



ORIGINAL

## Estudio taxonómico de aislamientos clínicos de *Trichophyton* en Rosario, Argentina

Mirta L. Tartabini<sup>a,\*</sup>, Guillermo S. Bonino<sup>a</sup>, Liliana Racca<sup>b</sup> y Alicia G. Luque<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Centro de Referencia de Micología (CEREMIC), Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario, Rosario, Argentina

<sup>b</sup> Área Estadística, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario, Rosario, Argentina

Recibido el 14 de agosto de 2013; aceptado el 5 de noviembre de 2013

### PALABRAS CLAVE

*Trichophyton*;  
Taxonomía;  
Dermatofitosis

### Resumen

Debido al pleomorfismo y la variabilidad cultural que presentan las especies del género *Trichophyton*, los métodos de identificación basados exclusivamente en caracteres morfológicos a menudo no son suficientes para su clasificación. El objetivo de este estudio fue probar un conjunto de métodos fenotípicos para identificar aislamientos fúngicos pertenecientes al género *Trichophyton* empleando una técnica de taxonomía molecular como método de referencia. Se utilizaron 56 aislamientos clínicos y 6 cepas de referencia, con los que se realizaron estudios macro y micromorfológicos, así como las siguientes pruebas bioquímicas y fisiológicas: perforación del pelo *in vitro*, requerimientos nutricionales en medios agar *Trichophyton*, producción de ureasa y crecimiento en el medio agar púrpura de bromocresol-leche-glucosa (APBC-L-G). A su vez se realizó una PCR *fingerprinting* utilizando el cebador simple (GACA)<sub>4</sub>. Como resultado de la reacción de PCR se observaron perfiles específicos bien diferenciables para *Microsporum canis*, *Epidermophyton floccosum*, *Trichophyton rubrum* y *Trichophyton interdigitale*, pero un mismo perfil para *Arthroderma benhamiae* y *Trichophyton erinacei*. Del total de los aislamientos clínicos evaluados, 39 coincidieron con el perfil de *T. rubrum*, 13 con el de *A. benhamiae* y 4 con el de *T. interdigitale*. El ensayo fenotípico más útil para diferenciar *T. rubrum* del complejo *T. mentagrophytes* fue la alcalinización del medio APBC-L-G. Con las pruebas fenotípicas se pudo diferenciar *T. rubrum* de los aislamientos del complejo *T. mentagrophytes*, pero no las especies pertenecientes a dicho complejo. La técnica molecular permitió caracterizar tanto los aislamientos de *T. rubrum* como los pertenecientes al complejo *T. mentagrophytes*, que en nuestro estudio correspondieron a *T. interdigitale* y *Trichophyton* sp. anamorfo de *A. benhamiae*.

© 2013 Asociación Argentina de Microbiología. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

\* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: mirta.tartabini@hotmail.com (M.L. Tartabini).

**KEYWORDS**

*Trichophyton*;  
Taxonomy;  
Dermatophytosis

**Taxonomic study of clinical isolates of *Trichophyton* in Rosario, Argentina****Abstract**

Due to the pleomorphism and cultural variability displayed by species of the genus *Trichophyton*, the identification methods based solely on morphological features are usually insufficient for their classification. The goal of the present work was to test a set of phenotypic methods in order to identify fungal isolates that belong to the aforementioned genus. These methods were based on a molecular taxonomic technique used as standard. Clinical isolates (56) were used as samples along with 6 reference strains. Macro and micromorphological studies were performed as well as biochemical and physiological tests such as *in vitro* hair perforation, nutritional requirements in *Trichophyton* agar media, urease production and growth on bromocresol purple-milk solids-glucose (BCP-MS-G) agar. Additionally, PCR fingerprinting using the (GACA)<sub>4</sub> primer was employed. As a result of the PCR method, specific profiles were observed for *Microsporum canis*, *Epidermophyton floccosum*, *Trichophyton rubrum* and *Trichophyton interdigitale*. Identical profiles were obtained for *Arthroderma benhamiae* y *Trichophyton erinacei*. Of the total number of clinical isolates, 39 matched the *T. rubrum* profile while 13 corresponded to *A. benhamiae* and 4 to *T. interdigitale*. The most useful phenotypic test to differentiate between *T. rubrum* and *T. mentagrophytes* complex strains was alkalization of the BCP-MS-G medium. Phenotypic tests did not allow differentiation among the *T. mentagrophytes* complex species. On the other hand, the molecular technique allowed characterization of *T. rubrum* isolates as well as of those observed in our study and included in the *T. mentagrophytes* complex: *T. interdigitale* and *Trichophyton* sp., the anamorph of *A. benhamiae*.

© 2013 Asociación Argentina de Microbiología. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

**Introducción**

Los dermatofitos son hongos queratinolíticos productores de micosis superficiales y cutáneas llamadas tiñas, tanto en el hombre como en los animales. Las dermatofitosis se encuentran entre las infecciones de mayor prevalencia en todo el mundo<sup>10</sup>.

Considerando su taxonomía, los dermatofitos comprenden tres géneros anamorfos, *Epidermophyton*, *Microsporum* y *Trichophyton*, y uno teleomorfo, *Arthroderma*.

En el laboratorio del Centro de Referencia de Micología (CEREMIC) en la ciudad de Rosario, Argentina, las especies pertenecientes al género *Trichophyton* representan el 86 % de las dermatofitosis diagnosticadas en nuestro medio.

Los métodos convencionales de identificación de los dermatofitos se basan fundamentalmente en observaciones de las características macro y micromorfológicas de sus colonias, a lo que se agrega la realización de pruebas fisiológicas para los aislamientos atípicos. Debido al pleomorfismo, la variabilidad cultural y la superposición de características morfológicas de los dermatofitos, el estudio fenotípico muchas veces no es suficiente para una correcta clasificación taxonómica, por ello se recurre a las técnicas moleculares.

A través del uso de los métodos genotípicos, los dermatofitos se han mostrado como constituyentes de un grupo homogéneo de especies con una muy baja diversidad genética, a pesar de su alta heterogeneidad fenotípica. Se han utilizado diversas técnicas moleculares aplicadas a la taxonomía de los dermatofitos<sup>11</sup>, entre ellas análisis por RFLP

del ADN mitocondrial<sup>17</sup> y secuenciación del gen de la quitina sintetasa I<sup>12</sup> y de genes de ARN ribosomal nuclear<sup>8,24</sup>, especialmente de las regiones ITS. También se han empleado numerosas técnicas basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)<sup>7,15,22</sup>.

La técnica de PCR *fingerprinting* utilizando el cebador (GACA)<sub>4</sub> produce perfiles específicos para *Microsporum canis*, *Microsporum gypseum*, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton ajelloi* y *Epidermophyton floccosum*, y tres perfiles diferentes para los aislamientos de *Trichophyton mentagrophytes*<sup>5</sup>.

*T. mentagrophytes* comprendía cuatro variedades: *T. mentagrophytes* var. *interdigitale* (antropófilo), *T. mentagrophytes* var. *mentagrophytes* (zoófilo), *T. mentagrophytes* var. *quinckeanum* (zoófilo) y *T. mentagrophytes* var. *erinacei* (zoófilo). Sobre la base de los conocimientos actuales a partir de los análisis de biología molecular, se han propuesto modificaciones a dicha clasificación, como la de utilizar el nombre *T. mentagrophytes* solo para referirse a *T. mentagrophytes* var. *quinckeanum*, causante de favus en ratones, mientras que *T. mentagrophytes* var. *interdigitale* se conoce ahora como *Trichophyton interdigitale*; esta especie se ha asociado por técnicas moleculares a *Arthroderma vanbreuseghemii*<sup>25</sup>.

*T. mentagrophytes* var. *erinacei* es ahora considerado una especie distintiva denominada *Trichophyton erinacei*, que se ha aislado principalmente de erizos y roedores<sup>10,16</sup>. El denominado complejo *T. mentagrophytes sensu lato* está constituido por las tres especies ya mencionadas, y además incluye *Trichophyton* sp. anamorfo de *Arthroderma benha-*

*miae*, indistinguible morfológicamente de otros miembros del complejo *T. mentagrophytes*<sup>16</sup>.

El complejo *T. rubrum* comprende actualmente dos especies antropofílicas: *T. rubrum* y *Trichophyton violaceum*. Un estudio reciente demostró que *T. rubrum* está distribuido geográficamente en dos poblaciones, una de origen africano y la otra encontrada en el resto del mundo<sup>9</sup>. La primera causa sobre todo tinea capitis y tinea corporis, y la otra se asocia a la aparición de tinea pedis y tinea unguium. La población africana de *T. rubrum* incluye, entre otras, las especies anteriormente denominadas *Trichophyton soudanense* y *Trichophyton megninii*.

La identificación a nivel de especie de los dermatofitos que producen infecciones es importante, ya que la profilaxis y el tratamiento pueden variar dependiendo de la especie involucrada. Por ello y por las dificultades que presenta la taxonomía de estos hongos, nos propusimos en este trabajo aplicar un conjunto de métodos fenotípicos para realizar la identificación de cepas de *Trichophyton* aisladas en nuestro medio, empleando una técnica de taxonomía molecular como método de referencia para su análisis, con el fin de seleccionar las técnicas más útiles que podrían ser empleadas en el laboratorio clínico de micología.

## Materiales y métodos

### Aislamientos

Se emplearon 56 aislamientos fúngicos pertenecientes al género *Trichophyton* obtenidos a partir de muestras clínicas provenientes de pacientes atendidos en el CEREMIC de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas de la UNR. Dichos aislamientos fueron identificados a nivel de género sobre la base de las características macro y micromorfológicas. Además se utilizaron las siguientes cepas de colecciones de cultivos como patrones: *T. rubrum* (CECT=2794), *T. mentagrophytes* var. *erinacei* (CECT=2956) *T. interdigitale* (CECT=2958) y *A. benhamiae* (CECT=2793); (CECT= Colección Española de Cultivos Tipo, Universidad de Valencia, España). *M. canis* (CCC=159-2001), *E. floccosum* (CCC=150-2002); (CCC= Colección de Cultivos del CEREMIC). Estas últimas dos cepas de referencia se usaron solo para realizar la reacción de PCR. Los aislamientos clínicos y las cepas de referencia pertenecientes al género *Trichophyton* se emplearon para realizar todos los estudios fenotípicos y la reacción de PCR.

### PCR fingerprinting

El ADN fue extraído por una mini-preparación rápida de ADN para PCR<sup>14</sup>. Las reacciones de amplificación se realizaron de acuerdo a Faggi *et al.*<sup>5</sup>. Se empleó un control negativo cada vez que se realizó este experimento, con los mismos componentes de la reacción con la excepción del ADN molde. Las reacciones fueron realizadas en un termociclador (M. J. Research). Cada una de las reacciones se realizó con 3 repeticiones. Los productos se analizaron por electroforesis en geles de agarosa, teñidos posteriormente con bromuro de etidio y visualizados bajo luz UV.

### Macromorfología

Los aislamientos se sembraron en agar Sabouraud glucosa (ASG), agar lactrimel (AL) y agar papa dextrosa (APD). Los cultivos se incubaron a 28 °C.

### Micromorfología

Se sembraron los aislamientos en los medios de cultivo ASG y agar papa zanahoria (APZ), se incubaron a 28 °C y se observaron en microscopio óptico (400X y 1000X).

### Pruebas bioquímicas y fisiológicas

Se realizaron las siguientes pruebas acerca de requerimientos nutricionales: agar *Trichophyton* 1-4 (Difco, EE.UU.)<sup>4</sup>, producción de ureasa por el método de Christensen<sup>19</sup>, perforación del pelo *in vitro*<sup>13</sup> y alcalinización en el medio agar púrpura de bromocresol-leche-glucosa (APBC-L-G)<sup>23</sup>.

### Estudio estadístico

Para estudiar la dependencia entre la especie caracterizada por biología molecular (complejo *T. rubrum* y complejo *T. mentagrophytes*) y los resultados de cada una de las técnicas clásicas (ureasa, perforación del pelo *in vitro* y APBC-L-G), se aplicó el test Chi-cuadrado y se calcularon las *odds ratios* y sus respectivos intervalos de confianza, para obtener una medida de la asociación existente<sup>1,6</sup>. El estudio estadístico se realizó con el programa R versión 2.15.1<sup>18</sup>.

## Resultados

Para la identificación a nivel de especie se consideró como método de referencia el resultado obtenido con la técnica de PCR *fingerprinting*. En la tabla 1 se presentan los resultados de las pruebas bioquímicas y fisiológicas y de la PCR *fingerprinting* de las 4 cepas de referencia pertenecientes al género *Trichophyton* y de los 56 aislamientos clínicos.

### PCR fingerprinting

Con esta técnica se observaron perfiles de amplificación diferentes para las cepas de referencia de *M. canis*, *E. floccosum*, *T. rubrum* y *T. interdigitale*, y un mismo perfil para *A. benhamiae* y *T. erinacei*. El análisis de los perfiles de amplificación de las cepas estudiadas nos permitió observar que 39 de las cepas presentaron un perfil idéntico al obtenido con la cepa patrón de *T. rubrum*; de las cepas restantes, 13 exhibieron un perfil similar al del patrón de *A. benhamiae* (perfil I) y las otras 4 tuvieron un perfil coincidente con el observado para el patrón de *T. interdigitale* (perfil II).

### Macromorfología

Con respecto a la pigmentación del reverso en los medios APD y AL, solo el 46,15 % de las cepas de *T. rubrum* presentaron pigmento rojo vinoso. En cuanto al aspecto de las colonias, todos los aislamientos que correspondieron al perfil de *T. rubrum* o al perfil II y los 7 correspondientes al

**Tabla 1** Evaluación mediante pruebas bioquímicas y fisiológicas y por PCR *fingerpringting* de 4 cepas de referencia y 56 aislamientos de *Trichophyton* provenientes de materiales clínicos

Aislamientos n	Prueba de la ureasa	APBC-L-G	Perforacion del pelo <i>in vitro</i>	Perfil de la PCR <i>fingerpringting</i>
CECT2794	—	—	—	Perfil de <i>T. rubrum</i>
CECT2793	+	+	+	Perfil I
CECT2958	+	+	+	Perfil II
CECT2956	—	+	+	Perfil I
25	—	—	—	Perfil de <i>T. rubrum</i>
10	+	—	—	Perfil de <i>T. rubrum</i>
1	—	—	+	Perfil de <i>T. rubrum</i>
1	+	—	+	Perfil de <i>T. rubrum</i>
2	—	+	—	Perfil de <i>T. rubrum</i>
10	+	+	+	Perfil I
3	—	+	+	Perfil I
3	+	+	+	Perfil II
1	+	+	—	Perfil II

APBC-L-G: alcalinización en el medio agar púrpura de bromo cresol-leche-glucosa.

CECT, N.° 2794: *Trichophyton rubrum*.

CECT, N.° 2793: *Arthroderma benhamiae*.

CECT, N.° 2958: *Trichophyton interdigitale*.

CECT, N.° 2956: *Trichophyton erinacei*.

perfil I presentaron superficie algodonosa, mientras que los 7 aislamientos restantes con perfil I fueron pulverulentos.

### Micromorfología

Los aislamientos que finalmente fueron identificados como *T. rubrum* presentaron microconidios en forma de lágrima, a veces acompañados de otros con forma esférica. Una de las cepas, que fue aislada de un paciente africano con tinea capitis, fue identificada por sus caracteres morfológicos como *T. soudanense*<sup>2</sup>, esta presentó hifas más gruesas, fuertemente septadas y desarticuladas, con microconidios piriformes y en forma de clava. Las cepas que fueron identificadas como pertenecientes al complejo *T. mentagrophytes* presentaron una abundante producción de microconidios, con predominio de aquellos de forma esférica, aunque también estuvieron acompañados en muchos aislamientos por microconidios en forma de lágrima.

### Desarrollo en agar *Trichophyton*

Ninguna cepa presentó requerimiento nutricional de tiamina para su desarrollo, por lo tanto ninguno de los aislamientos fue identificado como *T. tonsurans*.

### Producción de ureasa

En el 72,50 % de las cepas identificadas como *T. rubrum* se obtuvieron resultados negativos; sin embargo hubo un

27,50 % que dieron resultado positivo. De todas las cepas identificadas como pertenecientes al complejo *T. mentagrophytes*, solamente 4 presentaron resultados negativos.

### Perforación del pelo *in vitro*

A excepción de uno de ellos, los aislamientos pertenecientes al complejo *T. mentagrophytes* dieron todos resultados positivos. Las cepas de *T. rubrum* dieron resultados negativos para esta prueba, salvo dos de ellas que fueron positivas.

### Alcalinización en el medio agar púrpura de bromo cresol-leche-glucosa (APBC-L-G)

Todas las cepas pertenecientes al complejo *T. mentagrophytes* y 2 de *T. rubrum* produjeron la alcalinización del medio APBC-L-G a los siete días de incubación, mientras que las cepas restantes fueron negativas en este ensayo.

La distribución de los 39 aislamientos identificados como *T. rubrum* en cuanto a su localización en los pacientes fue la siguiente: tinea pedis (13), tinea unguium (14), tinea corporis (7), tinea capitis (1), tinea cruris (2) y tinea manus (2). Los 13 aislamientos identificados como *Trichophyton* sp. anamorfo de *A. benhamiae* correspondieron a tinea pedis (6), tinea corporis (6) y tinea cruris (1). Los cuatro aislamientos identificados como *T. interdigitale* correspondieron a tinea unguium (2), tinea pedis (1) y tinea corporis (1).

## Estudio estadístico

Existe asociación altamente significativa entre la especie determinada por la técnica molecular y el resultado de cada una de las tres técnicas clásicas ( $p \leq 0.0001$ ).

De acuerdo a la estimación puntual de las *odds ratios*, se puede concluir que la prueba de APBC-L-G es la que permite diferenciar mejor entre especies, ya que la posibilidad de que un resultado negativo de APBC-L-G es más de 600 veces mayor para un aislamiento de *T. rubrum* que para uno del complejo *T. mentagrophytes*. Dicha chance es de 361 para un resultado negativo de ataque al pelo y solo de 10 para un resultado negativo de la prueba de ureasa.

## Discusión

En el estudio de las características macromorfológicas, tanto el medio AL como el APD permitieron visualizar mejor los pigmentos producidos por las cepas estudiadas que el medio ASG. Todos los aislamientos que presentaron pigmento rojo vinoso por el reverso fueron identificados como *T. rubrum*; a su vez, ninguna otra especie presentó ese pigmento. Con respecto al estudio de la micromorfología, en el medio APZ se observó una gran variedad de estructuras, tanto en el micelio vegetativo como en el micelio de reproducción, que no se encuentran comúnmente en ASG.

Aunque ASG es el medio de cultivo más utilizado para el aislamiento de dermatofitos a partir de materiales clínicos, muchos de esos hongos no esporulan en este medio y es necesario emplear otros medios de cultivo que estimulen tanto la pigmentación como la conidiación de los dermatofitos<sup>19</sup>. En los aislamientos de *T. rubrum* predominaron los microconidios en forma de lágrima, mientras que en las especies del complejo *T. mentagrophytes* fueron más abundantes los microconidios globosos. Sin embargo, hay aislamientos en los que se observaron ambos tipos de microconidios en similares proporciones, en esos casos no se pudo utilizar dicha característica para la diferenciación entre ambos complejos.

Dentro de las pruebas bioquímicas y fisiológicas disponibles para la identificación de las especies de *Trichophyton*, la alcalinización del medio APBC-L-G demostró ser la más adecuada para la diferenciación entre *T. rubrum* y las especies del complejo *T. mentagrophytes*. El test de perforación del pelo *in vitro* es muy confiable, aunque es más laborioso y el tiempo requerido para obtener los resultados es más prolongado. La prueba de la ureasa, por su parte, no fue útil para la diferenciación entre *T. rubrum* y las especies del complejo *T. mentagrophytes*, ya que presentó porcentajes de resultados falsos positivos más altos que las otras pruebas utilizadas<sup>19</sup>.

De los 39 aislamientos clínicos que presentaron perfil de *T. rubrum* en la PCR *fingerprinting*, 14 mostraron resultados contradictorios en las pruebas fenotípicas. Sin embargo, la reacción de PCR permitió lograr la identificación de dichos aislamientos, por lo tanto, este método es útil cuando las cepas no se pueden clasificar sobre la base de los caracteres fenotípicos. La cepa africana, que en función de sus caracte-

terísticas fenotípicas fue identificada como *T. soudanense*, por la PCR *fingerprinting* presentó perfil de *T. rubrum*, coincidiendo con los resultados obtenidos por métodos moleculares más complejos, como la secuenciación de las regiones ITS del genoma fúngico<sup>10</sup>.

En el trabajo de Faggi *et al.*<sup>5</sup>, con las cepas del complejo *T. mentagrophytes* se obtuvieron tres perfiles diferentes y en nuestra experiencia solamente se observaron dos perfiles de amplificación.

Si bien se logró una clara diferenciación entre *T. rubrum* y los aislamientos del complejo *T. mentagrophytes* considerando aspectos fenotípicos, no fue posible diferenciar entre sí a las especies pertenecientes a este último complejo. Otros autores ya han comunicado la dificultad que existe en diferenciar por fenotipo a las especies incluidas dentro del complejo *T. mentagrophytes*<sup>10,16,25</sup>.

La cepa de referencia de *A. benhamiae* dio el mismo patrón de bandas en la PCR que el de *T. erinacei*, debido a la similitud filogenética entre las mismas<sup>10,25</sup>. Nosotros interpretamos que las 13 cepas con perfil similar al del patrón de *A. benhamiae* corresponderían a *Trichophyton* sp. anamorfo de *A. benhamiae*, ya que en ninguno de los pacientes existió el dato epidemiológico de contacto con erizos, que siempre está presente cuando el agente etiológico es *T. erinacei*<sup>3</sup>.

En la mayoría de los estudios epidemiológicos, *T. interdigitale* es el principal agente de tiñas perteneciente al complejo *T. mentagrophytes*<sup>20</sup>. Nosotros solo identificamos cuatro aislamientos como *T. interdigitale*, esto nos indicaría que en nuestro medio prevalece *Trichophyton* sp. anamorfo de *A. benhamiae* como *Trichophyton* patógeno perteneciente al complejo *T. mentagrophytes*. Para confirmar estos datos sería necesario ampliar el estudio con mayor número de aislamientos de dermatofitos obtenidos a partir de materiales clínicos. Es de destacar que esta es la primera vez que se realiza la identificación de las especies pertenecientes al complejo *T. mentagrophytes* en nuestro país.

Nuestros resultados coinciden con las observaciones de Shehata *et al.*<sup>21</sup>, quienes comprobaron la utilidad de la PCR usando el cebador (GACA)<sub>4</sub>, tanto para diferenciar *T. rubrum* de especies del complejo *T. mentagrophytes* como para caracterizar las especies pertenecientes a este último complejo.

En conclusión, el estudio molecular llevó a una clasificación más clara de las cepas, dado que se obtuvieron perfiles bien diferenciables para *T. rubrum*, *T. interdigitale* y *Trichophyton* sp. anamorfo de *A. benhamiae*. Con respecto a los estudios fenotípicos, consideramos que lo más aconsejable para un análisis de rutina en un laboratorio de micología sería la realización de la alcalinización del medio APBC-L-G, acompañada por estudios macro y micromorfológicos de los aislamientos.

## Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

## Agradecimientos

Agradecemos la colaboración del Área Inglés de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas de la Universidad

Nacional de Rosario, por la traducción del resumen al idioma inglés.

## Bibliografía

- Agresti A. Categorical data analysis, USA: John Wiley & Sons; 1990.
- Arenas R. Micología médica ilustrada. Tercera Edición. McGraw-Hill Interamericana. 2008. p. 85.
- Hsieh Chih-Wei, Sun Pei-Lun, Wu Yu-Hung. *Trichophyton erinacei* infection from a hedgehog: a case report from Taiwan. *Mycopathologia*. 2010;170:417-21.
- de Hoog GS, Guarro J, Gene J, Figueras MJ. Atlas of clinical fungi. 2nd ed. Utrecht/Reus: Centraalbureau voor Schimmelcultures /universitat Roviar i Virgili; 2000. p. 392.
- Faggi E, Pini G, Campisi B, Bertellini C, Difonzo E, Mancianti F. Application of PCR to distinguish common species of dermatophytes. *J Clin Microbiol*. 2001;39:3382-5.
- Fleiss JL, Levin B, Cho Paik M, Fleiss J. Statistical methods for rates and proportions, Third Edition. New York: Wiley; 2003.
- Gräser Y, Elfari M, Presber W, Sterry W, Tietz HJ. Identification of common dermatophytes (*Trichophyton*, *Micrsporium*, *Epidermophyton*) using polymerase chain reactions. *Br J Dermatol*. 1998;138:576-82.
- Gräser Y, Elfari M, Vilgalys R, Kuijpers AFA, De Hoog GS, Presber W and Tietz HJ. Phylogeny and taxonomy of the family *Arthrodermataceae* (dermatophytes) using sequence analysis of the ribosomal ITS region. *Med Mycol*. 1999;37:105-14.
- Gräser Y, Fröhlich J, Presber W, de Hoog GS. Microsatellite markers reveal geographic population differentiation in *Trichophyton rubrum*. *J Med Microbiol*. 2007;56:1058-65.
- Gräser Y, Scott J, Summerbell R. The new species concept in dermatophytes - a polyphasic approach. *Mycopathologia*. 2008;156:239-56.
- Kanbe T. Molecular approaches in the diagnosis of dermatophytosis. *Mycopathologia*. 2008;166:307-17.
- Kano R, Nakamura Y, Watari T, Watanabe S, Takahashi H, Tsujimoto H, Hasegawa A. Molecular analysis of chitin synthase (CHSI) gene sequences of the *Trichophyton mentagrophytes* complex and *Trichophyton rubrum*. *Curr Microbiol*. 1998;37:236-9.
- Kunert J. Growth of keratinolytic and non-keratinolytic fungi on human hairs. A physiological study. *Acta Univ Palacki Olomuc Fac Med*. 1989;122:25-38.
- Liu D, Colofe S, Baird R, Pedersen J. Rapid mini preparation of fungal DNA for PCR. *J Clin Microbiol*. 2000;38:471.
- Mochizuki T, Sugie N, Uchaia M. Random amplification of polymorphic DNA is useful for the differentiation of several anthropophilic dermatophytes. *Mycoses*. 1997;40:405-9.
- Nenoff P, Herrmann J, Gräser Y. *Trichophyton mentagrophytes sive interdigitale?* A dermatophyte in the course of time. *J Dtsch Dermatol Ges*. 2007;5:198-202.
- Nishio K, Kawasaki M, Ishizaki H. Phylogeny of the genera *Trichophyton* using mitochondrial DNA analysis. *Mycopathologia*. 1992;117:127-32.
- R version 2.15.1 (2012-06-22) "Roasted Marshmallows" Copyright (C) 2012 The R Foundation for Statistical Computing. ISBN 3-900051-07-0.
- Robert R, Pihet M. Conventional methods for the diagnosis of dermatophytosis. *Mycopathologia*. 2008;166:295-306.
- Seebacher C, Bouchara JP, Mignon B. Updates on the epidemiology of dermatophyte infections. *Mycopathologia*. 2008;166:335-52.
- Shehata AS, Mukherjee PK, Aboulatta HN, El Akhras A I, Abbadi SH, Ghannoum MA. Single-step PCR using (GACA)<sub>4</sub> primer: utility for rapid identification of dermatophyte species and strains. *J Clin Microbiol*. 2008;46:2641-5.
- Soll DR. The ins and outs of DNA fingerprinting the infectious fungi. *Clin Microbiol Rev*. 2000; 13: 332-70.
- Summerbell RC, Rosenthal SA, Kane J. Rapid method for differentiation of *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes*, and related dermatophyte species. *J Clin Microbiol*. 1988;26:2279-82.
- Summerbell RC, Haugland RA, Li A, Gupta AK. RNA gene internal transcribed spacer 1 and 2 sequences of asexual, anthropophilic dermatophytes related to *Trichophyton rubrum*. *J Clin Microbiol*. 1999;37:4005-11.
- 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*. 2011;301:260-6.