

Molekulární epidemiologie dermatofytóz v České republice – výsledky dvouleté studie

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

SOUHRN

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

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

SUMMARY

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

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

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

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

ÚVOD

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

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

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

MATERIÁL A METODY

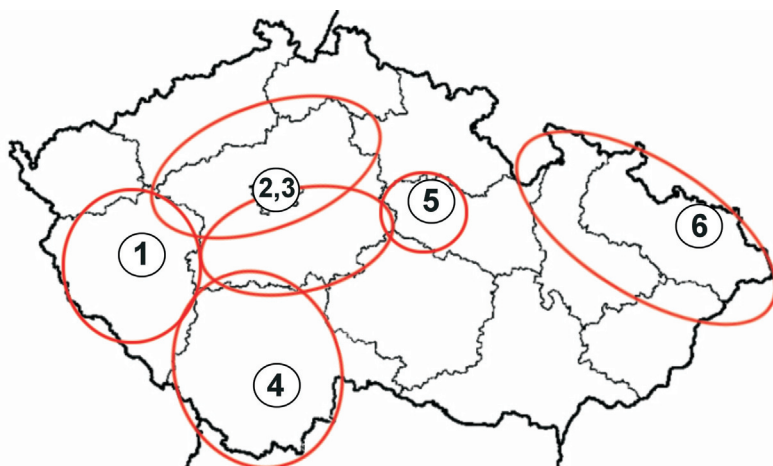
Pacienti

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

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

Molekulárně genetické metody

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



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

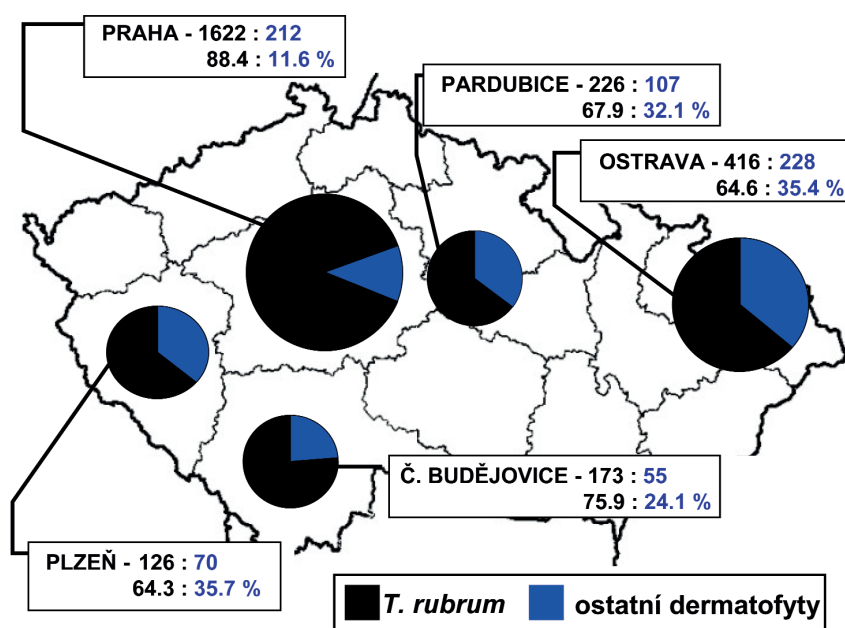
GAGG-GTGGCGGTTCT). PCR reakční směsi byly připraveny v objemech 18,5 µl. Každá směs obsahovala 100 ng DNA, 25 mmol MgCl₂ (Promega Corp., Madison, USA), 0,4 mmol dNTPs (Promega Corp.), 1 U PerfectTaq DNA polymerázy (5Prime, Gaithersburg, USA) s odpovídajícím pufrem a 20 pmol M13-core primeru. Reakce probíhala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

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

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

Trichophyton rubrum

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



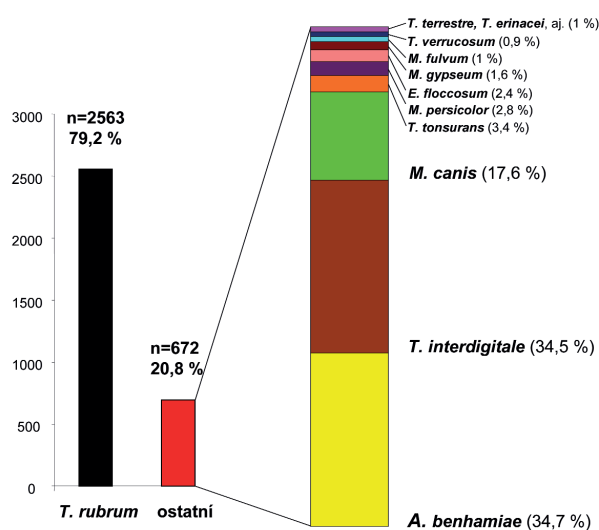
Obr. 2. Poměr izolátů *T. rubrum* v porovnání s ostatními druhy dermatofytů na jednotlivých pracovištích

VÝSLEDKY

Druhové spektrum

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

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



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

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

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

Tinea unguium a tinea pedis

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Tinea corporis

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

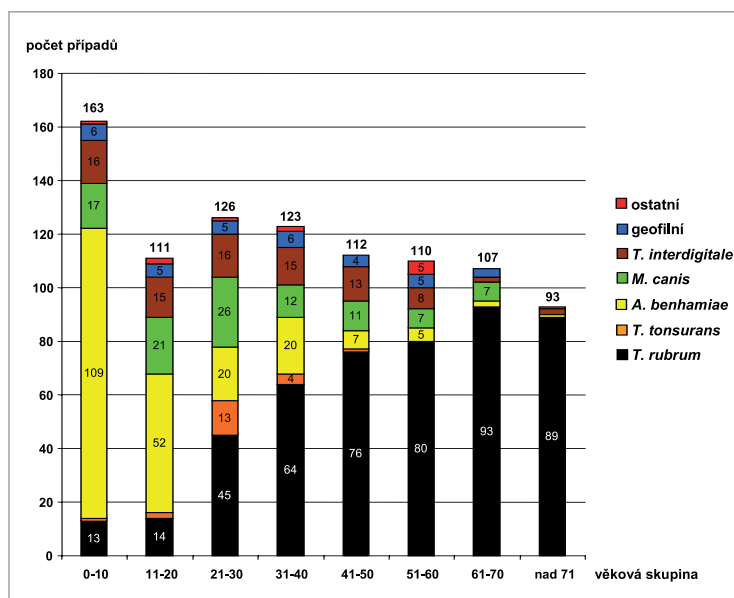
padů byla vyvolána *M. persicolor* (viz tab. 4) bez rozdílu ve frekvenci mezi muži a ženami. Naproti tomu všechny infekce vyvolané *M. fulvum* (n = 7) byly zjištěny u žen (viz tab. 4) ve věku 37–63 let a časově, ani místně spolu nesouvisely.

Tinea capitis

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

DISKUSE

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



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

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

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

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

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

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

LITERATURA

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

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

Poděkování

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

Grantové podpory: GAUK 1344214, IGA_LF_2014_021.

Do redakce došlo dne 3. 7. 2014.

Adresa pro korespondenci:

Mgr. Vít Hubka

Katedra botaniky, Přírodovědecká fakulta,

Univerzita Karlova v Praze

Benátská 2

128 01 Praha 2

e-mail: hubkova@biomed.cas.cz