali system taksonomii dermatofitów oparty na sekwencjach czterech regionów genomu: fragmentu ITS, rybosomalnego 60S, genu dużej podjednostki rybosomu (*LSU*) i genu beta-tubuliny (*TUB*). Każdy z nich cechowała inna swoistość, umożliwiając wyodrębnienie różnej liczby taksonów zgodnie z zależnością $ITS > TUB > 60S > LSU$ [12]. Wyniki tych badań wskazują, że sekwencja ITS rDNA jest wystarczająco informatywna do analiz genomów dermatofitów, stanowi zatem optymalny marker w rutynowej diagnostyce, chociaż dla odróżnienia poszczególnych *varietas* niektórych „kompleksów gatunkowych” konieczne jest oparcie identyfikacji gatunkowej na analizie dodatkowych genów i cech fenotypowych [12].

9. Obecnie obowiązujący system klasyfikacyjny

Wnioski z warsztatów mykologicznych zorganizowanych w 2016 roku przez CBS KNAW Fungal Biodiversity Centre (The Centraalbureau voor Schimmelcultures Fungal Biodiversity Centre, Institute of the Royal Netherlands Academy of Arts and Sciences) w Utrecht w Holandii pozwoliły zespołowi kierowanemu przez Sybrena De Hoog [12], zaproponować nowy system klasyfikacji dermatofitów oparty w głównej mierze na kryterium molekularnym. Relacje taksonomiczne między członkami rodziny *Arthrodermataceae* w tym systemie modelowo przedstawia drzewo filogenetyczne skonstruowane na podstawie analiz sekwencji ITS zlokalizowanych w obrębie rDNA (Ryc. 3). W obrębie zamieszczonego filogramu można wyróżnić 7 głównych kladów. Największy z nich obejmuje gatunki z rodzaju



Ryc. 3. Filogeneza i podział ekologiczny najczęściej izolowanych gatunków dermatofitów

Objaśnienie: * *T. benhamiae* complex, ** *T. mentagrophytes* complex, *** *T. rubrum* complex,**** *M. canis* complex, ¹ gatunek sklasyfikowany wyłącznie molekularnie.

Trichophyton, cechujące się polifiletycznym pochodzeniem ewolucyjnym. W jego obrębie znajdują się cztery gatunki zbiorowe (zmienne morfologicznie): *Trichophyton mentagrophytes* kompleks, *Trichophyton benhamiae* kompleks (Y. Gräser i de Hoog 2016), *Trichophyton bulbosum* (Lebasque 1933) i *Trichophyton rubrum* kompleks. Drugi kład zawiera pojedynczy gatunek *Epidermophyton floccosum*, który jest parafiletyczny i ewolucyjnie odległy od pozostałych dermatofitów. Oddzielny kład zawiera dermatofity klasyfikowane jako *Microsporum canis* kompleks, a trzy pozostałe obejmują rodzaje *Lophophyton* (Matr. i Dassonv. 1899), *Paraphyton* (Y. Gräser, Dukik i de Hoog 2016) i *Nannizzia* (Stockdale 1961). Najbardziej zróżnicowany kład zawiera wiele gatunków obecnie znanych pod nazwą teleomorficzną *Arthroderma*. Zewnętrzną gałąź na drzewie filogenetycznym stanowi nowy takson *Guarromyces* (Y. Gräser i de Hoog 2016), do którego przeniesiono opisywany wcześniej antropofilny gatunek *Keratinomyces ceretanicus*.

10. Nerozróżnialne „kompleksy gatunków”

Wyróżnione na podstawie analizy sekwencji ITS w obrębie rDNA tzw. „kompleksy gatunków” są taksonem wyższej rangi, w którym zgrupowane są nierozróżnialne na poziomie ITS gatunki [12, 15]. Chen i wsp. [6] zdefiniowali kompleks gatunków jako populacje różnych gatunków, które są wątpliwie odrębne. W przypadku dermatofitów, kompleks gatunków oznacza tak-

son różniący się genomowo jednoznacznie od innych taksonów rangi gatunku, podczas gdy, przy zastosowaniu tego samego kryterium, nie wykazuje się zróżnicowania poszczególnych gatunków wchodzących w skład kompleksu [12, 25, 35, 47].

Największych trudności w różnicowaniu gatunków w obrębie gatunków zbiorowych (species complex) nastręcza specyficzność ekologiczna dermatofitów. Weźmy pod uwagę *T. mentagrophytes* kompleks, będący jednolitym genomowo kompleksem gatunków *T. mentagrophytes* i *T. interdigitale* (Priestley 1917) [22]. Te dwa gatunki wykazują zupełnie odrębne przystosowania ekologiczne, pierwszy z nich jest stricte antropofilny, drugi – zoofilny [22]. Podobnie, kryterium klasyfikacyjne oparte na ITS rDNA nie umożliwia zróżnicowania zoofilnego *T. equinum* od antropofilnego *T. tonsurans* [12, 22]. Wymienione przykłady dotyczą zasadniczego problemu w mykologii medycznej, uważa się bowiem, że infekcja u ludzi przez dermatofity zoofilne ma przebieg ostry ze znacznym stanem zapalnym, w przeciwieństwie do łagodnych dermatomykoz, których czynnikami etiologicznymi są gatunki antropofilne [5]. Wiarogodne ustalenie granic gatunków dermatofitów, a tym samym trafna identyfikacja gatunkowa, wymaga zatem podejścia wielokierunkowego. Wówczas kumulatywna analiza danych molekularnych, fenotypowych i klinicznych pozwoli wyznaczyć biologiczne ramy poszczególnych taksonów dermatofitów zgodne ze specyfiką ekologiczną tej grupy grzybów [12, 16, 18–20]. Nie ulega wątpliwości, że konieczne są dalsze szczegółowe badania poświęcone temu zagadnieniu.

11. Podsumowanie

Można wnioskować, że taksonomia dermatofitów, zwłaszcza gatunków antropofilnych, jest już wystarczająco dojrzała, aby ustabilizować się z korzyścią dla klinicystów. Aktualnie zdefiniowane taksony prawdopodobnie nie ulegną drastycznym zmianom w najbliższej przyszłości, a prezentowana filogeneza nie okaże się błędna w toku wciąż prowadzonych badań. Czy zatem stabilność nomenklatury dermatofitów została wreszcie osiągnięta? Przegląd aktualnej literatury naukowej nie daje takiej pewności. W niedalekiej przyszłości można się spodziewać pełnego opisu rzadkiego gatunku *Trichophyton erithreum*, podobnie, wciąż trwają szeroko zakrojone badania nad trudnym do zidentyfikowania *Microsporum aenigmaticum*, a gatunki zawleczone z geograficznie odległych obszarów, takie jak *Trichophyton concentricum* ulegną zapewne reklasyfikacji. Uwaga mykologów zwrócona jest w szczególności na grupę dermatofitów geofilnych, wciąż niewystarczająco przebadaną w porównaniu do ich dużej liczby potencjalnych żywicieli i zajmowanych nisz ekologicznych. Dziś gatunki te nie mają większego znaczenia klinicznego, ale, jak głoszą znawcy tematu, ewolucja w drodze życia nie zatrzymuje się na przystankach.

Piśmiennictwo

- Ahmadi B., Mirhendi H., Makimura K., de Hoog G.S., Shidfar M.R., Nouripour-Sisakht S., Jalalizand N.: Phylogenetic analysis of dermatophyte species using DNA sequence polymorphism in calmodulin gene. *Med. Mycol.* **54**, 500–514 (2016)
- Anzawa K., Kawasaki M., Mochizuki T., Ishizaki H.: Successful mating of *Trichophyton rubrum* with *Arthroderma simii*. *Med. Mycol.* **48**, 629–634 (2010)
- Balajee S.A., Gribskov J.L., Hanley E., Nickle D., Marr K.A.: *Aspergillus lentulus* sp. nov., a new sibling species of *A. fumigatus*. *Eukaryot. Cell.* **4**, 625–632 (2005)
- Barry I., Hainer M.D.: Dermatophyte infection. *Am. Fam. Physician.* **67**, 101–109 (2003)
- Cabañes F.J., Abarca M.L., Bragulat M.R., Castellá G.: Seasonal study of the fungal biota of the fur of dogs. *Mycopathologia*, **133**, 1 (1996)
- Chen M., Zeng J., de Hoog G.S., Stielow B., Ende A.H.G., Liao W., Lackner M.: The concept of 'species complex' illustrated by the *Scedosporium apiospermum* species complex. *Fungal. Biol.* **120**, 137–146 (2015)
- Courtellemont L., Chevrier S., Degeilh B., Belaz S., Gangneux J.P., Gangneux R.: Epidemiology of *Trichophyton verrucosum* infection in Rennes University Hospital, France: A 12-year retrospective study. *Med. Mycol.* **55**, 720–724 (2017)
- Currah R.S.: Taxonomy of the onygenales: *Arthrodermataceae*, *Gymnoascaceae*, *Myxotrichaceae* and *Onygenaceae*. *Mycotaxon*. **24**, 1–216 (1985)
- Dawson C.O., Gentles J.C.: The perfect states of *Keratinomyces ajelloi* Vanbreuseghem, *Trichophyton terrestre* Durie and Frey and *Microsporum nanum* Fuentes. *Sabouraudia*, **1**, 49–57 (1961)
- De Baere T., Summerbell R., Theelen B., Boekhout T., Vanechoutte M.: Evaluation of internal transcribed spacer 2-RFLP analysis for the identification of dermatophytes. *J. Med. Microbiol.* **59**, 48–54 (2010)
- de Hoog G.S., Guarro J., Gené J., Figueras M.J.: Atlas of clinical fungi, 3rd web-edition, 2015
- de Hoog G.S., Dukik K., Monod M., Packeu A., Stubbe D., Hendrickx M., Kupsch C., Stielow J.B., Freeke J., Göker M. i wsp.: Toward a Novel Multilocus Phylogenetic Taxonomy for the Dermatophytes. *Mycopathologia*, **182**, 5–31 (2017)
- Diezmann S., Cox C.J., Schönlan G., Vilgalys R.J., Mitchell T.G.: Phylogeny and evolution of medical species of *Candida* and related taxa: a multigenic analysis. *J. Clin. Microbiol.* **42**, 5624–5635 (2004)
- Dolatabadi S., Walther G., Gerrits van den Ende A.H.G., de Hoog G.S.: Diversity and delimitation of *Rhizopus microsporus*. *Fungal Divers.* **64**, 145–163 (2014)
- Dworecka-Kaszak B., Dąbrowska I.: Dermatofity – nowa taksonomia i współczesne metody różnicowania. Przegląd aktualnego stanu wiedzy o mechanizmach patogeny i interakcjach patogen-gospodarz. *Med. Weter.* **73**, 613–617 (2017)
- Gnat S., Łagowski D., Nowakiewicz A., Trościańczyk A., Zięba P.: Infection of *Trichophyton verrucosum* in cattle breeders, Poland: A 40-year retrospective study on the genomic variability of strains. *Mycoses*, **61**, 681–690 (2018)
- Gnat S., Łagowski D., Nowakiewicz A., Zięba P.: Phenotypic characterization of enzymatic activity of clinical dermatophyte isolates from animals with and without skin lesions and humans. *J. Appl. Microbiol.* **125**, 700–709 (2018)
- Gnat S., Nowakiewicz A., Ziółkowska G., Majer-Dziedzic B., Trościańczyk A., Zięba P.: Evaluation of growth conditions and DNA extraction techniques used in the molecular analysis of dermatophytes. *J. Appl. Microbiol.* **122**, 1368–1379 (2017)
- Gnat S., Nowakiewicz A., Łagowski D., Trościańczyk A., Zięba P.: Multiple-strain *Trichophyton mentagrophytes* infection in a silver fox (*Vulpes vulpes*) from a breeding farm. *Med. Mycol.* **57**, 171–180. DOI: 10.1093/mmy/myy011 (2018)
- Gnat S., Nowakiewicz A., Łagowski D., Zięba P.: *Tinea corporis* by *Microsporum canis* in mycological laboratory staff: Unexpected results of epidemiological investigation. *Mycoses*, **61**, 945–953. DOI: 10.1111/myc.12832 (2018)
- Gostinčar C., Ohm R.A., Kogej T., Sonjak S., Turk M., Zajc J., Zalar P., Grube M., Sun H., Han J. i wsp.: Genome sequencing of four *Aureobasidium pullulans* varieties: biotechnological potential, stress tolerance, and description of new species. *BMC Genom.* **15**, 549 (2014)
- Gräser Y., de Hoog G.S., Summerbell R.C.: Dermatophytes: recognizing species of clonal fungi. *Med. Mycol.* **44**, 199–209 (2006)
- Gräser Y., Kuijpers A.F., Presber W., de Hoog G.S.: Molecular taxonomy of *Trichophyton mentagrophytes* and *T. tonsurans*. *Med. Mycol.* **37**, 315–330 (1999)
- Gräser Y., Kuijpers A.F., Presber W., de Hoog G.S.: Molecular taxonomy of the *Trichophyton rubrum* complex. *J. Clin. Microbiol.* **38**, 3329–3336 (2000)
- Gräser Y., Scott J., Summerbell R.: The New Species Concept in Dermatophytes a Polyphasic Approach. *Mycopathologia*, **166**, 239 (2008)
- Gruby D.: Mémoire sur une végétation qui constitue la vraie teigne. *C.R. Acad. Sci.* **13**, 72–75 (1841)
- Havlickova B., Czaika V.A., Friedrich M.: Epidemiological trends in skin mycoses worldwide. *Mycoses*, **51**, 2–15 (2008)
- Howard D.H., Weitzman I., Padhye A.A.: *Onygenales Arthrodermataceae* (w) Pathogenic Fungi in humans and Animals, red. D.H. Howard (.), Marcel Dekker Inc, New York, 2002, s. 141–194
- Hubka V., Dobiasova S., Dobias R., Kolařík M.: *Microsporum aenigmaticum* sp. nov. from *M. gypseum* complex, isolated as a cause of *Tinea corporis*. *Med. Mycol.* **52**, 387–396 (2014)

30. Jennessen J., Schnu J., Rer A., Olsson J., Samson R.A., Dijksterhuis J.: Morphological characteristics of sporangiospores of the tempe fungus *Rhizopus oligosporus* differentiate it from other taxa of the *R. microsporus* group. *Mycol. Res.* **112**, 547–563 (2008)
31. Kano R., Yoshida E., Yaguchi T., Hubka V., Anzawa K., Mochizuki T., Hasegawa A., Kamata H.: Mating type gene (MAT1-2) of *Trichophyton verrucosum*. *Mycopathologia*, **177**, 87–90 (2014)
32. Krzyściak P., Skóra M., Macura A.B.: Atlas grzybów chorobotwórczych człowieka. Medpharm Polska, Wrocław, 2011: 266–297
33. Leclerc M.C., Philippe H., Guého E.: Phylogeny of dermatophytes and dimorphic fungi based on large subunit ribosomal RNA sequence comparisons. *J. Med. Vet. Mycol.* **32**, 331–341 (1994)
34. Macura A.B.: Dermatophytes, pathogens ora saprophytes. *Int. J. Derm.* **34**, 529–539 (1995)
35. Makimura K., Tamura Y., Mochizuki T., Hasegawa A., Tajiri Y., Hanazawa R., Uchida K., Saito H., Yamaguchi H.: Phylogenetic classification and species identification of dermatophyte strains based on DNA sequences of nuclear ribosomal Internal Transcribed Spacer 1 regions. *J. Clin. Microbiol.* **37**, 920–924 (1999)
36. Martinez D.A., Oliver B.G., Gräser Y., Goldberg J.M., Li W., Martinez-Rossi N.M., Monod M., Shelest E., Barton R.C., Birch E. i wsp.: Comparative genome analysis of *Trichophyton rubrum* and related dermatophytes reveals candidate genes involved in infection. *MBio*, **3**, e00259-12 (2012)
37. Mercer D.K., Stewart C.S.: Keratin hydrolysis by dermatophytes. *Med. Mycol.* DOI: 10.1093/mmy/myx160 (2018)
38. Mirhendi H., Makimura K., de Hoog G.S., Rezaei-Matehkolaei A., Najafzadeh M.J., Umeda Y., Ahmadi B.: Translation elongation factor 1- α gene as a potential taxonomic and identification marker in dermatophytes. *Med. Mycol.* **53**, 215–224 (2015)
39. Mochizuki T., Takeda K., Anzawa K.: Molecular markers useful for epidemiology of dermatophytes. *J. Dermatol.* **42**, 232–235 (2015)
40. Moriello K.A., Deboer D.J.: Fungal flora of the coat of pet cats. *Am. J. Vet. Res.* **52**, 602–606 (1991)
41. Negroni R., Bonvehi P., Arechavala A.: Historia y descripción de *Microsporum fulvum*, una especie válida del género descubierta en la República Argentina. *Rev. Argentina Microbiol.* **40**, 47 (2008)
42. Neji S., Trabels H., Hadrich I., Cheikhrouhou F., Sellami H., Makni F., Ayadi A.: Molecular characterization of strains of the *Trichophyton verrucosum* complex from Tunisia. *Med. Mycol.* **54**, 787–793 (2016)
43. Nenoff P., Herrmann J., Gräser Y.: *Trichophyton mentagrophytes sive interdigitale*? A dermatophyte in the course of time. *J. Deutsch. Dermatol. Ges.* **5**, 198–202 (2007)
44. Nenoff P., Krüger C., Ginter-Hanselmayer G., Tietz H.: Mycology – an update. Part 1: Dermatophytes: Causative agents, epidemiology and pathogenesis. *JDDG: J. Deutsch. Dermatol. Ges.* **12**, 188–210 (2014)
45. Nweze E.I.: Dermatophytoses in domesticated animals. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo*, **53**, 95–99 (2011)
46. Ovren E., Berglun L., Nordlind K., Rollman O.: Dermatophytosis: fluorostaining enhances speed and sensitivity in direct microscopy of skin, nail and hair specimens from dermatology outpatients. *Mycoses*, **59**, 436–441 (2016)
47. Pchelin I.M., Zlatogursky V.V., Rudneva M.V., Chilina G.A., Rezaei-Matehkolaei A., Lavnikovich D.M., Vasilyeva N.V., Taraskina A.E.: Reconstruction of phylogenetic relationships in dermatomycete genus *Trichophyton* Malmsten, 1848 based on ribosomal internal transcribed spacer region, partial 28S rRNA and beta-tubulin genes sequences. *Mycoses*, **59**, 566–575 (2016)
48. Rezaei-Matehkolaei A., Mirhendi H., Makimura K., de Hoog G.S., Satoh K., Najafzadeh M.J., Shidfar M.R.: Nucleotide sequence analysis of beta tubulin gene in a wide range of dermatophytes. *Med. Mycol.* **52**, 674–688 (2014)
49. Rippon J.W.: The changing epidemiology and emerging patterns of dermatophyte species. *Curr. Top. Med. Mycol.* **1**, 208–234 (1985)
50. Sabouraud R.J.A.: Maladies du cuir chevelu. 3^{me} partie: Les teignes. Masson, Paris, 1910, 988 pp
51. Seeliger H.P.R.: The discovery of *Achorion schoenleinii*. *Mykosen*. **28**, 161–182 (1985).
52. Stockdale P.M.: *Nannizzia incurvata* gen. nov., sp. nov., a perfect state of *Microsporum gypseum* (Bodin) Guiart et Grigorakis. *Sabouraudia*, **1**, 41–48 (1961)
53. Stockdale P.M.: Sexual stimulation between *Arthroderma simii* Stockd., Mackenzie and Austwick and related species. *Sabouraudia*, **6**, 176–181 (1968).
54. Subelj M., Marinko J.S., Učakar V.: An outbreak of *Microsporum canis* in two elementary schools in a rural area around the capital city of Slovenia, 2012. *Epidemiol Infect.* **142**, 2662–2666 (2014).
55. Summerbell R.C.: Form and function in the evolution of dermatophytes. *Revta. Iberoam. Micol.* **17**, 30–43 (2000)
56. Symoens F., Jousson O., Packeu A., Fratti M., Staib P., Mignon B., Monod M.: The dermatophyte species *Arthroderma benhamiae*: intraspecific variability and mating behavior. *J Med Microbiol.* **62**, 377–385 (2013)
57. Symoens F., Jousson O., Planard C., Fratti M., Staib P., Mignon B., Monod M.: Molecular analysis and mating behaviour of the *Trichophyton mentagrophytes* species complex. *Int. J. Med. Microbiol.* **301**, 260–266 (2011)
58. Takashio M.: Une nouvelle forme sexuée du complexe *Trichophyton mentagrophytes*, *Arthroderma vanbreuseghemii*. *Annales Parasit.* **48**, 713–732 (1973)
59. Weitzman I., Salkin I.F., Rosenthal R.A.: Evaluation of *Trichophyton* agars for identification of *Trichophyton soudanense*. *J. Clin. Microbiol.* **18**, 203–205 (1983)
60. Weitzman I., Summerbell R.C.: The dermatophytes. *Clin. Microbiol. Rev.* **8**, 240–259 (1995)
61. White T.J., Bruns T., Lee S., Taylor J.W.: Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics (w) PCR protocols: a guide to methods and applications, red. M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky, T.J. White, New York Academic Press Inc; 2007, s. 315–322
62. Woudenberg J.H.C., Groenewald J.Z., Binder M., Crous P.W.: *Alternaria* redefined. *Stud. Mycol.* **75**, 171–212 (2013)
63. Wu Y., Yang Z., Yang F., Liu T., Leng W., Chu Y.: Recent dermatophyte divergence revealed by comparative and phylogenetic analysis of mitochondrial genomes. *BMC Genomics*, **10**, 238 (2009)
64. Zhan P., Liu W.: The changing face of dermatophytic infections worldwide. *Mycopathologia*, **182**, 77–86 (2017)
65. Ziolkowska G., Wawrzekiewicz K. Screening of the enzymatic activity of *Microsporum canis* field strains. *Annales UMCS Sect D.* **L**, 11–20 (1995)
66. Ziolkowska G., Nowakiewicz A., Gnat S., Trościańczyk A., Majer-Dziedzic B., Zięba P.: Molecular identification and classification of *Trichophyton mentagrophytes* complex strains isolated from humans and selected animal species. *Mycoses*, **58**, 118–126 (2015)