

Prävalenz und Mechanismen von Antimykotikaresistenz bei indischen Dermatophyten

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Dr. med.

an der Medizinischen Fakultät
der Universität Leipzig

eingereicht von: Andreas Ebert

Geburtsdatum, -ort: 04.07.1994, Zwenkau

angefertigt am: Universitätsklinikum Leipzig AöR
 Klinik und Poliklinik für Dermatologie, Venerologie und
 Allergologie

Betreuer: Prof. Dr. med. Uwe Paasch

und angefertigt am: Labor für medizinische Mikrobiologie Mölbis

Betreuer: Prof. Dr. med. Pietro Nenoff

Beschluss über die Verleihung des Doktorgrades vom 20.09.2022

Inhaltsverzeichnis

1	Einführung	1
1.1	Bedeutung von Dermatophyten weltweit und in Indien	1
1.2	Nomenklatorische Herausforderungen in der Erregerdifferenzierung	2
1.3	Pharmakotherapie der Tinea im Wandel	4
1.4	Mögliche Gründe des Therapieversagens.....	5
1.4.1	Rolle topischer Glukokortikoide.....	5
1.4.2	Entwicklungen der <i>In-vitro</i> -Empfindlichkeit von Dermatophyten in Indien	6
1.4.2.1	Terbinafin.....	6
1.4.2.2	Azole.....	7
1.5	Resistenztestung von Dermatophyten.....	8
1.5.1	Bedeutung und Interpretation	8
1.5.2	Methoden der Resistenztestung.....	9
1.5.2.1	Mikrodilution.....	9
1.5.2.2	Agardilution.....	9
1.5.2.3	Molekularbiologische Verfahren	10
1.6	Wirk- und Resistenzmechanismen untersuchter Pharmaka	10
1.6.1	Terbinafin.....	10
1.6.2	Azole.....	12
1.7	Zielstellungen	13
2	Originalarbeit	14
3	Zusammenfassung der Arbeit	27
4	Literaturverzeichnis	31
5	Darstellung des eigenen Beitrags zur Publikation	43
6	Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit	63
7	Lebenslauf	64
8	Publikationen	65
9	Danksagung.....	66

1 Einführung

1.1 Bedeutung von Dermatophyten weltweit und in Indien

Dermatophyten sind Pilze, die die Haut und Hautanhangsgebilde von Mensch und Säugetier befallen. Eine Infektion der Haut ruft typischerweise das klinische Erscheinungsbild einer Tinea bzw. „Ringelflechte“ hervor, welche sich durch ringförmige, rötliche und schuppige Herde auszeichnet (1). Betroffene leiden unter starkem Juckreiz, der in vielen Fällen zu Schlafstörungen und depressiven Verstimmungen führt (2). Zudem haben Patient*innen mit sozialer Stigmatisierung zu kämpfen (2). Das Ausmaß, in dem die Lebensqualität beeinträchtigt ist, ist mit einer Psoriasis vergleichbar (3).

Neben dem hohen Leidensdruck der Patient*innen ist eine immense Prävalenz auffällig. Zwar fehlen bisher große epidemiologische Studien, doch es wird davon ausgegangen, dass 20-25% der Weltbevölkerung unter einer Pilzinfektion der Haut leiden (4). Dabei bestehen große regionale Unterschiede, die u. a. durch klimatische, lebensstilbezogene und sozioökonomische Differenzen bedingt sind. Eine feuchtwarme Umgebung der Haut bietet ideale Wachstums- und Penetrationsbedingungen für Dermatophyten (5, 6). Eine hohe Bevölkerungsdichte erleichtert deren Transmission (7). So scheint das Land Indien prädestiniert für eine hohe Prävalenz von Dermatophyten.

Indische Ärzt*innen beobachten seit 7-8 Jahren eine zunehmende Inzidenz von Tinea-Patient*innen mit chronischem, rezidivierendem und therapieresistentem Verlauf der Erkrankung (8–10). Am häufigsten sind Körperstamm (Tinea corporis) und Schenkelregion (Tinea cruris) betroffen. Aufgrund der rasanten und augenscheinlich flächendeckenden Entwicklung wird diese Situation vermehrt als „Epidemie“ und „public health threat“ eingestuft (8, 11, 12). Große epidemiologische Prävalenzstudien fehlen bislang. Als Ursache der Epidemie werden zahlreiche Faktoren auf Seiten des Wirts (Immunsuppression, z. B. durch lokal angewendete Glukokortikoide), der benutzten Medikamente (Pharmakokinetik) und des Erregers (Resistenz) diskutiert (13).

Des Weiteren ist eine rapide Dynamik des Erregerspektrums der Infektionen auffällig. Weltweit gilt *Trichophyton (T.) rubrum* als häufigster Erreger einer Dermatophytose (7). Viele lokale epidemiologische Studien, die vor 2014 durchgeführt wurden, bestätigten diese Tatsache auch für Indien (14–16). In den letzten Jahren jedoch verdrängten Spezies aus dem *T. mentagrophytes/interdigitale*-Komplex *T. rubrum* als Hauptpathogen. Eine Multicenter-Studie aus dem Jahr 2018 deckte auf, dass zu diesem Zeitpunkt 92.62% der von indischen Patienten isolierten Dermatophyten der Spezies *T. mentagrophytes* zuzuordnen waren (17).

1.2 Nomenklatorische Herausforderungen in der Erregerdifferenzierung

In der Auseinandersetzung mit der aktuellen Literatur zur Epidemiologie der Tinea corporis bzw. -cruris in Indien fällt auf, dass die am häufigsten isolierte Spezies entweder „*T. mentagrophytes*“ oder „*T. interdigitale*“ zugeordnet wird (10, 18). Gleichzeitig sind diese Erreger kaum zusammen in einer Arbeit zu finden. Um den wissenschaftlichen Ergebnisdiskurs zu erleichtern und Missverständnissen vorzubeugen, soll in diesem Abschnitt ein kurzer Überblick über die Nomenklatur der Gattung *Trichophyton* verschafft werden.

Ein Problem bei der Spezies-Zuordnung von Dermatophyten stellt die Tatsache dar, dass innerhalb dieser Gruppe seit Beginn des Jahrtausends umfassende taxonomische Änderungen stattgefunden haben. Diese sollten neuen Erkenntnissen der Molekularbiologie Rechnung tragen, die die bisher auf morphologischen und physiologischen Kriterien basierte Taxonomie revolutionierten (19). Auf der Grundlage von neuen Identifikationsmarkern wie der Internal Transcribed Spacer (ITS)-Region der ribosomalen Pilz-DNA erhielt die Verwandtschaft und Abgrenzung vieler Spezies eine neue Dimension (20), die auch zufriedenstellend mit klinischen und morphologischen Eigenschaften der Dermatophyten korreliert (21). Jedoch ist der Prozess der Klassifikation von Dermatophyten noch nicht als abgeschlossen anzusehen (22).

Nomenklatorische Änderungen betrafen Arten aus dem *T. mentagrophytes/T. interdigitale*-Spezieskomplex besonders häufig. Vor dem Jahr 2000 unterschied man innerhalb eines großen *T. mentagrophytes*-Komplexes unter anderem in die zoophile Subspezies *T. mentagrophytes var.*

mentagrophytes und die anthropophile Subspezies *T. mentagrophytes* var. *interdigitale* (23). Beide schloss man im Jahr 2000 zur Spezies *T. interdigitale* zusammen (21). 2017 wurde wiederum eine Differenzierung dieser Entität vorgeschlagen: Alle zoophilen Subspezies des ehemaligen *T. mentagrophytes*-Komplexes sollten nun „*T. mentagrophytes*“ heißen, während die anthropophilen Arten des Komplexes unter „*T. interdigitale*“ subsumiert werden sollten (19).

Öffentliche Genomdatenbanken wie GenBank (NCBI), die von Forschern für den Sequenzabgleich zur Identifizierung von Dermatophyten genutzt werden, können für eine Sequenz, die nach aktueller Taxonomie als „*T. mentagrophytes*“ eingeordnet werden sollte, noch den „veralteten“ Namen „*T. interdigitale*“ tragen. Dies kann als Ursache für eine unterschiedliche, epidemiologisch scheinbar widersprüchliche Spezieszuordnung isolierter Dermatophyten der letzten Jahre gelten (24).

In einer Multicenter-Studie stellte sich heraus, dass alle von indischen Patienten gewonnenen *T. mentagrophytes*-Stämme einen distinkten, nahezu identischen Genotyp bezüglich der ITS-Region aufwiesen: *T. mentagrophytes* ITS Type VIII (17). Dieser Genotyp ist geografisch der Region Indien zuzuordnen (25). In einer phylogenetischen Studie formte dieser Genotyp zusammen mit Stämmen, die ebenfalls aus indischen Patienten isoliert und als *T. interdigitale* eingeordnet wurden, eine gemeinsame geschlossene Abstammungsgemeinschaft (Klade) (12). Die *T. interdigitale*-Stämme dieser Studie unterschieden sich untereinander durch lediglich 42 Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) im gesamten Genom. Diese Erkenntnisse legen nahe, dass *T. mentagrophytes* ITS Type VIII und jene indischen, als „*T. interdigitale*“ bezeichneten Stämme eng verwandt, wenn nicht sogar klonalen Ursprungs sind. Möglicherweise stellt diese indische Population eine neue, eigenständige Klade innerhalb des *T. mentagrophytes/interdigitale*-Komplexes dar (12).

Diese Hypothese wird durch eine kürzlich erschienene Studie von Tang et al. gestützt: Umfassende Untersuchungen von bisher beschriebenen Entitäten des *T. mentagrophytes/T. interdigitale*-Komplexes globaler Herkunft ergaben, dass sich indische Isolate auf Basis molekularbiologischer und physiologischer Kriterien so weit von nicht-indischen *T. mentagrophytes/T. interdigitale*-Stämmen unterschieden, dass eine neue Spezies „*T. indotineae*“ vorgeschlagen wurde (26). Zusammenfassend ist festzustellen, dass die Taxonomie innerhalb der *Trichophyton*-Gattung einer regen Dynamik unterliegt und noch viel Forschungsbedarf in

dieser Hinsicht besteht. Die Matrix–Assistierte Laser–Desorption–Ionisierung mit Time-of-flight Massenspektrometrie (MALDI-TOF MS) bietet einen interessanten neuen Ansatz für die Identifizierung von Dermatophyten, sofern geeignete Datenbanken aufgebaut werden können (27).

1.3 Pharmakotherapie der Tinea im Wandel

In der Auswahl eines geeigneten Antimykotikums, seiner Dosierung und Applikationsart/-dauer spielen Ausmaß und Lokalisation der Dermatophytose eine wesentliche Rolle. Bei umschriebenen Formen einer Dermatophytose der freien Haut ist ein Therapieversuch mit einem topischen Antimykotikum wie Amorolfin, Azolen (Bifonazol, Clotrimazol, Econazol, Miconazol, Sertaconazol), Ciclopirox-Olamin, Terbinafin oder Tolnaftat gerechtfertigt (28). In der Behandlung einer ausgeprägten und entzündlichen Form einer Tinea corporis/-cruris zählen Terbinafin und Azolantimykotika, insbesondere Itraconazol, zu Medikamenten der Erstlinientherapie mit hervorragenden Erfolgen (11, 29, 30). Über die letzten Jahre wurde in Indien jedoch ein Wirkverlust der bisher eingesetzten Antimykotika beobachtet (31). Etablierte Therapieschemata aus Lehrbüchern und Leitlinien zur Behandlung der Tinea corporis/cruris scheinen ihre Relevanz verloren zu haben (8). Zunehmend muss die Behandlung über längere Zeiten und in höheren Dosierungen erfolgen, um zur Heilung zu führen (8, 32).

Diese Wahrnehmungen lassen sich anhand klinischer Studien objektivieren. In einer 2013 veröffentlichten Studie führte Itraconazol bei einer Tagesdosis von 200 mg nach zweiwöchiger Behandlung indischer Tinea-Patienten zur Heilung in 80% der Fälle (33). Eine Studie von 2019 ergab, dass nach zwei Wochen Behandlung mit Itraconazol (200mg täglich) kein einziger Patient geheilt war (34). Erst nach vier Wochen war eine Heilungsrate von 92% erreicht (34). Dies steht im Einklang mit den Erfahrungen indischer Dermatologen, wonach in der Behandlung mit Itraconazol zunehmend prolongierte Therapiedauern erforderlich sind (8, 35).

Terbinafin kam in den späten 1980er Jahren auf den Markt. In den ersten Jahren danach wurden jeweils für die orale Verabreichung von Terbinafin (250-500 mg täglich) und die topische Anwendung (1%ige Creme) Heilungsraten der Tinea corporis von 80-90% erzielt (36).

In einer im Jahr 2010 durchgeführten indischen Studie betrug der Heilungserfolg bei ausschließlich oral verabreichtem Terbinafin (250 mg) nach vier Wochen 92.86% (37). Im Rahmen einer 2016 durchgeführten Befragung von Ärzt*innen aus verschiedenen Regionen in Indien berichteten die Ärzt*innen bei 92% der Patient*innen einen Behandlungserfolg nach vier Wochen, wenn Terbinafin in doppelter Dosierung (500 mg) gegeben wurde (38). Dasselbe Therapieregime erreichte in einer 2019 veröffentlichten klinischen Studie eine Heilungsrate von 74% (34). Es ist also festzuhalten, dass für vergleichbare Therapieerfolge über die Zeit höhere Dosen von Terbinafin notwendig wurden. Die gewichtsadaptierte Standarddosierung hingegen führte bei nur 30,6% der Patient*innen zum Behandlungserfolg (39).

1.4 Mögliche Gründe des Therapieversagens

Es stellt sich die Frage nach Ursachen dieses beobachteten Therapieversagens. Wie unter 1.1 erwähnt, kommen viele Faktoren auf Seiten der Umwelt, des Wirts, der Medikamente und der Erreger in Frage (11, 13).

1.4.1 Rolle topischer Glukokortikoide

Viele Autoren vermuten einen wesentlichen Einfluss topischer Glukokortikoide auf den Krankheitsverlauf (31, 40, 41). Diese können bei kurzfristigem Gebrauch zur Symptomlinderung beitragen, aber langfristig die zelluläre Immunantwort unterdrücken und zur Persistenz des Erregers in der Haut führen (8). Der Gebrauch topischer Glukokortikoide bei indischen Tinea-Patienten ist ausgesprochen häufig und wird in Studien mit 40 bis 100% angegeben (42–44); gleichzeitig sind die Verschreibungszahlen gestiegen (45). Bei kurzfristiger Anwendung (maximal 1-2 Wochen), gefolgt von einer antimykotischen Monotherapie, können lokal applizierte Glukokortikoide effektiv Entzündungssymptome lindern und möglicherweise die Therapieadhärenz der Patient*innen steigern (46). Andererseits birgt die Unterdrückung der Symptomatik das Risiko eines frühzeitigen Abbruchs der antimykotischen Therapie mit konsekutivem Rückfall und erschwerter Anschlussbehandlung (47). Zudem besteht in Indien ein hohes Missbrauchspotential der Anwendung topischer Glukokortikoide aufgrund einer fehlenden Verschreibungskontrolle und irreführender Werbung (48). Die Hälfte der Patient*innen, die ihre Dermatophytose lokal mit

Glukokortikoiden behandelten, bezogen diese Medikamente ohne vorherige Verschreibung im Sinne einer Selbstbehandlung (49). Die unsachgemäße Anwendung wird durch die Anwendungsdauer topischer Glukokortikoide bei indischen Tinea-Patient*innen veranschaulicht. Im Mittel beträgt diese drei Monate und kann sich bis zu anderthalb Jahren hinziehen (44, 50). Der Beitrag des Missbrauchs topischer Steroide auf den Krankheitsverlauf ist jedoch noch nicht hinreichend anhand kontrollierter klinischer Studien geklärt, und es besteht umfassender Forschungsbedarf.

1.4.2 Entwicklungen der *In-vitro*-Empfindlichkeit von Dermatophyten in Indien

Einen weiteren Erklärungsansatz für ein Therapieversagen stellt die mikrobiologische (*In-vitro*-) Resistenz von Mikroorganismen dar. Dies ist der Fokus der vorliegenden Arbeit. Für die Resistenztestung werden in der Regel minimale Hemmkonzentrationen (MHKs) eines Pharmakon-Spezies-Paares bestimmt. Die MHK bezeichnet die kleinste Konzentration eines antimikrobiellen Wirkstoffs, die zur Wachstumshemmung eines Mikroorganismus führt. Sie ist somit ein Maß für die Medikamentenempfindlichkeit eines Mikroorganismus unter standardisierten Laborbedingungen (51).

Dynamiken der MHK können Hinweise auf die epidemiologische Entwicklung von Resistenzen geben. Bisher existieren keine Studien, die Empfindlichkeiten von Dermatophyten zwischen indischen Regionen oder über die Zeit hinweg vergleichen. Daher soll in diesem Abschnitt auf Grundlage der aktuellen Studienlage versucht werden, ein Bild der Entwicklung von *In-vitro*-Empfindlichkeiten bei *T. mentagrophytes/interdigitale*-Isolaten in Indien zu zeichnen.

1.4.2.1 Terbinafin

Die meisten Untersuchungen zu Antimykotika-Resistenz in Indien wurden bisher an Zentren in Nordindien durchgeführt. Zwei 2014 in Chandigarh bzw. Uttar Pradesh durchgeführte Studien charakterisierten 17 bzw. 18% der von Patient*innen isolierten Stämme als resistent

gegen Terbinafin (18, 43)¹. Eine Studie aus Delhi ergab zunächst für den Untersuchungszeitraum 2014-15 eine Resistenzrate von 22%; im Zeitraum 2016-17 betrug diese Rate in derselben Region 61% (52, 53). Über den gesamten Zeitraum 2014-18 errechnete eine multizentrisch angelegte Studie mit 129 Patient*innen aus Nordindien eine Prävalenzrate von 81% (12). Selbst unter Berücksichtigung oben genannter Einschränkungen ist die Entwicklung dieser Zahlen im Zusammenhang mit der steigenden Inzidenz an Dermatophyten alarmierend.

1.4.2.2 Azole

Bei Tinea-Patienten aus der Region Uttar Pradesh, Nordindien wurden im Jahr 2014 MHK₉₀-Werte² von 0,03 µg/ml für Itraconazol und Voriconazol für *T. mentagrophytes/interdigitale* ermittelt (43). In einer parallel durchgeführten Studie in Chandigarh, Nordindien, fand man wesentlich höhere Werte um 0,5 µg/ml (18). Der Anteil der Patient*innen, die vorher eine antimykotische Therapie erhalten hatten, war vergleichbar (41,2% vs. 32,3%). Die unterschiedlichen MHKs könnten dadurch erklärt werden, dass die zweite Untersuchung in einem Spezialzentrum durchgeführt wurde, wo die Wahrscheinlichkeit der Inklusion von Patient*innen mit kompliziertem, therapieresistentem Krankheitsverlauf in die Studie möglicherweise größer ist.

Längsschnittuntersuchungen zur Azol-Empfindlichkeit bei Dermatophyten in Indien sind bisher nicht durchgeführt worden. Ein Trend ist lediglich durch den Vergleich von Studien abschätzbar. Für die Region Delhi in Nordindien wurde im Zeitraum 2014-15 eine Voriconazol-MHK₉₀ von 0,06 µg/ml für *T. interdigitale* ermittelt (52). In zwei später durchgeführten Studien im Zeitraum 2015-2017 betrugen die MHK₉₀ für Itraconazol 1-2 µg/ml und für Voriconazol 0,5-2 µg/ml, sodass hier ein Anstieg zu vermuten ist (53, 54).

¹ Aus Gründen der Vergleichbarkeit beziehen sich Prävalenzraten in diesem Abschnitt auf eine MHK ≥ 1 µg/ml.

² Der MHK₉₀-Wert bezeichnet die Medikamentenkonzentration, die zur Wachstumshemmung bei 90% der getesteten Isolate führt.

1.5 Resistenztestung von Dermatophyten

1.5.1 Bedeutung und Interpretation

Wie bereits unter 1.4.2. erläutert, repräsentiert die MHK die *In-vitro*-Empfindlichkeit eines antimikrobiellen Wirkstoffs gegen einen Mikroorganismus. Darüber hinaus ist das Ziel einer MHK-Bestimmung, Aussagen über die Wahrscheinlichkeit eines Therapieerfolgs zu treffen. Hierfür werden in der Zusammenschau vieler Parameter wie der MHK-Verteilung, bekannter Resistenzmechanismen, pharmakokinetischer/-dynamischer Eigenschaften und klinischer Ergebnisse MHK-Grenzwerte bestimmt, die die Einstufung eines gegebenen Isolats in sensibel, intermediär und resistent zulassen (51, 55). Ein Isolat gilt so als sensibel, wenn eine antimikrobielle Behandlung in angemessener Dosierung mit hoher Wahrscheinlichkeit erfolgreich ist (56).

Für Dermatophyten existieren bisher keine solcher allgemein anerkannten MHK-Grenzwerte (57, 58). Für eine Festlegung liegen unter anderem noch nicht genügend Daten zum Verhältnis der *In-vitro*-Empfindlichkeit zum therapeutischen Outcome vor. Für Terbinafin jedoch wurde eine Korrelation zwischen MHK-Werten von *T. interdigitale*-Isolaten und dem therapeutischen Ansprechen gezeigt: Die Wahrscheinlichkeit eines Therapieerfolgs war bei Isolaten mit MHK $< 1 \mu\text{g/ml}$ 2,5mal so hoch wie bei Isolaten mit MHK $\geq 1 \mu\text{g/ml}$ (53). In Bezug auf das Kriterium bekannter Resistenzmechanismen wurde gezeigt, dass gewisse Mutationen im Squalenepoxidase (*SQLE*)-Gen der Pilze mit verringerter Terbinafin-Empfindlichkeit assoziiert sind (12, 54, 58–60). Es handelt sich um einzelne Studien mit begrenzter Generalisierbarkeit. Eine definitive Klassifizierung von Dermatophyten anhand von MHK-Werten allein ist nach derzeitigem Kenntnisstand nicht möglich. Nichtsdestotrotz liefern die oben genannten Assoziationen zwischen *SQLE*-Mutationen, MHKs und klinischem Ansprechen auf Terbinafin wichtige Hinweise und machen eine Grenzwertverortung um $1 \mu\text{g/ml}$ für Terbinafin in der Behandlung von *Trichophyton*-Infektionen wahrscheinlich.

1.5.2 Methoden der Resistenztestung

1.5.2.1 Mikrodilution

Als internationaler Goldstandard der Resistenztestung von Pilzen gilt die Mikrodilutionsmethode. Evaluiert wird das Wachstum eines Pilzes in Vertiefungen von Mikrotiterplatten, die ein Nährmedium und aufsteigende Konzentrationen eines Antimykotikums beinhalten. Nach einer definierten Inkubationszeit und -temperatur, beispielsweise 5-7 Tage bei 25°C, kann das Wachstum visuell oder photometrisch evaluiert werden (61). Für die Methode existieren standardisierte Protokolle des Clinical and Laboratory Standards Instituts (CLSI) und des European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) (62, 63). Die Verwendung der Mikrodilutionsmethode zur routinemäßigen Resistenztestung von Dermatophyten stellt eine Herausforderung dar. Sie verlangt einen erheblichen Aufwand an personellen, technischen und zeitlichen Ressourcen, der für Routinelabore in Indien kaum zu stemmen ist (64). Zudem kann die Ablesung durch geringfügige Variationen der Inokulum-Größe, Inkubationszeit, Inkubationstemperatur und individuelle Interpretation beeinflusst werden (51).

1.5.2.2 Agardilution

Die Agardilution stellt eine weitere, seltener durchgeführte Methode zur Resistenztestung von Pilzen dar (65). Die MHK-Bestimmung erfolgt hier auf Grundlage des Pilzwachstums auf Antimykotika-haltigen Nährböden in Petrischalen (66). Die Reliabilität im Vergleich zur Mikrodilution lag in einer Studie bei 81.6% für Terbinafin (67). Die Methode gilt als kostengünstiger, technisch weniger anspruchsvoll und somit störunanfälliger und gut reproduzierbar (64, 66). Ein wesentlicher Vorteil der Methode besteht im Erhalt der Struktur und des natürlichen Wachstumsverhalten des Pilzes (66).

Eine Modifikation des Verfahrens beinhaltet die Verwendung von nur einer Verdünnungsstufe, welche über dem vermuteten MHK-Grenzwert einer Spezies liegt, beispielsweise 0,2 µg/ml Terbinafin für *Trichophyton spp.* (68). So ist eine ressourcensparende Detektion von potenzieller Terbinafin-Resistenz möglich. Yamada et al. identifizierten auf

diese Weise 17 Terbinafin-resistente *Trichophyton*-Stämme unter 2056 Schweizer Isolaten (68). Auch in 20 indischen Isolaten konnte diese Methode zwischen Terbinafin-resistenten (MHK \geq 4 $\mu\text{g/ml}$: starkes Wachstum auf Terbinafin-Agar), intermediären (MHK = 0.25-2 $\mu\text{g/ml}$: geringes Wachstum) und sensiblen (MHK = 0.125 $\mu\text{g/ml}$: kein Wachstum) Stämmen unterscheiden (12).

1.5.2.3 Molekularbiologische Verfahren

Ein wesentliches Problem der konventionellen Empfindlichkeitsprüfungen von Dermatophyten besteht in ihrem enormen zeitlichen Aufwand, bedingt durch das besonders langsame Wachstum von Dermatophyten. Sowohl die Agar- als auch die Mikrodilutionsmethode sind an eine erfolgreiche Kultivierung des Pilzes gebunden, die sich über 4-6 Wochen hinziehen kann. Die Durchführung und Auswertung der Resistenztestung selbst dauert in der Regel einige Tage bis Wochen (18, 39, 58, 66). So ist ein praktikabler Einsatz der konventionellen Verfahren in der Routinetestung von Patient*innen stark limitiert. Hinzu kommt die Tatsache, dass Dermatophyten auf Nährmedien oft nicht anwachsen, obwohl ihr Genmaterial in Patientenproben nachgewiesen werden kann (17). Aus diesen Gründen stellt die direkte molekularbiologische Analyse von resistenzassoziierten Pilzgenen aus Patient*innenproben einen interessanten Ansatz zur Resistenztestung dar (69). Sie könnte die frühe Erkennung von Resistenzen bei Tinea-Patienten und das Monitoring der Resistenzentwicklung im Kontext der Epidemie-ähnlichen Situation in Indien erleichtern.

1.6 Wirk- und Resistenzmechanismen untersuchter Pharmaka

1.6.1 Terbinafin

Terbinafin und andere Vertreter aus der Gruppe der Allylamine hemmen non-kompetitiv und relativ pilzspezifisch das Enzym Squalenepoxidase (*SQLE*) (70). So wird zum einen die Biosynthese von Ergosterol, welches an der Aufrechterhaltung einer intakten Zellmembran beteiligt ist, gestört (71). Zum anderen wird ein fungizider Effekt durch Akkumulation toxischen Squalens erreicht (71). Aufgrund vorteilhafter pharmakokinetischer Eigenschaften

(langes Verbleiben im Stratum corneum), einer guten Toleranz und wenigen Interaktionen zählte Terbinafin lange Zeit zur Erstlinientherapie von Dermatophyosen (13). Die Applikation kann sowohl topisch als auch systemisch erfolgen.

Mukherjee et al. beschrieben 2003 den ersten Fall eines Dermatophyten, der *in-vitro*-resistent gegen Terbinafin war (72). Dieser Stamm wies eine Missense-Mutation im *SQLE*-Gen auf, die zu der Aminosäure-Substitution Leu393Phe im Enzym führt und so die Affinität für Terbinafin verringert (59). Ein anderes Terbinafin-resistentes Isolat wies eine Phe397Leu-Substitution auf (60). Im Folgenden wurden weitere Substitutionen in *Trichophyton*-Stämmen gefunden, die mit Terbinafinresistenz assoziiert sind (61, 68, 73). In einzelnen indischen Studien wurden bisher Phe397Leu und Leu393Phe als Terbinafinresistenz-verursachende Substitutionen identifiziert (12, 18, 53, 54). Sie korrelieren mit erhöhten MHKs gegenüber Terbinafin und einem geringeren therapeutischen Ansprechen (53).

Ob solche resistenzverursachenden Mutationen zwischen Pilzen übertragen werden können, ist noch nicht geklärt. Analysen der Kreuzungstypen von indischen *T. mentagropyhtes/interdigitale*-Isolaten ergaben, dass einige Stämme Allele aufwiesen, die sowohl dem Kreuzungstyp „(+)“ als auch „(-)“ entsprechen (12). Dies ist ein Indiz für eine sexuelle Vermehrung dieser Pilze untereinander (12). Resistenzbegünstigende Allele, beispielsweise mutierte *SQLE*-Gene, könnten so auf die nächste Generation weitergegeben werden (12). Auch Prozesse des horizontalen Gentransfers sind für Pilze beschrieben worden (74).

Mit Resistenz assoziierte *SQLE*-Genotypen könnten als molekulare Resistenzmarker gegen Terbinafin fungieren. Ein großer Vorteil dieser Methode besteht darin, dass die *SQLE*-Sequenzierung direkt aus Hautschuppen von Patienten möglich ist (69) und damit ein erheblicher Zeitgewinn gegenüber herkömmlichen Verfahren der Resistenztestung, die auf wochenlanger Kultivierung des Pilzes basieren, erreicht werden könnte. Jedoch ist nicht auszuschließen, dass andere, bisher unbekannte *SQLE*-Mutationen zu Terbinafin-Resistenz führen können. Daher wurde in der vorliegenden Studie besonderer Wert auf eine hohe Anzahl an Isolaten mit breiter geografischer Diversität gelegt. In bisherigen indischen Studien wurde eine *SQLE*-Sequenzierung meist nur bei Stämmen mit auffallend hohen MHK-Werten durchgeführt. Um auch Terbinafin-sensible Stämme näher zu charakterisieren, erfolgte im Rahmen der vorliegenden Studie eine *SQLE*-Sequenzierung bei allen Isolaten.

1.6.2 Azole

Azolantimykotika greifen, ebenso wie Terbinafin, in den Ergosterolstoffwechsel von Pilzen ein. Unter anderem wirken sie über die Inhibition des Cytochrom-P450 (CYP) 51-abhängigen Enzyms Lanosterol-14 α -Demethylase (75). Dies führt zur Akkumulation methylierter Vorstufen und fungistatischer Aktivität - im Gegensatz zum fungiziden Effekt der Allylamine (76). Azole sind auch sehr potente Inhibitoren menschlicher CYP-Enzyme, beispielsweise von CYP3A4 (77). CYP3A spielt eine große Rolle in der Metabolisierung von ca. 30% aller klinisch relevanten Medikamente und seine Isoform CYP3A4 besitzt gleichzeitig eine erhebliche individuelle Expressionsvariabilität (78). So bergen Azole das Potential zahlreicher Medikamenteninteraktionen (79).

Itraconazol und Voriconazol sind oral applizierbare Pharmaka und gehören zur Gruppe der Triazole, welche sich im Vergleich zu den Imidazolen unter anderem durch ein breiteres Wirkspektrum und ein günstigeres pharmakokinetisches Profil auszeichnen (80). Itraconazol wird seit Jahrzehnten in der Therapie von Dermatophyosen eingesetzt und gilt in Indien als erste Wahl in der Behandlung der chronischen Tinea corporis/cruris (11, 13).

Für die Resistenz von Dermatophyten gegenüber Azolantimykotika sind, im Gegensatz zu den Allylaminen, bisher zahlreiche potentielle Mechanismen identifiziert worden, deren Relevanz im klinischen Setting jedoch noch nicht gezeigt wurde (13). Modifikationen der Zielstruktur, wie sie bei Terbinafinresistenz auftreten, sind für Azole nicht bekannt und bisher nur für *Candida albicans* beschrieben (13, 81). Vielmehr scheinen komplexe, kompensatorische Mechanismen als Reaktion auf den Kontakt mit Noxen abzulaufen. In der Gegenwart von Itraconazol erfolgt bei *T. rubrum* eine gesteigerte Expression von Genen, die eine Rolle in der Ergosterolsynthese, in der Stressantwort und bei der Ausschleusung von toxischen Stoffen spielen (82). Efflux-Pumpen der ATP-binding cassette (ABC)-Familie und der Major-Facilitator-Superfamilie kommt eine herausragende Bedeutung in der Resistenzentwicklung von Pilzen zu (83). Für Dermatophyten (*T. rubrum*) sind die ABC-Transporter TruMDR1, TruMDR2 und TruMDR3 beschrieben, die bei Kontakt mit verschiedenen Triazolen vermehrt exprimiert werden (84–86). Die Ausschleusung erfolgt mit breiter Substratspezifität, sodass der Efflux verschiedener Triazole und anderer Zellnoxen von einer Pumpe realisiert werden

kann (86). Dieses Phänomen ist typisch für ABC-Transporter und kann zu Kreuzresistenzen innerhalb der Gruppe der Triazole führen (83).




In einer experimentellen Studie zeigten sich verringerte Empfindlichkeiten von *T. rubrum*-Isolaten gegen Itraconazol und Fluconazol, nachdem sie wiederholt subinhibitorischen Konzentrationen eines dieser Wirkstoffe ausgesetzt waren (87). Dies veranschaulicht zum einen die Fähigkeit der Herausbildung von Kreuzresistenzen innerhalb der Triazol-Gruppe bei *T. rubrum*. Zum anderen zeigt die Studie den Effekt unzureichender Wirkstoffkonzentrationen: Diese resultierten in verringerten Empfindlichkeiten gegen jene Medikamente. Ob Unterdosierungen von Triazol-Antimykotika auch *in vivo* resistenzfördernd wirken und dieser Umstand klinische Relevanz erreicht, ist noch nicht hinreichend geklärt.

1.7 Zielstellungen

Die vorliegende Arbeit analysiert *In-vitro*-Resistenz gegen Antimykotika bei indischen Dermatophyten als einen möglichen, zur Epidemie beitragenden Faktor. Als Untersuchungsgut dienen Hautschuppen von indischen Patienten mit möglichst großer geografischer Diversität. Diese sollen hinsichtlich des Erregerspektrums und der Empfindlichkeit gegen Terbinafin, Itraconazol und Voriconazol charakterisiert und interregional verglichen werden. Die Mikrodilutionsmethode nach CLSI und eine Agardilutionsmethode werden hinsichtlich der Detektion von Terbinafinresistenz verglichen. Es wird überprüft, inwieweit *In-vitro*-Empfindlichkeit mit Missense-Mutationen im *SQLE*-Gen der Pilze zusammenhängt.

2 Originalarbeit

Alarming India-wide phenomenon of antifungal resistance in dermatophytes: A multicentre study

Andreas Ebert^{1,2}  | Michel Monod³  | Karine Salamin³ | Anke Burmester⁴ | Silke Uhrlaß² | Cornelia Wiegand⁴ | Uta-Christina Hipler⁴ | Constanze Krüger² | Daniela Koch² | Franziska Wittig² | Shyam B. Verma⁵ | Archana Singal⁶ | Sanjeev Gupta⁷ | Resham Vasani⁸ | Abir Saraswat⁹ | Rengarajan Madhu¹⁰ | Saumya Panda¹¹ | Anupam Das¹¹ | Mahendra M. Kura¹² | Akshy Kumar¹³ | Shital Poojary¹⁴ | Sibylle Schirm¹⁵ | Yvonne Gräser¹⁶ | Uwe Paasch¹⁷ | Pietro Nenoff² 

¹Medizinische Fakultät, Universität Leipzig, Leipzig, Germany

²Labor für medizinische Mikrobiologie, Rötha, Germany

³Service de Dermatologie et Vénérologie, Centre Hospitalier Universitaire Vaudois, Lausanne, Switzerland

⁴Klinik für Hautkrankheiten, Universitätsklinikum Jena, Jena, Germany

⁵Nirvan" and "In Skin" Clinics, Vadodara, India

⁶Department of Dermatology and STD, University College of Medical Sciences and GTB Hospital, Delhi, India

⁷M M Institute of Medical Sciences and Research, MM Deemed to be University, Ambala, India

⁸Department of Dermatology, Bhojani Clinic, Mumbai, India

⁹Department of Dermatology, Indushree Skin Clinic, Lucknow, India

¹⁰Department of Dermatology (Mycology), Madras Medical College, Chennai, India

¹¹Department of Dermatology, KPC Medical College, Kolkata, India

¹²Department of Dermatology, Grant Medical College & Sir J J Group of Hospitals, Mumbai, India

¹³Department of Dermatology, Government Medical College, Kota, India

¹⁴Department of Dermatology, K J Somaiya Medical College, Mumbai, India

¹⁵Institut für Medizinische Informatik,

Abstract

Background: An alarming increase in recalcitrant dermatophytosis has been witnessed in India over the past decade. Drug resistance may play a major role in this scenario.

Objectives: The aim of the present study was to determine the prevalence of in vitro resistance to terbinafine, itraconazole and voriconazole in dermatophytes, and to identify underlying mutations in the fungal squalene epoxidase (*SQLE*) gene.

Patients/Methods: We analysed skin samples from 402 patients originating from eight locations in India. Fungi were identified by microbiological and molecular methods, tested for antifungal susceptibility (terbinafine, itraconazole, voriconazole), and investigated for missense mutations in *SQLE*.

Results: *Trichophyton (T.) mentagrophytes* internal transcribed spacer (ITS) Type VIII was found in 314 (78%) samples. Eighteen (5%) samples harboured species identified up to the *T. interdigitale/mentagrophytes* complex, and *T. rubrum* was detected in 19 (5%) samples. 71% of isolates were resistant to terbinafine. The amino acid substitution Phe397Leu in the squalene epoxidase of resistant *T. mentagrophytes* was highly prevalent (91%). Two novel substitutions in resistant *Trichophyton* strains, Ser395Pro and Ser443Pro, were discovered. The substitution Ala448Thr was found in terbinafine-sensitive and terbinafine-resistant isolates but was associated with increased MICs of itraconazole and voriconazole.

Conclusions: The high frequencies of terbinafine resistance in dermatophytes are worrisome and demand monitoring and further research. Squalene epoxidase substitutions between Leu393 and Ser443 could serve as markers of resistance in the future.

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

© 2020 The Authors. *Mycoses* published by Blackwell Verlag GmbH

Statistik und Epidemiologie, Leipzig,
Germany

¹⁶Institut für Mikrobiologie und
Hygiene, Nationales Konsiliarlabor für
Dermatophyten, Universitätsmedizin Berlin
Charité, Berlin, Germany

¹⁷Klinik und Poliklinik für Dermatologie,
Venerologie und Allergologie,
Universitätsklinikum Leipzig, Leipzig,
Germany

Correspondence

Andreas Ebert and Pietro Nenoff, Labor
für medizinische Mikrobiologie, Rötha,
Germany.
Emails: andebe47@gmail.com (A.E.);
nenoff@mykologie-experten.de (P.N.)

KEYWORDS

epidemiology, infectious diseases, mechanisms of resistance, molecular typing, public health, tinea

1 | INTRODUCTION

Superficial dermatophytosis is an infection of the skin or nail that affects 20%-25% of the world's population.¹ Patients suffer from severe itching, sleep disturbance, stigmatisation and depression.^{2,3} Over the past few years, healthcare professionals in India have witnessed a significant increase in the number of patients presenting with dermatophytosis, as well as in the number of difficult-to-treat and recalcitrant cases.⁴ The latter has been attributed to multiple causes including an abuse of irrational fixed drug combination (FDC) creams containing potent steroids, an altered immune response of the host, and microbiological (in vitro) resistance of the causative fungi.^{5,6}

In India, the most common fungi responsible for dermatophytosis belong to the *Trichophyton (T.) mentagrophytes/interdigitale* species complex. These are characterised by a particular genotype called *T. mentagrophytes* internal transcribed spacer (ITS) Type VIII, which is endemic to India and is the cause of an epidemic of tinea cruris and tinea corporis resistant to the widely used drug terbinafine (TRB).⁷⁻⁹ In vitro resistance to TRB has been reported in 17% and 32% of such isolates.^{10,11} Several single point mutations in the fungal squalene epoxidase gene (SQLE), which encodes the target for TRB, have been recorded in *T. rubrum* and *T. mentagrophytes/interdigitale*.^{11,12} These mutations lead to substitutions at one of the four amino acid positions Leu393, Phe397, Phe415 and His440 and were associated with TRB resistance. Recently, more substitutions were discovered, including in other countries such as Denmark.^{13,14}

The objectives of our study were (a) to determine the species pattern and the prevalence of dermatophytes resistant to TRB, itraconazole (ITC) and voriconazole (VRC) on a large panel of patients from different sites in India, (b) to compare the results between these sites, and (c) to determine whether all cases resistant to TRB can be attributed to mutations in the fungal SQLE gene.

2 | MATERIALS AND METHODS

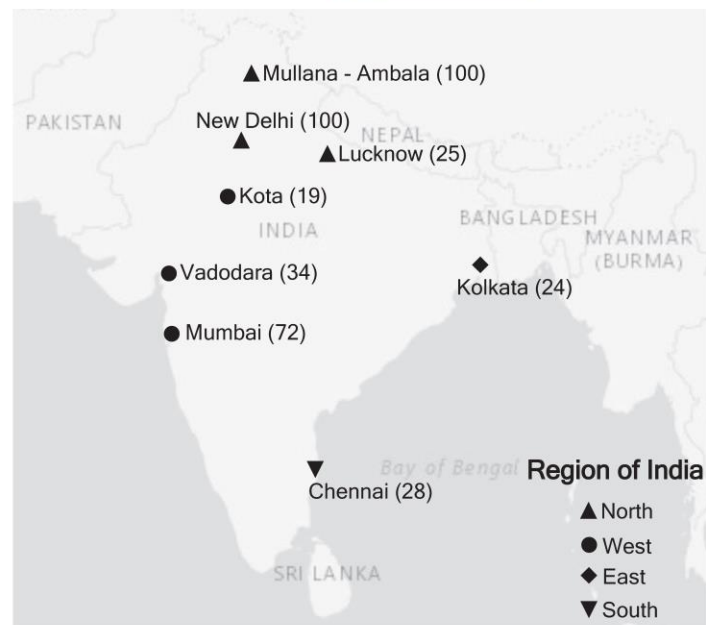
2.1 | Patients

A total of 402 patients with clinically suspected dermatophytosis from eight different locations in India participated in this study. Figure 1 shows the number and distribution of participants in each centre. From each patient, one skin scraping from the periphery of the infected lesion was collected between 2017 and 2019. This includes 199 patients whose species detection was performed in a previously published multicentric study.⁷

2.2 | Fungal identification

Each sample was transferred onto two culture media: Sabouraud's 4% dextrose agar (SDA) containing the antibiotic chloramphenicol, and SDA containing chloramphenicol as well as cycloheximide in order to eliminate moulds. Cultures were incubated at 28°C for at least 4 weeks and checked visually every 3 days. Criteria for the detection of dermatophytes were based on colour, texture and growth speed. Cultures fulfilling the listed criteria were subject to light microscopy using lactophenol cotton blue dye. In order to detect dermatophyte DNA, samples underwent a polymerase chain reaction using an enzyme-linked immunosorbent assay (PCR-ELISA). DNA was extracted using QIAamp® DNA Mini QIAcube Kit (Qiagen). The following probes for PCR were used: *T. rubrum*, *T. interdigitale/T. mentagrophytes*, *Microsporum canis* and *T. benhamiae*. Identification was further confirmed by Sanger sequencing of the ITS region (mainly partial 18.S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2 and partial 28.S rRNA) of the rDNA and the translation elongation factor (TEF)-1 α gene.¹⁵ For ITS amplification, the primers V9G (5'-TTACGTCCCTGCCTTTGTA-3') and LSU266 (5'-GCATTCCCAACAACCTCGACTC-3') were used.¹⁶ The TEF-1 α gene was amplified using the primers EF-DermF (5'-CACATTAACCTGGTCGTTATCG-3') and EF-DermR (5'-CATCCTTGAGATACCAGC-3').¹⁵ We compared the sequences

FIGURE 1 Origin of patients included in the present study. Numbers in parentheses represent the count of patients



with the GenBank database (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) using nucleotide BLAST searches.

2.3 | Antifungal susceptibility testing

Isolated dermatophytes growing on culture media ($N = 297$) were tested for growth on SDA containing $0.2 \mu\text{g/mL}$ TRB as described by previous research.¹² The concentration of TRB is equivalent to twice that of the MIC for *T mentagrophytes* and *T rubrum* under these conditions.¹⁷ Fungal growth was examined after 7 and 14 days. Growing strains were recorded as resistant. Minimal inhibitory concentrations (MICs) of TRB, ITC and VRC were determined by broth microdilution method according to the M38-A2 protocol of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).¹⁸

2.4 | Squalene epoxidase gene analysis

Trichophyton total DNA was extracted from fresh fungal cultures on SDA using a DNeasy Plant minikit (Qiagen). A square-shaped area of approximately 1.0 mm^2 of growing culture was used. The squalene epoxidase (*SQLE*) gene of the TRB-resistant clinical isolates was amplified by PCR with ReadyMix Taq PCR Reaction Mix (Sigma Aldrich, Merck). The primer pair TrSQLE-F2 (5' ATGGTTGTAGAGGCTCCTCCC 3') and TrSQLE-R1 (5' CTAGCTTTGAAGTTCGGCAA 3') was used and chromosomal

DNA served as the template. In some cases where fungal cultures were not obtained, *SQLE* gene fragments were analysed from scale DNA as described¹⁹ using primer pairs TmSQLEF4 (5' AACGGCTTGGCGAATGGCTCC 3') and TmSQLER4 (5' GATGACCCTGCAGGCAGTAAG 3'). Sequences were aligned and screened for missense mutations using MEGA version 10.0.5 (Kumar, Stecher, Li, Knyaz, and Tamura 2018).

2.5 | Statistical analyses and map generation

Figures were created, Pearson's correlation coefficient was calculated, and Kruskal-Wallis tests were performed using SPSS version 26 (IBM). Fisher's exact test was executed by GraphPad Prism version 8.0.0 (GraphPad Software, www.graphpad.com). ECOFF values were computed by the Microsoft Excel spreadsheet calculator ECOFFinder XL 2010 v2.1 (<https://clsi.org/meetings/microbiology/ecoffinder/>), which follows a methodology established by Turnidge et al.²⁰ The map in Figure 1 was obtained by using the tmap package²¹ within the software R and edited in Microsoft Word.

2.6 | Ethics statement and patient informed consent

The authors confirm that the ethical policies of the journal, as noted on the journal's author guidelines page, have been adhered to. No ethical approval was required as the research in this article was

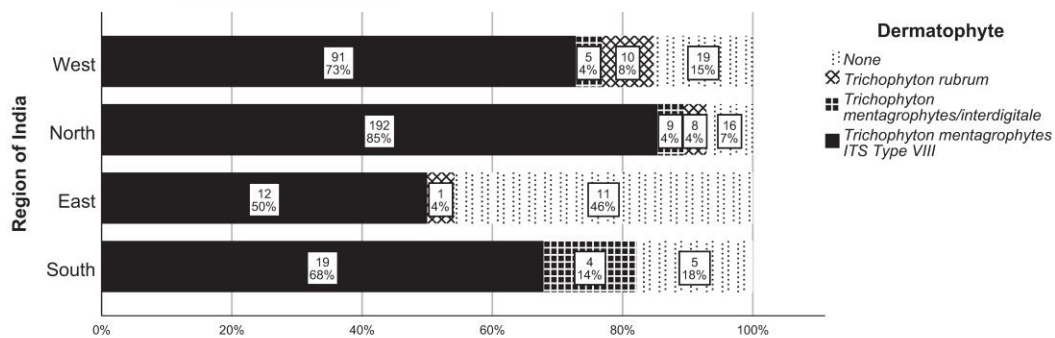


FIGURE 2 Counts and rates of detected dermatophytes in different regions of India. Detection was established by cultivation, light microscopy, PCR-ELISA, and/or sequencing of the ITS region of the rDNA or the TEF-1 α gene. '*Trichophyton mentagrophytes/interdigitale*' declare strains which showed a positive PCR-ELISA result, but did not yield an ITS or TEF1- α sequence due to insufficient amounts of DNA

related to micro-organisms. All persons gave their informed consent prior to their inclusion in the study.

3 | RESULTS

3.1 | Clinical details of patients

Consistent clinical data were available for 226 (56%) patients of which 134 (59%) were male and 92 (41%) female. The ages of patients ranged from 6 to 75 years, the median age being 28 years. Tinea corporis and tinea cruris were the most common types of dermatophytoses, accounting for 196 (87%) and 185 (82%) of patients, respectively. Forty-five (20%) patients presented with tinea faciei, followed by four (2%) patients with tinea manuum, two (1%) with tinea pedis, and two (1%) with tinea barbae. The median duration of disease was 6 months and ranged from 2 weeks to 7 years. A total of 107 (47%) patients affirmed and 119 (53%) patients declined that a family member was also affected. Eleven (5%) patients indicated diabetes as comorbidity. Other pre-existing conditions such as atopy, chronic myelogenous leukaemia, chronic obstructive pulmonary disease, dyslipidaemia, hypothyroidism and vitiligo were stated by one (0.5%) patient each.

In total, 182 (81%) patients confirmed having treated their disease with pharmaceutical agents before visiting the practitioner or dermatologist. Out of these, only 83 (46%) patients could provide further information on components. Within this group, 72 (87%) had applied topical steroid creams, most often USA-class-I ultra-high-potency substances such as clobetasol propionate (50 [60%] patients) and/or class-II high-potency preparations such as betamethasone dipropionate (18 [22%] patients). Fifty-one (61%) patients who were able to specify their drug history had used topical antibiotics, most frequently gentamicin and/or ofloxacin. Exposure to topical or systemic antifungal agents was affirmed by 65 (78%) patients. Miconazole and TRB were the most widely used ingredients within this group (22 and 24 patients, respectively). Notably, 50 (60%)

patients had applied topical fixed-dose combinations containing one or more ingredients in all three substance classes (steroids, antibiotics and antifungal agents).

3.2 | Microbiological investigations

All 402 samples were evaluated for growth on culture media as described in the Materials and methods section. Dermatophytes grew from 308 samples and were identified as *T mentagrophytes/interdigitale* (289 [93.8%] samples) and *T rubrum* (19 [6.2%] samples) on the base of phenotypic characters. Identification was further confirmed by PCR-ELISA and by sequencing of the ITS region and, in 147 cases, TEF1- α . All *T mentagrophytes/interdigitale* isolates revealed to be *T mentagrophytes* ITS Type VIII without exception.

Ninety-four samples that did not yield a dermatophyte growing on culture media were analysed by PCR-ELISA and sequencing directly from skin scrapings. Of these, 25 were identified as *T mentagrophytes* ITS Type VIII. In 18 samples, sequencing was negative due to insufficient amounts of DNA, but PCR-ELISA allowed an attribution to the *T interdigitale/mentagrophytes* complex. In the remaining 51 samples, no dermatophyte was detected.

Figure 2 illustrates the varying species prevalence in the different parts of India. Clearly, *T mentagrophytes* ITS Type VIII constitutes the majority of dermatophytes in all four geographic regions.

Eleven dermatophytes among the 308 we isolated were lost to contamination. Thus, 297 dermatophyte strains (279 identified as *T mentagrophytes* ITS Type VIII and 18 identified as *T rubrum*) remained for antifungal susceptibility testing and sequencing of the SQLE gene.

3.3 | Terbinafine resistance rates in India

A total of 297 dermatophyte isolates were tested for growth ability on SDA containing 0.2 μ g/mL TRB. Terbinafine MICs were also determined by broth microdilution method (Table 1). All isolates with

TABLE 1 Terbinafine susceptibility of strains showing missense mutations in the coding region of the squalene epoxidase (SQLE) gene with consequential amino acid substitutions in the SQLE enzyme

Missense mutation within SQLE	Amino acid substitution	Broth microdilution method		Number of isolates with susceptibility determined by agar dilution method (0.2 µg/mL terbinafine)				Nucleotide accession number		Protein accession number	
		MIC range (µg/mL)	T rubrum	T mentagrophytes ITS Type VIII		T rubrum		T mentagrophytes ITS Type VIII	T rubrum	T mentagrophytes ITS Type VIII	T rubrum
				Resistant	Sensitive	Resistant	Sensitive				
None	None	0.125	0.0312	0	19	0	10	EZF33561	XP_003233845		
Isolates with one missense mutation in SQLE											
c.1179A > C	Leu393Phe	16	-	6 ^{8,11,22}	0	0 ^{12,13,46}	0	AVU05317	AAQ18216		
c.1178T > C	Leu393Ser	0.5-1	-	7	0	0 ^{12,13}	0	QU32789 ^a	-		
c.1189T > C	Phe397Leu	8	8	153 ^{9,12,22}	0	8 ^{12,13,47}	0	AVU05318	AAZ08563		
c.1191C > A											
c.1191C > G											
c.1318C > T	His440Tyr	0.25	-	2	0	0 ¹²	0	MN519538 ^a	-		
c.1327T > C	Ser443Pro	0.25	-	1	2	0	0	MN519539 ^a	-		
c.1342G > A	Ala448Thr	0.125	-	0	58	0	0	ATA67044	-		
Isolates with two missense mutations in SQLE											
c.1005A > C	Leu335Phe	0.25	-	0	1	0	0	MN482257 ^b	QIB02548 ^a	-	
c.1342G > A	Ala448Thr										
c.1183T > C	Ser395Pro	0.25	-	1	0	0	0	MN482258 ^a	QIB02549 ^a	-	
c.1342G > A	Ala448Thr										
c.1189T > C	Phe397Leu	8	-	27	0	0	0	ATA67034	-		
c.1191C > A											
c.1191C > G											
c.1342G > A	Ala448Thr										
c.1223A > T	Gln408Leu	1	-	2 ¹⁴	0	0	0	MN482259 ^a	QIB02550 ^a	-	
c.1342G > A	Ala448Thr										
Total				199	80	8	10				

Note: Susceptibility was determined by broth microdilution method as well as by agar dilution method. Corresponding GenBank accession numbers of sequences are shown. Nucleotide positions apply to SQLE cDNA (without the intron of 62 base pairs after position 1192). Superscript numbers link to previous studies which have demonstrated an association between this substitution and terbinafine resistance of the respective species.

^aSequence showing a hitherto undescribed SQLE genotype/amino acid substitution for respective species

MIC \geq 0.5 $\mu\text{g/mL}$ ($N = 203$) grew well on SDA containing 0.2 $\mu\text{g/mL}$ TRB, and these were considered TRB resistant. Seven strains with a MIC of 0.25 $\mu\text{g/mL}$ were considered weakly resistant. Four of these strains were growing slowly on TRB agar. Dermatophytes with a MIC of 0.125 $\mu\text{g/mL}$ ($N = 87$) or less did not grow on this medium and were considered sensitive.

Figure 3 shows the differences in frequency of TRB-resistant *T mentagrophytes* ITS Type VIII isolates depending on geographical regions. In the southern part of India, *T mentagrophytes* ITS Type VIII exhibited a much lower resistance rate (16%). In contrast, *T mentagrophytes* ITS Type VIII isolated in North, West and East India showed resistance rates in the order of 75%. The overall resistance rate of *T mentagrophytes* ITS Type VIII was much higher with 72% (202 out of 279 isolates) compared to *T rubrum* (44%, 8 out of 18 isolates).

3.4 | Amino acid substitutions in squalene epoxidase

In order to discover reasons for in vitro TRB resistance in these *Trichophyton* isolates, we screened them for alterations in the fungal squalene epoxidase gene. Missense mutations leading to substituted amino acids in the SQLE protein were documented and are listed in Table 1. Out of 199 *T mentagrophytes* ITS Type VIII growing on TRB agar, 180 (91%) strains had a Phe397Leu substitution and MICs of 8 $\mu\text{g/mL}$. Of these, 27 (15%) also possessed an Ala448Thr substitution. The highest MICs of 16 $\mu\text{g/mL}$ were observed in isolates with Leu393Phe substitution ($N = 6$). Isolates with a Leu393Ser ($N = 7$) or Gln408Leu/Ala448Thr alteration ($N = 2$) showed lower MICs of 0.5–1 $\mu\text{g/mL}$. Seven isolates were weakly resistant with MICs of 0.25 $\mu\text{g/mL}$ and were found with other missense mutations in the SQLE gene, leading to substitutions His440Tyr ($N = 2$), Ser443Pro ($N = 3$), Leu335Phe with Ala448Thr ($N = 1$), and Ser395Pro with Ala448Thr ($N = 1$). As a general rule, no MIC differences were observed for strains with the same mutation except in Leu393Ser. The commonest substitution in SQLE of TRB-sensitive *T mentagrophytes*

ITS Type VIII was Ala448Thr (58 [72.5%] strains). This mutation did not appear to be involved in an increase in MICs.

3.5 | Triazole susceptibility

We investigated antifungal susceptibility to ITC and VRC in 297 *Trichophyton* isolates. Table 2 provides descriptive data on the drug's MICs. Significant regional differences were not observed (Table S2).

Figure 4 shows an abnormal distribution of MIC values for VRC. This observation led to the hypothesis that mechanisms of resistance exist in our cohort of isolated *T mentagrophytes* ITS Type VIII for strains with a MIC above 0.25 $\mu\text{g/mL}$. To support this value, we determined epidemiological cut-off values (ECOFF 95% and ECOFF 97.5% as described in Materials and methods) that statistically separate the wild-type population from isolates with mutational resistance. For ITR, the wild-type population was located at MIC \leq 0.25 $\mu\text{g/mL}$, and for VRC at MIC \leq 0.125 $\mu\text{g/mL}$.

Isolates with low sensitivity to VRC had a low sensitivity to ITC. Figure 5 shows a positive, linear relationship between in vitro susceptibilities of ITC and VRC. The calculation of a Spearman ρ correlation coefficient yielded a strong, positive correlation between these two variables ($\rho(295) = 0.734$, $P < .0001$).

Isolates resistant to both ITC and VRC were more prevalent in TRB-sensitive isolates (42%) than in TRB-resistant isolates (18%), assuming a MIC cut-off of 0.25 $\mu\text{g/mL}$ for azoles (Table 3). Conversely, isolates resistant to TRB were more common in the azole-sensitive group (77%) than in the azole-resistant group (51%). Fisher's exact test proved these differences to be extremely statistically significant (two-tailed $P < .0001$).

Surprisingly, triazole susceptibility seemed to depend on the SQLE genotype. Figure 6 illustrates that the MIC means (derived from distribution curves) were higher in isolates showing an Ala448Thr substitution. We performed a Kruskal-Wallis test comparing MIC values for ITC between *Trichophyton* strains exhibiting the four most prevalent SQLE genotypes: wild type ($N = 29$),

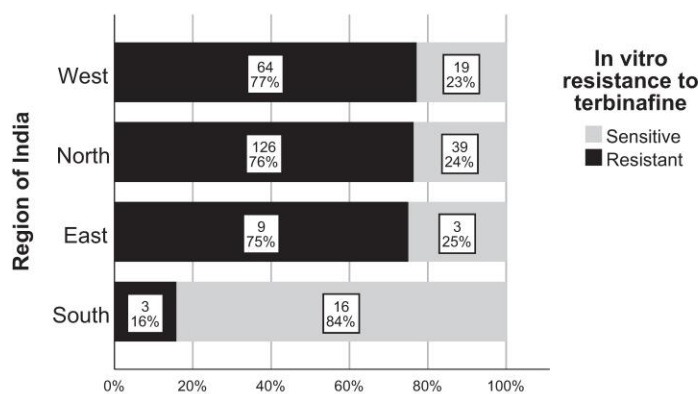


FIGURE 3 Counts and rates of terbinafine-resistant *Trichophyton mentagrophytes* ITS Type VIII in different regions of India. Resistance was determined by the ability to grow on Sabouraud's dextrose agar containing 0.2 $\mu\text{g/mL}$ terbinafine and by broth microdilution method

TABLE 2 Susceptibility profile of triazoles. MIC₅₀s and MIC₉₀s denote the minimal inhibitory concentration at which at least 50% (90%) of isolates were inhibited

Type of value	Itraconazole		Voriconazole	
	MIC value for organism (µg/mL)			
	<i>Trichophyton mentagrophytes</i> ITS Type VIII	<i>T. rubrum</i>	<i>T. mentagrophytes</i> ITS Type VIII	<i>T. rubrum</i>
N	279	18	279	18
Range	0.0156-1	0.0625-1	0.0078-1	0.0156-1
GM	0.12	0.18	0.07	0.05
MIC ₅₀	0.125	0.125	0.0625	0.0312
MIC ₉₀	0.25	0.5	0.5	0.5

Abbreviations: GM, geometric mean; N, number of isolates.

FIGURE 4 Susceptibility of *Trichophyton mentagrophytes* ITS Type VIII isolates to itraconazole and voriconazole, determined by broth microdilution method. Numbers in boxes indicate the count of isolates with a given minimal inhibitory concentration (MIC). Arrows denote the MIC that represents the epidemiological cut-off value (ECOFF 95% and ECOFF 97.5%)

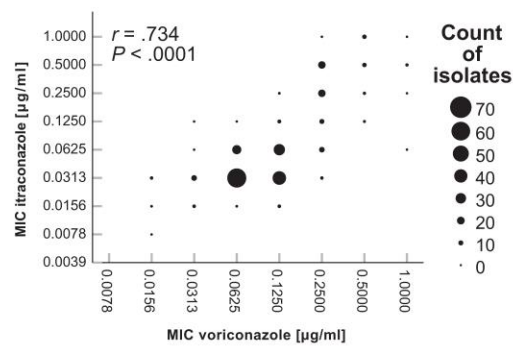
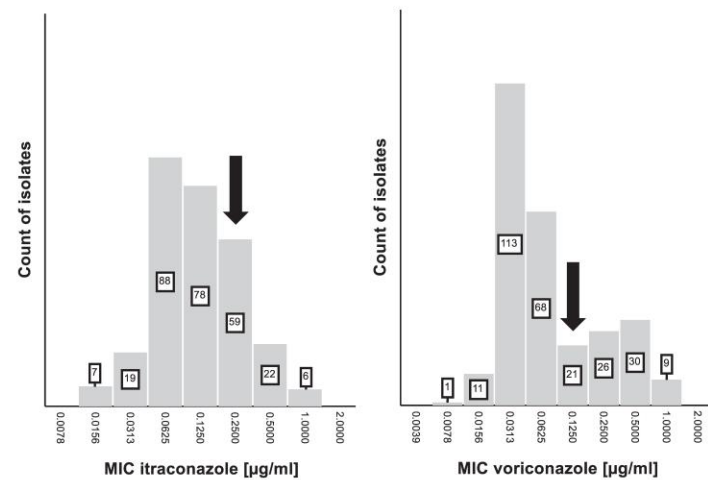


FIGURE 5 Correlation between minimal inhibitory concentrations of itraconazole and voriconazole in *Trichophyton* isolates

Phe397Leu (N = 161), Ala448Thr (N = 58) and Ala448Thr with concurrent Phe397Leu substitution (N = 27). The test yielded significant differences among genotypes ($H(3275) = 57.801$,

TABLE 3 Count of *Trichophyton* strains resistant and sensitive to examined antifungal agents

	In vitro resistance	Terbinafine		Total
		Resistant	Sensitive	
Itraconazole and voriconazole	Resistant	33	32	65
	Sensitive	154	45	199
	Total	187	77	264

Note: Triazole resistance was more frequent in TRB-sensitive isolates, while TRB resistance was more frequent in triazole-sensitive isolates ($P < .0001$).

$P < .001$). Follow-up pairwise comparisons revealed the following: Strains harbouring Ala448Thr substitution, either single or in combination with Phe397Leu, showed significantly higher MICs of ITC than strains with single Phe397Leu substitution or wild type. The same was observed for VRC: MIC values in isolates with single or combined Ala448Thr substitution were significantly higher ($H(3275) = 79.114$, $P < .001$) than in isolates exhibiting single Phe397Leu substitution or SQLE wild type.

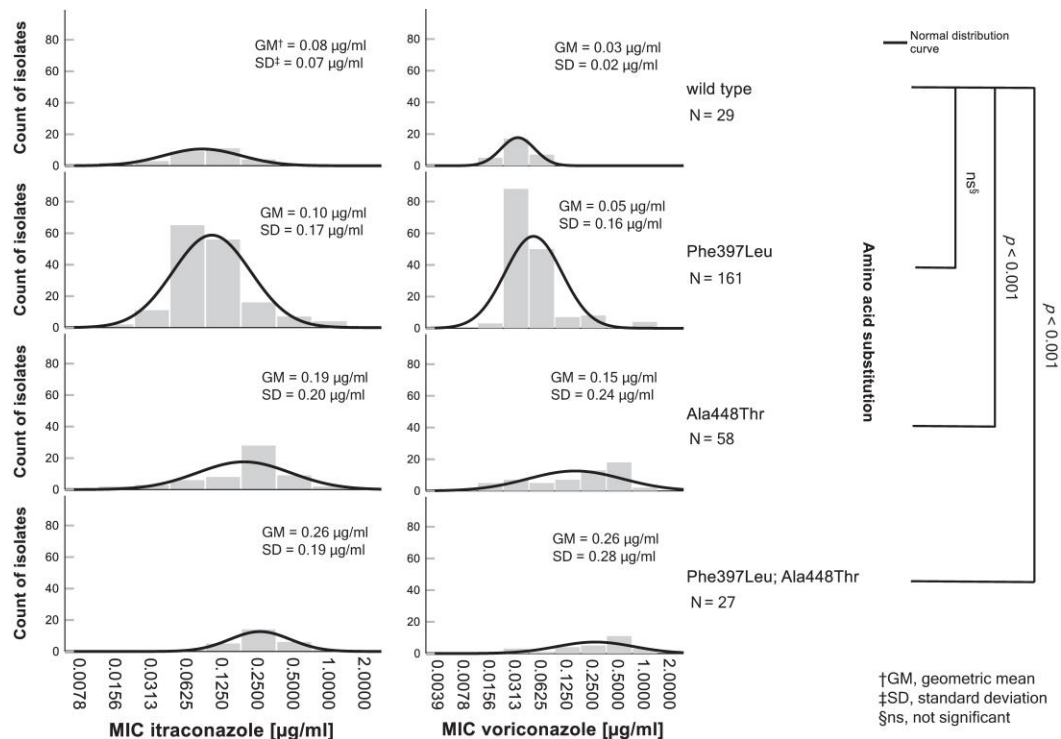


FIGURE 6 Distribution of minimal inhibitory concentrations (MICs) to itraconazole and voriconazole in the four commonest *SQL*E genotypes of *Trichophyton* isolates: wild type, Phe397Leu, Ala448Thr and Ala448Thr with concurrent Phe397Leu substitution. Isolates exhibiting an Ala448Thr substitution had significantly higher MICs

4 | DISCUSSION

4.1 | Causative pathogens for dermatophytosis

Our findings confirm *T mentagrophytes* ITS Type VIII as the commonest pathogen for dermatophytosis in all examined regions of India. This reiterates the epidemiological shift from *T rubrum* to *T mentagrophytes*/*T interdigitale* as the dominant pathogen in tinea patients, which has been observed in India over approximately the past decade.⁷

Furthermore, 312 (99.4%) out of 314 *T mentagrophytes* ITS Type VIII isolates showed 100% genetic concordance on the ITS region. Only two strains (0.6%) deviated from this pattern through the insertion of one base. These findings strongly suggest a clonal origin of *T mentagrophytes* strains and substantiate the epidemic-like character of the current Indian scenario of dermatophytosis.

Epidemiological studies from different locations in India have found either *T mentagrophytes* or *T interdigitale* as the dominant organism responsible for tinea.^{10,11,22-27} However, a recent phylogenetic analysis of the ITS region placed Indian *T interdigitale* isolates from dermatophytosis patients in the same clade as *T mentagrophytes* ITS Type VIII presented in this study.⁹ Additionally, the maximum difference between these *Trichophyton* species was only 42 single

nucleotide polymorphisms (SNPs). Therefore, it can be assumed that *T mentagrophytes* ITS Type VIII and strains labelled as *T interdigitale* in recent Indian studies in fact represent the same species or genotype. However, the true anthropophilic *T interdigitale* species should be distinguished from these strains.⁷

The reason for previous divergent findings regarding the commonest species in dermatophytosis (*T mentagrophytes* vs *T interdigitale*) might lie in the process of species determination itself and differences in the used nomenclature.^{28,29} It is of utmost importance for researchers to adjust submitted sequence names according to the latest taxonomic agreements, which is unfortunately not yet common practice. Failing this, confusion in species identification will continue unabated.

4.2 | Terbinafine resistance rates

The results obtained by the broth microdilution method for the identification of TRB resistance of *Trichophyton* strains were consistent with those obtained by the agar dilution method. The agar dilution method may serve as a practical alternative to the broth microdilution method as it is faster and much more cost-effective.

According to the 'Expert Consensus on The Management of Dermatophytosis in India (ECTODERM India)', TRB is recommended as the preferred systemic antifungal drug.³⁰ This study presents evidence that this first-line drug has lost its in vitro efficacy in most parts of India. Several studies located the prevalence of TRB-resistant isolates between 18% and 61% in different parts of India. Mahajan et al²³ reported a resistance rate of 18% (MIC \geq 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) among patients infected with *T mentagrophytes* in Uttar Pradesh in 2017. A higher resistance frequency (judging from a MIC breakpoint of 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) of 17% in *T interdigitale* was observed in 2018 in Chandigarh, another North Indian location.¹⁰ The same year, two studies from Delhi revealed TRB resistance rates of 32% (MIC \geq 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$)¹¹ and 61% (MIC \geq 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$),²² while another research group found no resistant cases (MIC \geq 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) at all.²⁴ Our research showed that 76% of North Indian *T mentagrophytes* isolates were resistant to TRB, exceeding the percentages of other studies in this region.

TRB resistance in *T mentagrophytes/T interdigitale* is not restricted to Northern India (Figure 3). Cities in Western India are equally affected. We also documented resistant strains in Kolkata, East India. The low resistance rate of 16% in Chennai, the capital of the southern state, Tamil Nadu, India, may be explained by the large distance (and therefore less risk of transmission of resistant strains) from northern centres showing higher percentages. It is also believed that abuse of steroid containing FDCs is less in the south of the country when compared with north.

4.3 | Associations of in vitro terbinafine resistance and amino acid substitutions in the squalene epoxidase

All isolates of *T mentagrophytes* ITS Type VIII with Phe397Leu or Leu393Phe substitution in the *SQLE* protein were shown to be resistant in agar cultures and had high MICs of \geq 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$. The value of 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ was recently proposed as the epidemiological cut-off value (ECV) for TRB resistance.³¹ Isolates with a non-mutated *SQLE* or carrying a single Ala448Thr substitution continuously featured low MICs of \leq 0.125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and did not grow on SDA containing 0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$. The *SQLE* of strains with an MIC between 0.25 and 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ revealed other missense mutations. Of important note, a strain isolated from a patient for which TRB treatment was unsuccessful revealed a MIC of 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and a Gln408Leu substitution in *SQLE*.¹⁴ The same value was obtained for a strain analysed in the present study. Therefore, strains with MIC \geq 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ can be clinically resistant to TRB.

The MICs of sensitive strains of *T mentagrophytes* isolates (0.125 $\mu\text{g}/\text{mL}$) were found to be higher than that of *T interdigitale* isolates from tinea unguium and tinea pedis in Europe.¹³ These isolates had MICs of 0.008–0.03 $\mu\text{g}/\text{mL}$. The MIC of 0.125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in the present study corresponds to the minimal value given by other authors for sensitive isolates in India.^{9,11}

4.4 | Various prevalence of mutations in the SQLE gene

The high prevalence of isolates with a Phe397Leu mutation is striking while that of resistant isolates with a Leu393Phe mutation was found to be only 2%. Other missense mutations, Leu393Ser and His440Tyr, which were previously found in *T rubrum*, were revealed in *T mentagrophytes* ITS Type VIII. In addition, strains with other new mutations were discovered: Ser395Pro/Ala448Thr, Leu335Phe/Ala448Thr, Ser443Pro (all in weakly TRB-resistant strains with MIC = 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and single Ala448Thr in TRB-sensitive strains.

Other studies have shown the existence of other substitutions associated with TRB resistance. These include Phe397Ile, Phe397Val, Phe415Ile, Phe415Ser and Phe415Val in *T rubrum*¹² and Gln408Leu in *T mentagrophytes*.¹⁴ In addition, resistant strains were found with two mutations Ile121Met/Val237Ile and His440Tyr/Phe484Tyr in the *SQLE*.¹³

4.5 | Trends in triazole sensitivity among isolates

Triazole MICs in the present study from isolates originating in Northern India were equal to, lower,^{9,11,22} and some higher^{23,24} when compared with other studies.

A strong, positive, linear correlation between MICs of ITC and VRC was found. Isolates with reduced susceptibility to ITC tended to be less susceptible to VRC, and vice versa. These findings may implicate that triazole resistance in dermatophytes is not drug specific but is mediated by a shared mechanism of resistance. To the best of our knowledge, no data exist on the possible azole resistance mechanisms in *T mentagrophytes* ITS Type VIII isolates. The overexpression of two genes (multidrug resistance [MDR] 2 and MDR3) encoding a multidrug transporter of the ATP-binding cassette (ABC) family was recently documented in *T rubrum* showing reduced sensitivity to azole compounds.^{32,33} Two other ABC transporters (TruMDR1 and TruMDR5) and two major facilitator superfamily (MFS) transporters (TruMFS1 and TruMFS2) were also found to be capable of operating as azole efflux pumps in *T rubrum*.³³ Orthologues of these six transporters are present in *T mentagrophytes*, and it is possible that overexpression of genes encoding multidrug transporters or missense mutations in genes encoding Cyp51A (the azole target) are involved in azole resistance.^{34,35} A combination of these three mechanisms results in an additive effect. Furthermore, it has recently been discovered that mutations identified in the sterol-sensing domain of the 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-coenzyme A (HMG-CoA) reductase-encoding gene (*hmg1*) in *Aspergillus fumigatus* resulted in dysregulation of the ergosterol biosynthesis pathway, leading to triazole resistance.³⁶ It is possible that similar mechanisms exist in *T mentagrophytes*.

Triazole resistance was more frequent in TRB-sensitive isolates, while TRB resistance was more frequent in triazole-sensitive isolates. This may be because patients were treated with either TRB or azole, but not with both classes of drugs. As data on pre-treatment

were only available for a fraction of patients in this study, we can neither prove nor reject this hypothesis. Investigations correlating the exposure of patients to antifungals with in vitro resistance are necessary.

We observed that reduced susceptibility to triazoles in *Trichophyton* isolates was associated with the amino acid substitution Ala448Thr at the C-terminus of the squalene epoxidase. On average, strains containing an Ala448Thr substitution exhibited higher ITC and VRC MICs. However, there are strains with the Ala448Thr substitution that showed low sensitivity to azoles. Consequently, this mutation alone cannot be incriminated for a lack of sensitivity to azoles. This observation, however, is intriguing and could have a predictive value of possible azole insensitivity. A search with InterPro,³⁷ a tool by the European Molecular Biology Laboratory (EMBL) for analysing conserved amino acid motifs, returned putative transmembrane helices within the squalene epoxidase. Use of the prediction program TMHMM Server 2.0^{38,39} yielded the possible presence of a transmembrane helix covering the site Ala448. The change of the amino acid alanine into threonine at this position decreased prediction probability of the putative transmembrane helix using program TMHMM. It could be interpreted that such mutations influence later steps of ergosterol synthesis through conformational changes and result in reduced susceptibility to azoles. Nowadays, the identification of azole resistance mechanisms of *T. mentagrophytes* ITS Type VIII remains an open field of investigation.

For dermatophytes, no clinical breakpoints (CBPs) for MIC values have yet been established to guide antifungal therapy.⁴⁰ In absence of these, epidemiological cut-off values (ECVs or ECOFFs) may serve as a temporary substitute for detection of resistance until the process of complicated CBP determination has finished.⁴¹ During the revision of this manuscript, Shaw et al³¹ published MIC data of 498 Indian *T. mentagrophytes* ITS Type VIII isolates and found ECOFFs that were one dilution higher than in the present study (ECOFF (95%) \leq 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for ITR and ECOFF (95%) \leq 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for VRC). These ECOFFs may be helpful for physicians in the current scenario of recalcitrant dermatophytoses in India until CBPs on the basis of clinical outcome data are established.⁴²

5 | CONCLUSIONS

Trichophyton mentagrophytes ITS Type VIII was confirmed as the dominant pathogen of dermatophytosis in all analysed regions of India. In vitro resistance to TRB was encountered with striking frequency in northern, western and eastern regions. These alarming findings as well as the literature cited herein underscore the urgent need for affordable and readily available facilities to check antifungal susceptibility. The absence of such investigations promotes excessively prolonged treatment, inappropriately chosen drugs, experimentation with doses and frequency, impairment of quality of life among hapless patients, and finally a significant financial loss.

The novel squalene epoxidase substitution Ala448Thr was associated with higher MICs of ITR and VRC and could have predictive value of triazole insensitivity. TRB-resistant isolates were only encountered if a substitution was located between amino acids Leu393 and Ser443 while all strains which lacked a substitution in the squalene epoxidase were sensitive to TRB in the present study. Therefore, checking specifically the C-terminus of SQLE allows the identification of TRB resistance in *T. rubrum* or *T. mentagrophytes/interdigitale*. The accuracy and feasibility of treatment decisions based on SQLE mutations should be evaluated in the future—especially since TRB resistance is marching across India and beyond.^{43–45}

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Marina Fratti for excellent technical assistance. This research received no specific grant from any funding agency in the public, commercial or not-for-profit-sectors.

CONFLICT OF INTEREST

There are no conflicts of interest to disclose.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Andreas Ebert: Conceptualization (equal); data curation (lead); formal analysis (equal); investigation (equal); project administration (equal); software (equal); supervision (equal); visualization (lead); writing-original draft (lead); writing-review and editing (equal). **Monod Michel:** Conceptualization (lead); formal analysis (equal); investigation (equal); methodology (equal); validation (equal); visualization (equal); writing-original draft (equal); writing-review and editing (equal). **Karine Salamin:** Investigation (equal). **Anke Burmester:** Conceptualization (equal); data curation (equal); formal analysis (equal); investigation (equal); methodology (equal); software (equal); writing-original draft (supporting); writing-review and editing (equal). **Silke Uhrhlaß:** Data curation (equal); investigation (equal); methodology (equal); software (equal); validation (equal). **Cornelia Wiegand:** Conceptualization (equal); funding acquisition (equal); investigation (equal); project administration (equal); resources (equal); supervision (equal); writing-review and editing (equal). **Uta-Christina Hipler:** Conceptualization (equal); funding acquisition (equal); investigation (equal); project administration (equal); resources (equal); supervision (equal); writing-review and editing (equal). **Constanze Krüger:** Funding acquisition (equal); resources (equal). **Daniela Koch:** Methodology (supporting). **Franziska Wittig:** Methodology (equal). **Shyam B. Verma:** Conceptualization (equal); resources (equal); writing-review and editing (equal). **Archana Singal:** Resources (equal). **Sanjeev Gupta:** Resources (equal). **Resham Vasani:** Resources (equal). **Abir Saraswat:** Resources (equal). **Rengarajan Madhu:** Resources (equal). **Saumya Panda:** Resources (equal). **Anupam Das:** Resources (equal). **Mahendra M. Kura:** Resources (equal). **Akshay Kumar:** Resources (equal). **Shital Poojary:** Resources (equal). **Sibylle Schirm:** Formal analysis (supporting). **Yvonne Gräser:** Validation (equal). **Uwe Paasch:** Project administration (equal). **Pietro Nenoff:** Conceptualization (lead); funding acquisition (equal); investigation (equal); project administration (equal); resources (equal); supervision

(equal); validation (equal); writing-original draft (equal); writing-review and editing (equal).

DATA AVAILABILITY STATEMENT

ITS- and TEF-1 α sequences of representative dermatophyte strains can be found in GenBank under accession numbers MN460830-MN460839 (*T. mentagrophytes* ITS Type VIII) and MN460827-MN460829 (*T. rubrum*). MN460834 and MN460835 refer to the only aberrant ITS sequences in *T. mentagrophytes* ITS Type VIII found in this study, exhibiting an insertion of cytosine or guanine, respectively. SQLE sequences with missense mutations leading to amino acid substitutions can be obtained from Table 1. A Microsoft Excel data set containing all essential clinical and laboratory data is supplied as supporting information (Table S1).

ORCID

Andreas Ebert  <https://orcid.org/0000-0001-8368-8151>

Michel Monod  <https://orcid.org/0000-0002-0695-4003>

Pietro Nenoff  <https://orcid.org/0000-0002-4990-3345>

REFERENCES

- Male O. The significance of mycology in medicine. In: *Frontiers in Mycology*. Wallingford, C.A.B. International. 1990;131-156.
- Verma S, Vasani R, Reszke R, Matusiak L, Szepletowski JC. Prevalence and clinical characteristics of itch in epidemic-like scenario of dermatophytoses in India: a cross-sectional study. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2020;34:180-183.
- Szepletowski JC, Reich A. Stigmatisation in onychomycosis patients: a population-based study. *Mycoses*. 2009;52:343-349.
- Panda S, Verma S. The menace of dermatophytosis in India: the evidence that we need. *Indian J Dermatol Venereol Leprol*. 2017;83:281-284.
- Khurana A, Sardana K, Chowdhary A. Antifungal resistance in dermatophytes: Recent trends and therapeutic implications. *Fungal Genet Biol*. 2019;132:103255.
- Verma S, Madhu R. The great Indian epidemic of superficial dermatophytosis: an appraisal. *Indian J Dermatol*. 2017;62:227-236.
- Nenoff P, Verma SB, Vasani R, et al. The current Indian epidemic of superficial dermatophytosis due to *Trichophyton mentagrophytes*-A molecular study. *Mycoses*. 2019;62:336-356.
- Taghipour S, Pchelin IM, Zarei Mahmoudabadi A, et al. *Trichophyton mentagrophytes* and *T. interdigitale* genotypes are associated with particular geographic areas and clinical manifestations. *Mycoses*. 2019;62:1084-1091.
- Singh A, Masih A, Monroy-Nieto J, et al. A unique multidrug-resistant clonal *Trichophyton* population distinct from *Trichophyton mentagrophytes/Trichophyton interdigitale* complex causing an ongoing alarming dermatophytosis outbreak in India: genomic insights and resistance profile. *Fungal Genet Biol*. 2019;133:103266.
- Rudramurthy SM, Shankarnarayan SA, Dogra S, et al. Mutation in the squalene epoxidase gene of *Trichophyton interdigitale* and *Trichophyton rubrum* associated with allylamine resistance. *Antimicrob Agents Chemother*. 2018;62:e02522-e2617.
- Singh A, Masih A, Khurana A, et al. High terbinafine resistance in *Trichophyton interdigitale* isolates in Delhi, India harbouring mutations in the squalene epoxidase gene. *Mycoses*. 2018;61:477-484.
- Yamada T, Maeda M, Alshahni MM, et al. Terbinafine resistance of *Trichophyton* clinical isolates caused by specific point mutations in the squalene epoxidase gene. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017;61:e00115-e117.
- Saunte DML, Hare RK, Jørgensen KM, et al. Emerging terbinafine resistance in *Trichophyton*: clinical characteristics, squalene epoxidase gene mutations and a reliable EUCAST method for detection. *Antimicrob Agents Chemother*. 2019;63:e01126-e1219.
- Hsieh A, Quenan S, Riat A, Toutous-Trellu L, Fontao L. A new mutation in the SQLE gene of *Trichophyton mentagrophytes* associated to terbinafine resistance in a couple with disseminated tinea corporis. *J Mycol Méd*. 2019;29(4):352-355.
- Mirhendi H, Makimura K, de Hoog GS, et al. Translation elongation factor 1-alpha gene as a potential taxonomic and identification marker in dermatophytes. *Med Mycol*. 2015;53:215-224.
- de Hoog GS, Gerrits van den Ende AH. Molecular diagnostics of clinical strains of filamentous Basidiomycetes. *Mycoses*. 1998;41:183-189.
- Mock M, Monod M, Baudraz-Rosset F, Panizzon RG. Tinea capitis dermatophytes: susceptibility to antifungal drugs tested in vitro and in vivo. *DRM*. 1998;197:361-367.
- CLSI. *Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi; approved standard*. CLSI document M38-A2. Wayne, PA: CLSI; 2008.
- Burmester A, Hipler U-C, Hensche R, Elsner P, Wiegand C. Point mutations in the squalene epoxidase gene of Indian ITS genotype VIII *T. mentagrophytes* identified after DNA isolation from infected scales. *Med Mycol Case Rep*. 2019;26:23-24.
- Turnidge J, Kahlmeter G, Kronvall G. Statistical characterisation of bacterial wild-type MIC value distributions and the determination of epidemiological cut-off values. *Clin Microbiol Infect*. 2006;12:418-425.
- Tennekes M. Tmap: thematic maps in R. *J Stat Softw*. 2018;84:1-39.
- Khurana A, Masih A, Chowdhary A, et al. Correlation of in vitro susceptibility based on MICs and squalene epoxidase mutations with clinical response to terbinafine in patients with tinea corporis/cruris. *Antimicrob Agents Chemother*. 2018;62:e01038-e1118.
- Mahajan S, Tilak R, Kaushal SK, Mishra RN, Pandey SS. Clinico-mycological study of dermatophytic infections and their sensitivity to antifungal drugs in a tertiary care center. *Indian J Dermatol Venereol Leprol*. 2017;83:436-440.
- Sardana K, Kaur R, Arora P, Goyal R, Ghunawat S. Is antifungal resistance a cause for treatment failure in dermatophytosis: a study focused on tinea corporis and cruris from a tertiary centre? *Indian Dermatol Online J*. 2018;9:90-95.
- Bhatia VK, Sharma PC. Epidemiological studies on dermatophytosis in human patients in Himachal Pradesh. *India. Springerplus*. 2014;3:134.
- Noronha TM, Tophakhane RS, Nadiger S. Clinico-microbiological study of dermatophytosis in a tertiary-care hospital in North Karnataka. *Indian Dermatol Online J*. 2016;7:264-271.
- Sharma R, Adhikari L, Sharma RL. Recurrent dermatophytosis: a rising problem in Sikkim, a Himalayan state of India. *Indian J Pathol Microbiol*. 2017;60:541-545.
- Nenoff P, Verma SB, Uhrlaß S, Burmester A, Gräser Y. A clarion call for preventing taxonomical errors of dermatophytes using the example of the novel *Trichophyton mentagrophytes* genotype VIII uniformly isolated in the Indian epidemic of superficial dermatophytosis. *Mycoses*. 2019;62:6-10.
- Chowdhary A, Singh A, Singh PK, Khurana A, Meis JF. Perspectives on misidentification of *Trichophyton interdigitale/Trichophyton mentagrophytes* using internal transcribed spacer region sequencing: urgent need to update the sequence database. *Mycoses*. 2018;62:11-15.
- Rajagopalan M, Inamadar A, Mittal A, et al. Expert consensus on the management of dermatophytosis in India (ECTODERM India). *BMC Dermatol*. 2018;18:6.
- Shaw D, Singh S, Dogra S, et al. MIC and upper limit of wild-type distribution for 13 antifungal agents against a *Trichophyton*

- mentagrophytes-Trichophyton interdigitale complex of Indian origin. *Antimicrob Agents Chemother.* 2020;64:e01964-19.
32. Fachin AL, Ferreira-Nozawa MS, Maccheroni W, Martinez-Rossi NM. Role of the ABC transporter TruMDR2 in terbinafine, 4-nitroquinoline N-oxide and ethidium bromide susceptibility in *Trichophyton rubrum*. *J Med Microbiol.* 2006;55:1093-1099.
 33. Monod M, Feuermann M, Salamin K, et al. Trichophyton rubrum azole resistance mediated by a new ABC transporter, TruMDR3. *Antimicrob Agents Chemother.* 2019;63:e00863-e919.
 34. Sanglard D, Ischer F, Koymans L, Bille J. Amino acid substitutions in the cytochrome P-450 lanosterol 14 α -demethylase (CYP51A1) from azole-resistant *Candida albicans* clinical isolates contribute to resistance to azole antifungal agents. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998;42:241-253.
 35. Mellado E, Garcia-Effron G, Alcázar-Fuoli L, et al. A new *Aspergillus fumigatus* resistance mechanism conferring in vitro cross-resistance to azole antifungals involves a combination of cyp51A alterations. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;51:1897-1904.
 36. Rybak JM, Ge W, Wiederhold NP, et al. Mutations in hmg1, challenging the paradigm of clinical triazole resistance in *Aspergillus fumigatus*. *MBio.* 2019;10:e00437-e519.
 37. Mitchell AL, Attwood TK, Babbitt PC, et al. InterPro in 2019: improving coverage, classification and access to protein sequence annotations. *Nucleic Acids Res.* 2019;47:D351-D360.
 38. Sonnhammer EL, von Heijne G, Krogh A. A hidden Markov model for predicting transmembrane helices in protein sequences. *Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol.* 1998;6:175-182.
 39. Krogh A, Larsson B, von Heijne G, Sonnhammer EL. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J Mol Biol.* 2001;305:567-580.
 40. Dogra S, Shaw D, Rudramurthy SM. Antifungal drug susceptibility testing of dermatophytes: Laboratory findings to clinical implications. *Indian Dermatol Online J.* 2019;10:225-233.
 41. Kahlmeter G, Brown DFJ, Goldstein FW, et al. European harmonization of MIC breakpoints for antimicrobial susceptibility testing of bacteria. *J Antimicrob Chemother.* 2003;52:145-148.
 42. Lockhart SR, Ghannoum MA, Alexander BD, Kraft CS. Establishment and use of epidemiological cutoff values for molds and yeasts by use of the Clinical and Laboratory Standards Institute M57 standard. *J Clin Microbiol.* 2017;55:1262-1268.
 43. Suss A, Uhrlass S, Ludes A, et al. Extensive tinea corporis due to a terbinafine-resistant *Trichophyton mentagrophytes* isolate of the Indian genotype in a young infant from Bahrain in Germany. *Hautarzt.* 2019;70:888-896.
 44. Kimura U, Hiruma M, Kano R, et al. Caution and warning: Arrival of terbinafine-resistant *Trichophyton interdigitale* of the Indian genotype, isolated from extensive dermatophytosis, in Japan. *J Dermatol.* 2020. <https://doi.org/10.1111/1346-8138.15300>. [Epub ahead of print].
 45. Taghipour S, Shamsizadeh F, Pchelini I, et al. Emergence of terbinafine resistant *Trichophyton mentagrophytes* in Iran, harboring mutations in the squalene epoxidase (SQLE) gene. *IDR.* 2020;13:845-850.
 46. Osborne CS, Leitner I, Favre B, Ryder NS. Amino acid substitution in *Trichophyton rubrum* squalene epoxidase associated with resistance to terbinafine. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49:2840-2844.
 47. Osborne CS, Leitner I, Hofbauer B, Fielding CA, Favre B, Ryder NS. Biological, biochemical, and molecular characterization of a new clinical *Trichophyton rubrum* isolate resistant to terbinafine. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006;50:2234-2236.

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section.

How to cite this article: Ebert A, Monod M, Salamin K, et al. Alarming India-wide phenomenon of antifungal resistance in dermatophytes: A multicentre study. *Mycoses.* 2020;63:717-728. <https://doi.org/10.1111/myc.13091>

3 Zusammenfassung der Arbeit

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades

Dr. med.

Titel: Prävalenz und Mechanismen von Antimykotikaresistenz bei indischen Dermatophyten

eingereicht von: Andreas Ebert

angefertigt am: Universitätsklinikum Leipzig AöR
Klinik und Poliklinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie

Betreuer: Professor Dr. med. Uwe Paasch

und angefertigt am: Labor für medizinische Mikrobiologie Mölbis

Betreuer: Professor Dr. med. Pietro Nenoff

August 2021

In Indien wird seit einigen Jahren eine zunehmende Inzidenz von chronisch-rezidivierenden Mykosen der Haut durch Dermatophyten beobachtet. In diesem Zusammenhang könnte Resistenz der Erreger eine Rolle spielen. Die vorliegende Arbeit untersuchte die Verbreitung von *In-vitro*-Resistenz bei indischen Dermatophyten gegen drei Antimykotika sowie zugrundeliegende Mutationen im Squalenepoxidase (*SQLE*)-Gen. Hierfür wurden Hautschuppen von 402 Patienten aus acht Orten in Indien, die unter dem klinischen Verdacht einer Dermatomykose standen, auf die Präsenz von Dermatophyten getestet. Die Erreger wurden mittels mikrobiologischer und molekularbiologischer Methoden identifiziert, ihre *In-vitro*-Empfindlichkeit gegen Terbinafin, Itraconazol und Voriconazol analysiert und das *SQLE*-Gen auf Missense-Mutationen gescreent.

In allen vier indischen Regionen – West, Nord, Ost und Süd - war *Trichophyton (T.) mentagrophytes* der am häufigsten identifizierte Dermatophyt (314 Proben, 78%), gefolgt von *T. rubrum* (19

Proben, 5%). Dieses Ergebnis fügt sich in frühere Beobachtungen ein, wonach in Indien parallel zum Inzidenz-Anstieg chronischer Dermatomykosen eine epidemiologische Verlagerung von *T. rubrum* zu *T. mentagrophytes/interdigitale* festgestellt wurde (17, 52, 53). Auf Subspezies-Ebene gehörten alle *T. mentagrophytes*-Isolate zum Internal Transcribed Spacer (ITS)-Type VIII, der geografisch dem Land Indien zuzuordnen ist (25).

297 Stämme konnten kulturell angezchtet und somit der Resistenzprüfung zugeführt werden. Minimale Hemmkonzentrationen (MHKs) wurden für Terbinafin, Itraconazol und Voriconazol mittels der standardisierten Mikrodilutionsmethode nach dem M38-A2-Protokoll des Clinical Standards and Laboratory Institutes (CLSI) bestimmt. Zusätzlich kam in der Empfindlichkeitstestung gegen Terbinafin eine Agardilutionsmethode mit Terbinafin-haltigem Nährmedium (0,2 µg/ml) zum Einsatz. Alle Stämme mit einer MHK $\geq 0,5$ µg/ml ($N = 203$) wuchsen auf Terbinafin-Agar und wurden als hochresistent eingeordnet. Unter diesen zeigten alle charakteristische Missense-Mutationen im *SQLE*-Gen, die beispielsweise zu den Aminosäure-Substitutionen Phe397Leu (188 Stämme) und Leu393Phe (6 Stämme) im *SQLE*-Protein führen und mit Terbinafin-Resistenz assoziiert sind (Singh et al. 2018). Dermatophyten mit einer MHK $\leq 0,125$ µg/ml ($N = 87$) wuchsen nicht auf Terbinafin-Agar und wiesen stets einen *SQLE*-Wildtyp oder eine Ala448Thr-Substitution auf. Sieben Stämme hatten eine MHK von 0,25 µg/ml, zeigten variables Wuchsverhalten auf Terbinafin-Agar und wurden als schwach-resistent eingestuft. Unter ihnen befanden sich Stämme mit zuvor noch nicht beschriebenen Ser443Pro- und Ser395Pro-Substitutionen im *SQLE*-Protein.

Diese Ergebnisse untermalen eine gute Methodenkongruenz zwischen der MHK-Bestimmung mittels Mikrodilution und dem Wuchsverhalten auf Terbinafin-Agar (0,2 µg/ml). Dies ist insofern relevant, als dass die Agardilution gegenüber der Mikrodilution als deutlich ressourcensparender gilt. Sie könnte daher eine effektive Alternative in der Überwachung der Entwicklung von Terbinafin-Resistenz bei Dermatophyten bieten. Zudem wiesen alle Terbinafin-resistenten Stämme Missense-Mutationen im *SQLE*-Gen, die zu Substitutionen im Bereich Leu393 bis Ser443 führen, auf. Währenddessen zeigten sensible Stämme stets einen *SQLE*-Wildtyp oder eine Ala448Thr-Substitution. Folglich könnte der *SQLE*-Genotyp von Dermatophyten möglicherweise als molekularer Marker von *In-vitro*-Resistenz gegen Terbinafin eingesetzt werden. Der große Vorteil dieser Methode besteht darin, dass die Sequenzierung des *SQLE*-Gens

aus Hautschuppen möglich ist (Burmester et al. 2019) und sie somit eine sehr zeitnahe Basis für einen initialen Therapieentscheid darstellen könnte. Es müsste im klinischen Alltag nicht auf den wochenlangen Prozess von Kultivierung und Resistenztestung gewartet werden.

Die Prävalenz von Terbinafin-Resistenz in vitro bei *T. mentagrophytes* ITS Type VIII bezifferte sich in der vorliegenden Arbeit auf ca. 75% in West-, Nord- und Ostindien. In diesen Regionen ist dies die bisher höchste Zahl in epidemiologischen Studien. Angesichts dieser Entwicklungen sollte die Empfehlung, Terbinafin als Medikament der Erstlinientherapie in Indien einzusetzen, kritisch reevaluiert werden.

Die MHK₉₀ der Triazole betragen für *T. mentagrophytes* ITS Typ VIII 0,25 µg/ml (Itraconazol) und 0,5 µg/ml (Voriconazol). Signifikante Unterschiede zwischen den Regionen waren nicht vorhanden. Die epidemiologischen Cut-off-Werte (ECOFFs), die die Wildtyp-Population statistisch von Stämmen mit mutationsbedingter Resistenz abgrenzen, lagen bei MHK ≤ 0,25 µg/ml (Itraconazol) und MHK ≤ 0,125 µg/ml (Voriconazol). Klinische MHK-Grenzwerte für den Einsatz von Antimykotika gegen Dermatophyten liegen noch nicht vor. Jedoch können diese ECOFF-Werte eine erste Basis für Therapieentscheidungen liefern.

Stämme, deren *SQLE* eine Ala448Thr-Substitution aufwies, zeigten signifikant höhere MHKs gegenüber Itraconazol und Voriconazol. Diese Assoziation warf die Frage nach einem plausiblen Resistenzmechanismus auf, denn Azolantimykotika inhibieren nicht die Squalenepoxidase, sondern die Lanosterol-14α-Demethylase – ein späteres Enzym in der Ergosterolsynthese. Bioinformatische Analysen der Aminosäuresequenz des *SQLE*-Enzyms ergaben die mögliche Existenz einer Transmembranhelix, die sich über die Stelle Ala448 erstreckt. Eine Threonin-Substitution an dieser Stelle verringerte die Vorhersagewahrscheinlichkeit der mutmaßlichen Transmembranhelix. Es ist vorstellbar, dass durch diese Substitution konformelle Änderungen stattfinden, die die Empfindlichkeit für Substanzen, die an späterer Stelle in die Ergosterolsynthese eingreifen, verändern. Auch wenn die Assoziation der Ala448Thr-Substitution mit verringerter Azol-Empfindlichkeit weniger deutlich ist als jene zwischen bestimmten *SQLE*-Substitutionen und Terbinafinresistenz, könnte sie die Erkennung von potenzieller Azolresistenz unterstützen.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass *In-vitro*-Terbinafinresistenz bei Dermatophyten in West-, Nord- und Ostindien eine herausragende Prävalenz aufwies. Angesichts des hohen Leidensdrucks von Patient*innen mit chronischen Dermatophytosen stellt sich die Frage nach Alternativen der Pharmakotherapie. Bestimmte *SQLE*-Substitutionen waren eng mit Terbinafinresistenz assoziiert und könnten ein schnelles und kosteneffektives Screeninginstrument darstellen. Die Bedeutung der rasanten Entwicklung der Situation beschränkt sich nicht auf Indien, sondern wird zum globalen Problem. Erste terbinafinresistente *T. mentagrophytes*-Stämme vom indischen Genotyp wurden in anderen asiatischen und europäischen Ländern, inklusive Deutschland, nachgewiesen (61, 69, 88–90).

4 Literaturverzeichnis

1. Mayser P. *Mykosen*. In: Plewig G, Ruzicka T, Kaufmann R, Hertl M (Hrsg.). *Braun-Falco's Dermatologie, Venerologie und Allergologie*. 7th ed. Springer Reference Medizin: Springer; 2018. S. 261–97.
2. Verma SB, Vasani R, Reszke R, Matusiak L, Szepietowski JC. *Prevalence and clinical characteristics of itch in epidemic-like scenario of dermatophytoses in India: a cross-sectional study*. J Eur Acad Dermatol Venereol 2020;34:180–3. doi: 10.1111/jdv.15877. PubMed PMID: 31419346.
3. Narang T, Bhattacharjee R, Singh S, Jha K, Kavita, Mahajan R, et al. *Quality of life and psychological morbidity in patients with superficial cutaneous dermatophytosis*. Mycoses 2019;62(8):680–5. doi: 10.1111/myc.12930. PubMed PMID: 31102543.
4. Male O. *The significance of mycology in medicine*. In: Hawksworth DL (Hrsg.). *Frontiers in Mycology*. Wallingford: C.A.B. International; 1990. S. 131–56.
5. Kaushik N, Pujalte GGA, Reese ST. *Superficial Fungal Infections*. Prim Care 2015;42(4):501–16. doi: 10.1016/j.pop.2015.08.004. PubMed PMID: 26612371.
6. Morishita N, Ninomiya J, Sei Y, Takiuchi I. *Effects of temperature, humidity, minor injury and washing on penetration of dermatophytes into human stratum corneum*. Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi 2003;44(4):269–71. PubMed PMID: 14615792 jpn.
7. Havlickova B, Czaika VA, Friedrich M. *Epidemiological trends in skin mycoses worldwide*. Mycoses 2008;51 Suppl 4:2–15. doi: 10.1111/j.1439-0507.2008.01606.x. PubMed PMID: 18783559.
8. Verma SB, Madhu R. *The great Indian epidemic of superficial dermatophytosis: An appraisal*. Indian J Dermatol 2017;62(3):227–36. doi: 10.4103/ijd.IJD_206_17. PubMed PMID: 28584364; PubMed Central PMCID: PMC5448256.

9. Panda S, Verma SB. *The menace of dermatophytosis in India: The evidence that we need*. Indian J Dermatol Venereol Leprol 2017;83(3):281–4. doi: 10.4103/ijdv.IJDVL_224_17. PubMed PMID: 28366915.
10. Pathania S, Rudramurthy SM, Narang T, Saikia UN, Dogra S. *A prospective study of the epidemiological and clinical patterns of recurrent dermatophytosis at a tertiary care hospital in India*. Indian J Dermatol Venereol Leprol 2018;84(6):678–84. doi: 10.4103/ijdv.IJDVL_645_17. PubMed PMID: 30058568.
11. Rajagopalan M, Inamadar A, Mittal A, Miskeen AK, Srinivas CR, Sardana K, et al. *Expert consensus on the management of dermatophytosis in India (ECTODERM India)*. BMC Dermatol 2018;18(1):6. doi: 10.1186/s12895-018-0073-1. PubMed PMID: 30041646; PubMed Central PMCID: PMC6057051.
12. Singh A, Masih A, Monroy-Nieto J, Kumar Singh P, Bowers J, Travis J, et al. *A unique multidrug-resistant clonal Trichophyton population distinct from Trichophyton mentagrophytes/Trichophyton interdigitale complex causing an ongoing alarming dermatophytosis outbreak in India: Genomic insights and resistance profile*. Fungal Genet Biol 2019:103266. doi: 10.1016/j.fgb.2019.103266. PubMed PMID: 31491507.
13. Khurana A, Sardana K, Chowdhary A. *Antifungal resistance in dermatophytes: Recent trends and therapeutic implications*. Fungal Genet Biol 2019;132:103255. doi: 10.1016/j.fgb.2019.103255. PubMed PMID: 31330295.
14. Singh S, Beena PM. *Profile of dermatophyte infections in Baroda*. Indian Journal of Dermatology, Venereology, and Leprology [Internet] 2003;69(4):281. Available from: <http://www.ijdv.com/article.asp?issn=0378-6323;year=2003;volume=69;issue=4;spage=281;epage=283;aulast=Singh;type=2>.
15. Lakshmanan A, Ganeshkumar P, Mohan SR, Hemamalini M, Madhavan R. *Epidemiological and clinical pattern of dermatomycoses in rural India*. Indian J Med Microbiol 2015;33 Suppl:134–6. doi: 10.4103/0255-0857.150922. PubMed PMID: 25657132.
16. Bhagra S, Ganju SA, Kanga A, Sharma NL, Guleria RC. *Mycological pattern of dermatophytosis in and around shimla hills*. Indian J Dermatol 2014;59(3):268–70.

doi: 10.4103/0019-5154.131392. PubMed PMID: 24891658; PubMed Central PMCID: PMC4037948.

17. Nenoff P, Verma SB, Vasani R, Burmester A, Hipler U-C, Wittig F, et al. *The current Indian epidemic of superficial dermatophytosis due to Trichophyton mentagrophytes–A molecular study.* Mycoses 2019;62(4):336–56. doi: 10.1111/myc.12878. PubMed PMID: 30561859.
18. Rudramurthy SM, Shankarnarayan SA, Dogra S, Shaw D, Mushtaq K, Paul RA, et al. *Mutation in the squalene epoxidase gene of Trichophyton interdigitale and Trichophyton rubrum associated with allylamine resistance.* Antimicrob Agents Chemother 2018;62(5):e02522-17. doi: 10.1128/AAC.02522-17. PubMed PMID: 29530857; PubMed Central PMCID: PMC5923174.
19. Hoog GS de, Dukik K, Monod M, Packeu A, Stubbe D, Hendrickx M, et al. *Toward a Novel Multilocus Phylogenetic Taxonomy for the Dermatophytes.* Mycopathologia 2017;182(1-2):5–31. doi: 10.1007/s11046-016-0073-9. PubMed PMID: 27783317; PubMed Central PMCID: PMC5283515.
20. Gräser Y, El Fari M, Vilgalys R, Kuijpers AF, Hoog GS de, Presber W, et al. *Phylogeny and taxonomy of the family Arthrodermataceae (dermatophytes) using sequence analysis of the ribosomal ITS region.* Med Mycol 1999;37(2):105–14. PubMed PMID: 10361266.
21. Gräser Y, Hoog GS de, Kuijpers AFA. *Recent advances in the molecular taxonomy of dermatophytes.* In: Kushwaha R. K. S., Guarro J. (Hrsg.). *Biology of dermatophytes and other.* Bilbao: Revista Iberoamericana de Micología; 2000.
22. Gräser Y, Monod M, Bouchara J-P, Dukik K, Nenoff P, Kargl A, et al. *New insights in dermatophyte research.* Med Mycol 2018;56(suppl_1):2–9. doi: 10.1093/mmy/myx141. PubMed PMID: 29538740.
23. Nenoff P, Herrmann J, Gräser Y. *Trichophyton mentagrophytes sive interdigitale? A dermatophyte in the course of time.* J Dtsch Dermatol Ges 2007;5(3):198–202. doi: 10.1111/j.1610-0387.2007.06180.x. PubMed PMID: 17338794.

24. Nenoff P, Verma SB, Uhrlaß S, Burmester A, Gräser Y. *A clarion call for preventing taxonomical errors of dermatophytes using the example of the novel Trichophyton mentagrophytes genotype VIII uniformly isolated in the Indian epidemic of superficial dermatophytosis*. *Mycoses* 2019;62:6–10. doi: 10.1111/myc.12848. PubMed PMID: 30187579.
25. Taghipour S, Pchelin IM, Zarei Mahmoudabadi A, Ansari S, Katirae F, Rafiei A, et al. *Trichophyton mentagrophytes and T interdigitale genotypes are associated with particular geographic areas and clinical manifestations*. *Mycoses* 2019;62:1084–91. doi: 10.1111/myc.12993. PubMed PMID: 31444823.
26. Tang C, Kong X, Ahmed SA, Thakur R, Chowdhary A, Nenoff P, et al. *Taxonomy of the Trichophyton mentagrophytes/T. interdigitale Species Complex Harboring the Highly Virulent, Multiresistant Genotype T. indotineae*. *Mycopathologia* 2021. doi: 10.1007/s11046-021-00544-2. PubMed PMID: 33847867.
27. Baumbach C-M, Müller S, Reuschel M, Uhrlaß S, Nenoff P, Baums CG, et al. *Identification of Zoophilic Dermatophytes Using MALDI-TOF Mass Spectrometry*. *Front Cell Infect Microbiol* 2021;11:631681. doi: 10.3389/fcimb.2021.631681. PubMed PMID: 33996620; PubMed Central PMCID: PMC8113951.
28. Nenoff P, Krüger C, Paasch U, Ginter-Hanselmayer G. *Mycology - an update Part 3: Dermatophytes: topical and systemic therapy*. *JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft* 2015;13(5):387-410; quiz 411. doi: 10.1111/ddg.12689. PubMed PMID: 25918080.
29. Newland JG, Abdel-Rahman SM. *Update on terbinafine with a focus on dermatophytoses*. *Clin Cosmet Investig Dermatol* 2009;2:49–63. doi: 10.2147/ccid.s3690. PubMed PMID: 21436968; PubMed Central PMCID: PMC3047923.
30. Sahoo AK, Mahajan R. *Management of tinea corporis, tinea cruris, and tinea pedis: A comprehensive review*. *Indian Dermatol Online J* 2016;7(2):77–86. doi: 10.4103/2229-5178.178099. PubMed PMID: 27057486; PubMed Central PMCID: PMC4804599.
31. Bishnoi A, Vinay K, Dogra S. *Emergence of recalcitrant dermatophytosis in India*. *The Lancet Infectious Diseases* 2018;18(3):250–1. doi: 10.1016/S1473-3099(18)30079-3.

32. Sardana K. *Systemic Antifungal Drugs*. In: Sardana K, Mahajan K, Pooja AM (Hrsg.). *Fungal Infections: Diagnosis and Treatment*. 1st ed. New Delhi: CBS Publishers & Distributors; 2017.
33. Shakya NB, Jha SM, Dangol A, Shakya S, Shah A. *Efficacy of Itraconazole Versus Terbinafine for the Treatment of Tinea cruris*. 1 2013;11(1):24–6. doi: 10.3126/mjsbh.v11i1.7763.
34. Bhatia A, Kanish B, Badyal DK, Kate P, Choudhary S. *Efficacy of oral terbinafine versus itraconazole in treatment of dermatophytic infection of skin - A prospective, randomized comparative study*. Indian J Pharmacol 2019;51(2):116–9. doi: 10.4103/ijp.IJP_578_17. PubMed PMID: 31142947; PubMed Central PMCID: PMC6533924.
35. Doncker P de, Pande S, Richarz U, Garodia N. *Itraconazole: What clinicians should know?* Indian J Drugs Dermatol 2017;3(1):4. doi: 10.4103/ijdd.ijdd_20_17.
36. Villars V, Jones TC. *Clinical efficacy and tolerability of terbinafine (Lamisil)—a new topical and systemic fungicidal drug for treatment of dermatomycoses*. Clin Exp Dermatol 1989;14(2):124–7. doi: 10.1111/j.1365-2230.1989.tb00908.x. PubMed PMID: 2689015.
37. Kumar A, Budania N, Sharma P, Singh M. *A comparative study of efficacy of terbinafine and fluconazole in patients of tinea corporis*. International Journal of Pharma Medicine and Biological Sciences 2013;4(2):92–8.
38. Babu PR, Pravin AJS, Deshmukh G, Dhoot D, Samant A, Kotak B. *Efficacy and Safety of Terbinafine 500 mg Once Daily in Patients with Dermatophytosis*. Indian J Dermatol 2017;62(4):395–9. doi: 10.4103/ijd.IJD_191_17. PubMed PMID: 28794551; PubMed Central PMCID: PMC5527721.
39. Singh S, Shukla P. *End of the road for terbinafine? Results of a pragmatic prospective cohort study of 500 patients*. Indian J Dermatol Venereol Leprol 2018;84(5):554–7. doi: 10.4103/ijdv.IJDVL_526_17. PubMed PMID: 29893296.
40. Verma SB. *Topical corticosteroid misuse in India is harmful and out of control*. BMJ 2015;351:h6079. doi: 10.1136/bmj.h6079. PubMed PMID: 26608450.

41. Sardana K. *Pathogenesis and Immunology of Dermatophytoses*. In: Sardana K, Mahajan K, Pooja AM (Hrsg.). *Fungal Infections: Diagnosis and Treatment*. 1st ed. New Delhi: CBS Publishers & Distributors; 2017.
42. Singh S, Verma P, Chandra U, Tiwary NK. *Risk factors for chronic and chronic-relapsing tinea corporis, tinea cruris and tinea faciei: Results of a case-control study*. Indian J Dermatol Venereol Leprol 2019;85(2):197–200. doi: 10.4103/ijdv.IJDVL_807_17. PubMed PMID: 30719987.
43. Mahajan S, Tilak R, Kaushal SK, Mishra RN, Pandey SS. *Clinico-mycological study of dermatophytic infections and their sensitivity to antifungal drugs in a tertiary care center*. Indian J Dermatol Venereol Leprol 2017;83(4):436–40. doi: 10.4103/ijdv.IJDVL_519_16. PubMed PMID: 28540871.
44. Sardana K, Kaur R, Arora P, Goyal R, Ghunawat S. *Is antifungal resistance a cause for treatment failure in dermatophytosis: A study focused on tinea corporis and cruris from a tertiary centre?* Indian Dermatol Online J 2018;9(2):90–5. doi: 10.4103/idoj.IDOJ_137_17. PubMed PMID: 29644192; PubMed Central PMCID: PMC5885633.
45. Verma SB. *Sales, status, prescriptions and regulatory problems with topical steroids in India*. Indian J Dermatol Venereol Leprol 2014;80(3):201–3. doi: 10.4103/0378-6323.132246. PubMed PMID: 24823396.
46. Schaller M, Friedrich M, Papini M, Pujol RM, Veraldi S. *Topical antifungal-corticosteroid combination therapy for the treatment of superficial mycoses: conclusions of an expert panel meeting*. Mycoses 2016;59(6):365–73. doi: 10.1111/myc.12481. PubMed PMID: 26916648.
47. Gupta AK, Chaudhry M, Elewski B. *Tinea corporis, tinea cruris, tinea nigra, and piedra*. Dermatologic Clinics 2003;21(3):395–400. doi: 10.1016/S0733-8635(03)00031-7.
48. Shivanna R, Inamadar A. *Clinical failure of antifungal therapy of dermatophytoses: Recurrence, resistance, and remedy*. 2455-3972 2017;3(1):1. doi: 10.4103/ijdd.ijdd_13_17.
49. Chaudhary RG, Rathod SP, Jagati A, Baxi K, Ambasana A, Patel D. *Prescription and Usage Pattern of Topical Corticosteroids among Out-patient Attendees with Dermatophyte Infections and Its Analysis: A Cross-sectional, Survey-based Study*. Indian Dermatol Online J 2019;10(3):279–

83. doi: 10.4103/idoj.IDOJ_335_18. PubMed PMID: 31149571; PubMed Central PMCID: PMC6536086.
50. Verma SB, Vasani R. *Male genital dermatophytosis - clinical features and the effects of the misuse of topical steroids and steroid combinations - an alarming problem in India*. *Mycoses* 2016;59(10):606–14. doi: 10.1111/myc.12503. PubMed PMID: 27028087.
51. Berkow EL, Lockhart SR, Ostrosky-Zeichner L. *Antifungal Susceptibility Testing: Current Approaches*. *Clin Microbiol Rev* 2020;33(3). doi: 10.1128/CMR.00069-19. PubMed PMID: 32349998.
52. Dabas Y, Xess I, Singh G, Pandey M, Meena S. *Molecular Identification and Antifungal Susceptibility Patterns of Clinical Dermatophytes Following CLSI and EUCAST Guidelines*. *J Fungi (Basel)* 2017;3(2):E17. doi: 10.3390/jof3020017. PubMed PMID: 29371535; PubMed Central PMCID: PMC5715923.
53. Khurana A, Masih A, Chowdhary A, Sardana K, Borker S, Gupta A, et al. *Correlation of in vitro susceptibility based on MICs and squalene epoxidase mutations with clinical response to terbinafine in patients with tinea corporis/cruris*. *Antimicrob Agents Chemother* 2018;62(12):e01038-18. doi: 10.1128/AAC.01038-18. PubMed PMID: 30275090; PubMed Central PMCID: PMC6256768.
54. Singh A, Masih A, Khurana A, Singh PK, Gupta M, Hagen F, et al. *High terbinafine resistance in Trichophyton interdigitale isolates in Delhi, India harbouring mutations in the squalene epoxidase gene*. *Mycoses* 2018;61(7):477–84. doi: 10.1111/myc.12772. PubMed PMID: 29577447.
55. Rodloff A. *Sensibilitätstestung*. In: Neumeister B (Hrsg.). *Mikrobiologische Diagnostik: Bakteriologie - Mykologie - Virologie - Parasitologie*. 2nd ed. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag; 2009.
56. Geiss HK. *Interpretation und Bewertung von antimikrobiellen Empfindlichkeitstestungen*. In: Neumeister B (Hrsg.). *Mikrobiologische Diagnostik: Bakteriologie - Mykologie - Virologie - Parasitologie*. 2nd ed. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag; 2009.

57. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. *Breakpoint tables for interpretation of MICs for antifungal agents, version 10.0*; 2020. Available from: <https://eucast.org/astoffungi/clinicalbreakpointsforantifungals/>.
58. Shaw D, Singh S, Dogra S, Jayaraman J, Bhat R, Panda S, et al. *Minimal inhibitory concentration and upper limit of wild type distribution for 13 antifungal agents against Trichophyton mentagrophytes/interdigitale complex of Indian origin*. *Antimicrob Agents Chemother* 2020. doi: 10.1128/AAC.01964-19. PubMed PMID: 32015042.
59. Osborne CS, Leitner I, Favre B, Ryder NS. *Amino acid substitution in Trichophyton rubrum squalene epoxidase associated with resistance to terbinafine*. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49(7):2840–4. doi: 10.1128/AAC.49.7.2840-2844.2005. PubMed PMID: 15980358; PubMed Central PMCID: PMC1168638.
60. Osborne CS, Leitner I, Hofbauer B, Fielding CA, Favre B, Ryder NS. *Biological, biochemical, and molecular characterization of a new clinical Trichophyton rubrum isolate resistant to terbinafine*. *Antimicrob Agents Chemother* 2006;50(6):2234–6. doi: 10.1128/AAC.01600-05. PubMed PMID: 16723593; PubMed Central PMCID: PMC1479141.
61. Saunte DML, Hare RK, Jørgensen KM, Jørgensen R, Deleuran M, Zachariae CO, et al. *Emerging terbinafine resistance in Trichophyton: clinical characteristics, squalene epoxidase gene mutations and a reliable EUCAST method for detection*. *Antimicrob Agents Chemother* 2019;63:e01126-19. doi: 10.1128/AAC.01126-19.
62. Arendrup MC, Meletiadis J, Mouton JW, Lagrou K, Hamal P, Guinea J, et al. *EUCAST Definitive Document E.Def 9.3.1. Method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for conidia forming moulds.*; 2017. Available from: https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/AFST/Files/EUCAST_E_Def_9.3.2_Mould_testing_definitive_revised_2020.pdf.
63. CLSI. *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi*. 3rd ed. *CLSI standard M38*. Wayne, PA; 2017.
64. Dogra S, Shaw D, Rudramurthy SM. *Antifungal drug susceptibility testing of dermatophytes: Laboratory findings to clinical implications*. *Indian Dermatol Online J* 2019;10(3):225–33.

- doi: 10.4103/idoj.IDOJ_146_19. PubMed PMID: 31149563; PubMed Central PMCID: PMC6536077.
65. Nenoff P, Hausteil UF, Brandt W. *Antifungal activity of the essential oil of Melaleuca alternifolia (tea tree oil) against pathogenic fungi in vitro*. *Skin Pharmacol* 1996;9(6):388–94. doi: 10.1159/000211450. PubMed PMID: 9055360.
66. Butty P, Lebecq J. C., Mallié M., Bastide J. M. *Evaluation of the susceptibility of dermatophytes to antifungal drugs: a new technique*. *Journal of medical and veterinary mycology* 1995;33:403–9.
67. Mota CRA, Miranda KC, Lemos JdA, Costa CR, Hasimoto e Souza, Lucia Kioko, Passos XS, et al. *Comparison of in vitro activity of five antifungal agents against dermatophytes, using the agar dilution and broth microdilution methods*. *Rev Soc Bras Med Trop* 2009;42(3):250–4. doi: 10.1590/s0037-86822009000300003. PubMed PMID: 19684970.
68. Yamada T, Maeda M, Alshahni MM, Tanaka R, Yaguchi T, Bontems O, et al. *Terbinafine resistance of Trichophyton clinical isolates caused by specific point mutations in the squalene epoxidase gene*. *Antimicrob Agents Chemother* 2017;61(7):e00115-17. doi: 10.1128/AAC.00115-17. PubMed PMID: 28416557; PubMed Central PMCID: PMC5487658.
69. Burmester A, Hipler U-C, Henschel R, Elsner P, Wiegand C. *Point mutations in the squalene epoxidase gene of Indian ITS genotype VIII T. mentagrophytes identified after DNA isolation from infected scales*. *Med Mycol Case Rep* 2019;26:23–4. doi: 10.1016/j.mmcr.2019.09.001.
70. Ryder NS. *Specific inhibition of fungal sterol biosynthesis by SF 86-327, a new allylamine antimycotic agent*. *Antimicrob Agents Chemother* 1985;27(2):252–6. doi: 10.1128/aac.27.2.252. PubMed PMID: 4039119; PubMed Central PMCID: PMC176248.
71. Ryder NS. *Terbinafine: mode of action and properties of the squalene epoxidase inhibition*. *Br J Dermatol* 1992;126 Suppl 39:2–7. doi: 10.1111/j.1365-2133.1992.tb00001.x. PubMed PMID: 1543672.

72. Mukherjee PK, Leidich SD, Isham N, Leitner I, Ryder NS, Ghannoum MA. *Clinical Trichophyton rubrum strain exhibiting primary resistance to terbinafine*. Antimicrob Agents Chemother 2003;47(1):82–6. doi: 10.1128/aac.47.1.82-86.2003. PubMed PMID: 12499173; PubMed Central PMCID: PMC148991.
73. Hsieh A, Quenan S, Riat A, Toutous-Trellu L, Fontao L. *A new mutation in the SQLE gene of Trichophyton mentagrophytes associated to terbinafine resistance in a couple with disseminated tinea corporis*. Journal de Mycologie Médicale 2019:100903. doi: 10.1016/j.mycmed.2019.100903.
74. Barreiro C, Gutiérrez S, Olivera ER. *Fungal Horizontal Gene Transfer: A History Beyond the Phylogenetic Kingdoms*. In: Villa TG, Viñas M (Hrsg.). *Horizontal Gene Transfer: Breaking Borders Between Living Kingdoms*: Springer International Publishing; 2019. S. 315–36.
75. Hitchcock CA, Dickinson K, Brown SB, Evans EG, Adams DJ. *Interaction of azole antifungal antibiotics with cytochrome P-450-dependent 14 alpha-sterol demethylase purified from Candida albicans*. Biochem J 1990;266(2):475–80. doi: 10.1042/bj2660475. PubMed PMID: 2180400; PubMed Central PMCID: PMC1131156.
76. Ghannoum M. *Azole Resistance in Dermatophytes: Prevalence and Mechanism of Action*. J Am Podiatr Med Assoc 2016;106(1):79–86. doi: 10.7547/14-109. PubMed PMID: 26895366.
77. Niwa T, Imagawa Y, Yamazaki H. *Drug interactions between nine antifungal agents and drugs metabolized by human cytochromes P450*. Curr Drug Metab 2014;15(7):651–79. doi: 10.2174/1389200215666141125121511. PubMed PMID: 25429674.
78. Zanger UM, Schwab M. *Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: Regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation*. Pharmacology & Therapeutics 2013;138(1):103–41. doi: 10.1016/j.pharmthera.2012.12.007.
79. Brüggemann RJM, Alffenaar J-WC, Blijlevens NMA, Billaud EM, Kosterink JGW, Verweij PE, et al. *Clinical Relevance of the Pharmacokinetic Interactions of Azole Antifungal Drugs with Other Coadministered Agents*. Clin Infect Dis 2009;48(10):1441–58. doi: 10.1086/598327.

80. Girmenia C. *New generation azole antifungals in clinical investigation*. *Expert Opinion on Investigational Drugs* 2009;18(9):1279–95. doi: 10.1517/13543780903176407.
81. Feng W, Yang J, Xi Z, Qiao Z, Lv Y, Wang Y, et al. *Mutations and/or Overexpressions of ERG4 and ERG11 Genes in Clinical Azoles-Resistant Isolates of Candida albicans*. *Microbial drug resistance (Larchmont, N.Y.)* 2017;23(5):563–70. doi: 10.1089/mdr.2016.0095. PubMed PMID: 27976986.
82. Diao Y, Zhao R, Deng X, Leng W, Peng J, Jin Q. *Transcriptional profiles of Trichophyton rubrum in response to itraconazole*. *Med Mycol* 2009;47(3):237–47. doi: 10.1080/13693780802227308. PubMed PMID: 18663659.
83. Coleman JJ, Mylonakis E. *Efflux in fungi: la pièce de résistance*. *PLOS Pathogens* 2009;5(6):e1000486. doi: 10.1371/journal.ppat.1000486. PubMed PMID: 19557154; PubMed Central PMCID: PMC2695561.
84. Cervelatti EP, Fachin AL, Ferreira-Nozawa MS, Martinez-Rossi NM. *Molecular cloning and characterization of a novel ABC transporter gene in the human pathogen Trichophyton rubrum*. *Med Mycol* 2006;44(2):141–7. doi: 10.1080/13693780500220449. PubMed PMID: 16519017.
85. Fachin AL, Ferreira-Nozawa MS, Maccheroni W, JR, Martinez-Rossi NM. *Role of the ABC transporter TruMDR2 in terbinafine, 4-nitroquinoline N-oxide and ethidium bromide susceptibility in Trichophyton rubrum*. *J Med Microbiol* 2006;55(Pt 8):1093–9. doi: 10.1099/jmm.0.46522-0. PubMed PMID: 16849730.
86. Monod M, Feuermann M, Salamin K, Fratti M, Makino M, Alshahni MM, et al. *Trichophyton rubrum azole resistance mediated by a new ABC transporter, TruMDR3*. *Antimicrob Agents Chemother* 2019;63:e00863-19. doi: 10.1128/AAC.00863-19. PubMed PMID: 31501141.
87. Hryniewicz-Gwóźdz A, Kalinowska K, Plomer-Niezgoda E, Bielecki J, Jagielski T. *Increase in resistance to fluconazole and itraconazole in Trichophyton rubrum clinical isolates by sequential passages in vitro under drug pressure*. *Mycopathologia* 2013;176(1-2):49–55. doi: 10.1007/s11046-013-9655-y. PubMed PMID: 23595653.

88. Süß A, Uhrlaß S, Ludes A, Verma SB, Monod M, Kruger C, et al. *Extensive tinea corporis due to a terbinafine-resistant Trichophyton mentagrophytes isolate of the Indian genotype in a young infant from Bahrain in Germany.* Hautarzt 2019;70(11):888–96. doi: 10.1007/s00105-019-4431-7. PubMed PMID: 31098692.
89. Taghipour S, Shamsizadeh F, Pchelin I, Rezaei-Matehkolaei A, Zarei Mahmoudabadi A, Valadan R, et al. *Emergence of terbinafine resistant Trichophyton mentagrophytes in Iran, harboring mutations in the squalene epoxidase (SQLE) gene.* IDR 2020;Volume 13:845–50. doi: 10.2147/IDR.S246025.
90. Kimura U, Hiruma M, Kano R, Matsumoto T, Noguchi H, Takamori K, et al. *Caution and warning: Arrival of terbinafine-resistant Trichophyton interdigitale of the Indian genotype, isolated from extensive dermatophytosis, in Japan.* J Dermatol 2020. doi: 10.1111/1346-8138.15300. PubMed PMID: 32157721.

5 Darstellung des eigenen Beitrags zur Publikation

Article: "Alarming India-wide phenomenon of antifungal resistance in dermatophytes: A multicentre study"

Journal: Mycoses

Authors: Andreas Ebert, Michel Monod, Karine Salamin, Anke Burmester, Silke Uhrlaß, Cornelia Wiegand, Uta-Christina Hipler, Constanze Krüger, Daniela Koch, Franziska Wittig, Shyam B. Verma, Archana Singal, Sanjeev Gupta, Resham Vasani, Abir Saraswat, Rengarajan Madhu, Saumya Panda, Anupam Das, Mahendra M. Kura, Akshy Kumar, Shital Poojary, Sibylle Schirm, Yvonne Gräser, Uwe Paasch, Pietro Nenoff

I hereby confirm that Andreas Ebert contributed to the above-mentioned article by

- Conceptualization
- Data curation
- Formal analysis
- Investigation
- Project administration
- Software
- Visualisation
- Writing and editing of the manuscript

Date: 17 05 2021

Name: Michel Monod

Signature:



Article: "Alarming India-wide phenomenon of antifungal resistance in dermatophytes: A multicentre study"

Journal: Mycoses

Authors: Andreas Ebert, Michel Monod, Karine Salamin, Anke Burmester, Silke Uhrlauf, Cornelia Wiegand, Uta-Christina Hipler, Constanze Krüger, Daniela Koch, Franziska Wittig, Shyam B. Verma, Archana Singal, Sanjeev Gupta, Resham Vasani, Abir Saraswat, Rengarajan Madhu, Saumya Panda, Anupam Das, Mahendra M. Kura, Akshy Kumar, Shital Poojary, Sibylle Schirm, Yvonne Gräser, Uwe Paasch, Pietro Nenoff

I hereby confirm that Andreas Ebert contributed to the above-mentioned article by

- Conceptualization
- Data curation
- Formal analysis
- Investigation
- Project administration
- Software
- Visualisation
- Writing and editing of the manuscript

Date: 17 05 2021

Name: Karine Salamin

Signature: 

Article: "Alarming India-wide phenomenon of antifungal resistance in dermatophytes: A multicentre study"

Journal: Mycoses

Authors: Andreas Ebert, Michel Monod, Karine Salamin, Anke Burmester, Silke Uhrlaß, Cornelia Wiegand, Uta-Christina Hipler, Constanze Krüger, Daniela Koch, Franziska Wittig, Shyam B. Verma, Archana Singal, Sanjeev Gupta, Resham Vasani, Abir Saraswat, Rengarajan Madhu, Saumya Panda, Anupam Das, Mahendra M. Kura, Akshy Kumar, Shital Poojary, Sibylle Schirm, Yvonne Gräser, Uwe Paasch, Pietro Nenoff

I hereby confirm that Andreas Ebert contributed to the above-mentioned article by

- Conceptualization
- Data curation
- Formal analysis
- Investigation
- Project administration
- Software
- Visualisation
- Writing and editing of the manuscript

Date: 17.05.2021

Name: Dr. rer. nat. habil. Anke Burmester

Signature:



Article: "Alarming India-wide phenomenon of antifungal resistance in dermatophytes: A multicentre study"

Journal: Mycoses

Authors: Andreas Ebert, Michel Monod, Karine Salamin, Anke Burmester, Silke Uhrlaß, Cornelia Wiegand, Uta-Christina Hipler, Constanze Krüger, Daniela Koch, Franziska Wittig, Shyam B. Verma, Archana Singal, Sanjeev Gupta, Resham Vasani, Abir Saraswat, Rengarajan Madhu, Saumya Panda, Anupam Das, Mahendra M. Kura, Akshy Kumar, Shital Poojary, Sibylle Schirm, Yvonne Gräser, Uwe Paasch, Pietro Nenoff

I hereby confirm that Andreas Ebert contributed to the above-mentioned article by

- Conceptualization
- Data curation
- Formal analysis
- Investigation
- Project administration
- Software
- Visualisation
- Writing and editing of the manuscript

Date: 17.05.2021

Name: Silke Uhrlaß

Signature: S. Uhrlaß

Article: "Alarming India-wide phenomenon of antifungal resistance in dermatophytes: A multicentre study"

Journal: Mycoses

Authors: Andreas Ebert, Michel Monod, Karine Salamin, Anke Burmester, Silke Uhrlaß, Cornelia Wiegand, Uta-Christina Hipler, Constanze Krüger, Daniela Koch, Franziska Wittig, Shyam B. Verma, Archana Singal, Sanjeev Gupta, Resham Vasani, Abir Saraswat, Rengarajan Madhu, Saumya Panda, Anupam Das, Mahendra M. Kura, Akshy Kumar, Shital Poojary, Sibylle Schirm, Yvonne Gräser, Uwe Paasch, Pietro Nenoff

I hereby confirm that Andreas Ebert contributed to the above-mentioned article by

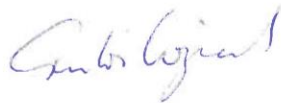
- Conceptualization
- Data curation
- Formal analysis
- Investigation
- Project administration
- Software
- Visualisation
- Writing and editing of the manuscript

Date: 18.05.2021

Name: PD Dr. Cornelia Wiegand

Klinik für Hautkrankheiten, Universitätsklinikum Jena

Signature:



Article: "Alarming India-wide phenomenon of antifungal resistance in dermatophytes: A multicentre study"

Journal: Mycoses

Authors: Andreas Ebert, Michel Monod, Karine Salamin, Anke Burmester, Silke Uhrlaß, Cornelia Wiegand, Uta-Christina Hipler, Constanze Krüger, Daniela Koch, Franziska Wittig, Shyam B. Verma, Archana Singal, Sanjeev Gupta, Resham Vasani, Abir Saraswat, Rengarajan Madhu, Saumya Panda, Anupam Das, Mahendra M. Kura, Akshy Kumar, Shital Poojary, Sibylle Schirm, Yvonne Gräser, Uwe Paasch, Pietro Nenoff

I hereby confirm that Andreas Ebert contributed to the above-mentioned article by

- Conceptualization
- Data curation
- Formal analysis
- Investigation
- Project administration
- Software
- Visualisation
- Writing and editing of the manuscript

Date: 18.5.2021

Name: Uta - Christina Hipler

Signature:



Article: "Alarming India-wide phenomenon of antifungal resistance in dermatophytes: A multicentre study"

Journal: Mycoses

Authors: Andreas Ebert, Michel Monod, Karine Salamin, Anke Burmester, Silke Uhrlaß, Cornelia Wiegand, Uta-Christina Hipler, Constanze Krüger, Daniela Koch, Franziska Wittig, Shyam B. Verma, Archana Singal, Sanjeev Gupta, Resham Vasani, Abir Saraswat, Rengarajan Madhu, Saumya Panda, Anupam Das, Mahendra M. Kura, Akshy Kumar, Shital Poojary, Sibylle Schirm, Yvonne Gräser, Uwe Paasch, Pietro Nenoff

I hereby confirm that Andreas Ebert contributed to the above-mentioned article by

- Conceptualization
- Data curation
- Formal analysis
- Investigation
- Project administration
- Software
- Visualisation
- Writing and editing of the manuscript

Date: 17.5.2021

Name: Constanze Krüger

Signature: 

Article: "Alarming India-wide phenomenon of antifungal resistance in dermatophytes: A multicentre study"
Journal: Mycoses
Authors: Andreas Ebert, Michel Monod, Karine Salamin, Anke Burmester, Silke Uhrlaß, Cornelia Wiegand, Uta-Christina Hipler, Constanze Krüger, Daniela Koch, Franziska Wittig, Shyam B. Verma, Archana Singal, Sanjeev Gupta, Resham Vasani, Abir Saraswat, Rengarajan Madhu, Saumya Panda, Anupam Das, Mahendra M. Kura, Akshy Kumar, Shital Poojary, Sibylle Schirm, Yvonne Gräser, Uwe Paasch, Pietro Nenoff

I hereby confirm that Andreas Ebert contributed to the above-mentioned article by

- Conceptualization
- Data curation
- Formal analysis
- Investigation
- Project administration
- Software
- Visualisation
- Writing and editing of the manuscript

Date: 17.05.2021

Name: Daniela Koch

Signature:



Article: "Alarming India-wide phenomenon of antifungal resistance in dermatophytes: A multicentre study"

Journal: Mycoses

Authors: Andreas Ebert, Michel Monod, Karine Salamin, Anke Burmester, Silke Uhrlaß, Cornelia Wiegand, Uta-Christina Hipler, Constanze Krüger, Daniela Koch, Franziska Wittig, Shyam B. Verma, Archana Singal, Sanjeev Gupta, Resham Vasani, Abir Saraswat, Rengarajan Madhu, Saumya Panda, Anupam Das, Mahendra M. Kura, Akshy Kumar, Shital Poojary, Sibylle Schirm, Yvonne Gräser, Uwe Paasch, Pietro Nenoff

I hereby confirm that Andreas Ebert contributed to the above-mentioned article by

- Conceptualization
- Data curation
- Formal analysis
- Investigation
- Project administration
- Software
- Visualisation
- Writing and editing of the manuscript

Date: 17.5.2021

Name: Franziska Wittig

Signature: i. A. S. Uhrlaß

Article: "Alarming India-wide phenomenon of antifungal resistance in dermatophytes: A multicentre study"

Journal: Mycoses

Authors: Andreas Ebert, Michel Monod, Karine Salamin, Anke Burmester, Silke Uhrlaß, Cornelia Wiegand, Uta-Christina Hipler, Constanze Krüger, Daniela Koch, Franziska Wittig, Shyam B. Verma, Archana Singal, Sanjeev Gupta, Resham Vasani, Abir Saraswat, Rengarajan Madhu, Saumya Panda, Anupam Das, Mahendra M. Kura, Akshy Kumar, Shital Poojary, Sibylle Schirm, Yvonne Gräser, Uwe Paasch, Pietro Nenoff

I hereby confirm that Andreas Ebert contributed to the above-mentioned article by

- Conceptualization
- Data curation
- Formal analysis
- Investigation
- Project administration
- Software
- Visualisation
- Writing and editing of the manuscript

Date: 15th May 2021

Name: Archana Singal

Prof Archana Singal, MD FAMS

University College of Medical Sciences & GTB Hospital, New Delhi. INDIA



Signature:

Article: "Alarming India-wide phenomenon of antifungal resistance in dermatophytes: A multicentre study"

Journal: Mycoses

Authors: Andreas Ebert, Michel Monod, Karine Salamin, Anke Burmester, Silke Uhrlaß, Cornelia Wiegand, Uta-Christina Hipler, Constanze Krüger, Daniela Koch, Franziska Wittig, Shyam B. Verma, Archana Singal, Sanjeev Gupta, Resham Vasani, Abir Saraswat, Rengarajan Madhu, Saumya Panda, Anupam Das, Mahendra M. Kura, Akshy Kumar, Shital Poojary, Sibylle Schirm, Yvonne Gräser, Uwe Paasch, Pietro Nenoff

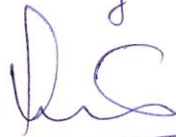
I hereby confirm that Andreas Ebert contributed to the above-mentioned article by

- Conceptualization
- Data curation
- Formal analysis
- Investigation
- Project administration
- Software
- Visualisation
- Writing and editing of the manuscript

Date: 15 May, 2021

Name: Dr. Sanjeev Gupta

Signature:


15/5/2021

Article: "Alarming India-wide phenomenon of antifungal resistance in dermatophytes: A multicentre study"

Journal: Mycoses

Authors: Andreas Ebert, Michel Monod, Karine Salamin, Anke Burmester, Silke Uhrlaß, Cornelia Wiegand, Uta-Christina Hipler, Constanze Krüger, Daniela Koch, Franziska Wittig, Shyam B. Verma, Archana Singal, Sanjeev Gupta, Resham Vasani, Abir Saraswat, Rengarajan Madhu, Saumya Panda, Anupam Das, Mahendra M. Kura, Akshy Kumar, Shital Poojary, Sibylle Schirm, Yvonne Gräser, Uwe Paasch, Pietro Nenoff

I hereby confirm that Andreas Ebert contributed to the above-mentioned article by

- Conceptualization
- Data curation
- Formal analysis
- Investigation
- Project administration
- Software
- Visualisation
- Writing and editing of the manuscript

Date: 14th May 2021

Name: Resham Vasani

Signature:



Article: "Alarming India-wide phenomenon of antifungal resistance in dermatophytes: A multicentre study"

Journal: Mycoses

Authors: Andreas Ebert, Michel Monod, Karine Salamin, Anke Burmester, Silke Uhrlaß, Cornelia Wiegand, Uta-Christina Hipler, Constanze Krüger, Daniela Koch, Franziska Wittig, Shyam B. Verma, Archana Singal, Sanjeev Gupta, Resham Vasani, Abir Saraswat, Rengarajan Madhu, Saumya Panda, Anupam Das, Mahendra M. Kura, Akshy Kumar, Shital Poojary, Sibylle Schirm, Yvonne Gräser, Uwe Paasch, Pietro Nenoff

I hereby confirm that Andreas Ebert contributed to the above-mentioned article by

- Conceptualization
- Data curation
- Formal analysis
- Investigation
- Project administration
- Software
- Visualisation
- Writing and editing of the manuscript

Date: 18 MAY 2021

Name: ABIR SARASWAT

Signature: 

Article: "Alarming India-wide phenomenon of antifungal resistance in dermatophytes: A multicentre study"

Journal: Mycoses

Authors: Andreas Ebert, Michel Monod, Karine Salamin, Anke Burmester, Silke Uhrlaß, Cornelia Wiegand, Uta-Christina Hipler, Constanze Krüger, Daniela Koch, Franziska Wittig, Shyam B. Verma, Archana Singal, Sanjeev Gupta, Resham Vasani, Abir Saraswat, Rengarajan Madhu, Saumya Panda, Anupam Das, Mahendra M. Kura, Akshy Kumar, Shital Poojary, Sibylle Schirm, Yvonne Gräser, Uwe Paasch, Pietro Nenoff

I hereby confirm that Andreas Ebert contributed to the above-mentioned article by

- Conceptualization
- Data curation
- Formal analysis
- Investigation
- Project administration
- Software
- Visualisation
- Writing and editing of the manuscript

Date: 15.05.2021

Name: DR SAUMYA PANDA

Signature: 

Article: "Alarming India-wide phenomenon of antifungal resistance in dermatophytes: A multicentre study"

Journal: Mycoses

Authors: Andreas Ebert, Michel Monod, Karine Salamin, Anke Burmester, Silke Uhrlaß, Cornelia Wiegand, Uta-Christina Hipler, Constanze Krüger, Daniela Koch, Franziska Wittig, Shyam B. Verma, Archana Singal, Sanjeev Gupta, Resham Vasani, Abir Saraswat, Rengarajan Madhu, Saumya Panda, Anupam Das, Mahendra M. Kura, Akshy Kumar, Shital Poojary, Sibylle Schirm, Yvonne Gräser, Uwe Paasch, Pietro Nenoff

I hereby confirm that Andreas Ebert contributed to the above-mentioned article by

- Conceptualization
- Data curation
- Formal analysis
- Investigation
- Project administration
- Software
- Visualisation
- Writing and editing of the manuscript

Date: 15.05.2021

Name: Dr Anupam Das



Signature:

Article: "Alarming India-wide phenomenon of antifungal resistance in dermatophytes: A multicentre study"

Journal: Mycoses

Authors: Andreas Ebert, Michel Monod, Karine Salamin, Anke Burmester, Silke Uhrlaß, Cornelia Wiegand, Uta-Christina Hipler, Constanze Krüger, Daniela Koch, Franziska Wittig, Shyam B. Verma, Archana Singal, Sanjeev Gupta, Resham Vasani, Abir Saraswat, Rengarajan Madhu, Saumya Panda, Anupam Das, Mahendra M. Kura, Akshy Kumar, Shital Poojary, Sibylle Schirm, Yvonne Gräser, Uwe Paasch, Pietro Nenoff

I hereby confirm that Andreas Ebert contributed to the above-mentioned article by

- Conceptualization
- Data curation
- Formal analysis
- Investigation
- Project administration
- Software
- Visualisation
- Writing and editing of the manuscript

Date: 15-5-2021

Name: DR Shital Poojary



Signature:

Article: "Alarming India-wide phenomenon of antifungal resistance in dermatophytes: A multicentre study"

Journal: Mycoses

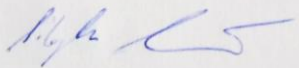
Authors: Andreas Ebert, Michel Monod, Karine Salamin, Anke Burmester, Silke Uhrlaß, Cornelia Wiegand, Uta-Christina Hipler, Constanze Krüger, Daniela Koch, Franziska Wittig, Shyam B. Verma, Archana Singal, Sanjeev Gupta, Resham Vasani, Abir Saraswat, Rengarajan Madhu, Saumya Panda, Anupam Das, Mahendra M. Kura, Akshy Kumar, Shital Poojary, Sibylle Schirm, Yvonne Gräser, Uwe Paasch, Pietro Nenoff

I hereby confirm that Andreas Ebert contributed to the above-mentioned article by

- Conceptualization
- Data curation
- Formal analysis
- Investigation
- Project administration
- Software
- Visualisation
- Writing and editing of the manuscript

Date: 18.05.2021

Name: Sibylle Schirm

Signature: 

Article: "Alarming India-wide phenomenon of antifungal resistance in dermatophytes: A multicentre study"

Journal: Mycoses

Authors: Andreas Ebert, Michel Monod, Karine Salamin, Anke Burmester, Silke Uhrlaß, Cornelia Wiegand, Uta-Christina Hipler, Constanze Krüger, Daniela Koch, Franziska Wittig, Shyam B. Verma, Archana Singal, Sanjeev Gupta, Resham Vasani, Abir Saraswat, Rengarajan Madhu, Saumya Panda, Anupam Das, Mahendra M. Kura, Akshy Kumar, Shital Poojary, Sibylle Schirm, Yvonne Gräser, Uwe Paasch, Pietro Nenoff

I hereby confirm that Andreas Ebert contributed to the above-mentioned article by

- Conceptualization
- Data curation
- Formal analysis
- Investigation
- Project administration
- Software
- Visualisation
- Writing and editing of the manuscript

Date: 18.05.2021

Name: Prof. Yvonne Gräser²

Signature: 

Article: "Alarming India-wide phenomenon of antifungal resistance in dermatophytes: A multicentre study"
Journal: Mycoses
Authors: Andreas Ebert, Michel Monod, Karine Salamin, Anke Burmester, Silke Uhrlaß, Cornelia Wiegand, Uta-Christina Hipler, Constanze Krüger, Daniela Koch, Franziska Wittig, Shyam B. Verma, Archana Singal, Sanjeev Gupta, Resham Vasani, Abir Saraswat, Rengarajan Madhu, Saumya Panda, Anupam Das, Mahendra M. Kura, Akshy Kumar, Shital Poojary, Sibylle Schirm, Yvonne Gräser, Uwe Paasch, Pietro Nenoff

I hereby confirm that Andreas Ebert contributed to the above-mentioned article by

- Conceptualization
- Data curation
- Formal analysis
- Investigation
- Project administration
- Software
- Visualisation
- Writing and editing of the manuscript

Date: 13.05.21

Name: Praxis Prof. Dr. med. habil. Uwe Paasch
Prof. Dr. med. habil. Uwe Paasch
LANR 105829521
Facharzt für Haut- und Geschlechtskrankheiten
Lindenstraße 20, 04838 Jesewitz OT Gotha
Tel. 03423.68820 FAX 03423.688216
96/1662000

Signature: 

Article: "Alarming India-wide phenomenon of antifungal resistance in dermatophytes: A multicentre study"

Journal: Mycoses

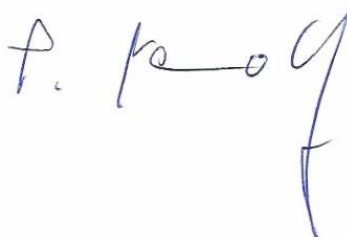
Authors: Andreas Ebert, Michel Monod, Karine Salamin, Anke Burmester, Silke Uhrlaß, Cornelia Wiegand, Uta-Christina Hipler, Constanze Krüger, Daniela Koch, Franziska Wittig, Shyam B. Verma, Archana Singal, Sanjeev Gupta, Resham Vasani, Abir Saraswat, Rengarajan Madhu, Saumya Panda, Anupam Das, Mahendra M. Kura, Akshy Kumar, Shital Poojary, Sibylle Schirm, Yvonne Gräser, Uwe Paasch, Pietro Nenoff

I hereby confirm that Andreas Ebert contributed to the above-mentioned article by

- Conceptualization
- Data curation
- Formal analysis
- Investigation
- Project administration
- Software
- Visualisation
- Writing and editing of the manuscript

Date: 17.5.21

Name: Prof. Dr. med. Pietro Nenoff
Haut- und Laborarzt / Allergologie
Andrologie
Mölbiser Hauptstr.8 / 04571 Rötha OT Möbke
Telefon 034947-50323

Signature: 

6 Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar eine Vergütung oder geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Die aktuellen gesetzlichen Vorgaben in Bezug auf die Zulassung der klinischen Studien, die Bestimmungen des Tierschutzgesetzes, die Bestimmungen des Gentechnikgesetzes und die allgemeinen Datenschutzbestimmungen wurden eingehalten. Ich versichere, dass ich die Regelungen der Satzung der Universität Leipzig zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis kenne und eingehalten habe.

.....

Datum

.....

Unterschrift

7 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name Andreas Ebert
Geburtsdatum / -ort 04.07.1994 / Zwenkau
Nationalität deutsch
Familienstand ledig

Ausbildung

11/2020 **2. Staatsexamen**, Note 2,0
seit 09/2018 Doktorand im Labor für medizinische Mikrobiologie Rötha bei Prof. Dr. Pietro Nenoff
09/2016 **1. Staatsexamen**, Note 2,0
seit 10/2014 Studium der Humanmedizin an der Universität Leipzig, aktuell 10. Fachsemester
07/2014 **Abitur**, Abschlussnote 1,0
08/2012 – 07/2014 Immanuel-Kant-Gymnasium Leipzig
08/2011 – 05/2012 Southeast Polk High School, Iowa, USA
09/2005 – 07/2011 Wilhelm-Ostwald-Gymnasium Leipzig (mathematisch-naturwissenschaftliches Profil)

Kenntnisse

Sprachkenntnisse Englisch (11 Lernjahre, fließend) mit Fachsprachenzertifikat UNlcert Stufe III
Französisch (6 Lernjahre), Spanisch (1 Lernjahr)
Führerschein Klasse B

Famulaturen und Nebentätigkeiten

26.02. – 27.03.2020 Famulatur Park-Klinikum Leipzig, Station für Psychiatrie
05.07. – 19.07.2019 Famulatur Hautarztpraxis Dr. Fischer, Leipzig
04.09. – 05.10.2017 Famulatur Oberlandpraxis Stadtlauringen (Allgemeinmedizin)
10.07. – 08.08.2017 Famulatur Diakonissenkrankenhaus Leipzig, Station Hämatologie
04/2018 – 09/2019 Studentischer Tutor in der Lernklinik Leipzig

Interessen und Fähigkeiten

Violine und Saxophon; Mitwirkung im Leipziger Universitätsorchester



Leipzig, 04.08.2021

8 Publikationen

Erstautorschaft:

1. Ebert A, Monod M, Salamin K, Burmester A, Uhrlaß S, Wiegand C, Hipler UC, Krüger C, Koch D, Wittig F, Verma SB, Singal A, Gupta S, Vasani R, Saraswat A, Madhu R, Panda S, Das A, Kura MM, Kumar A, Poojary S, Schirm S, Gräser Y, Paasch U, Nenoff P. *Alarming India-wide phenomenon of antifungal resistance in dermatophytes: A multicentre study*. *Mycoses* 2020;63(7):717-728. doi: 10.1111/myc.13091.

Co-Autorschaft:

1. Nenoff P, Verma SB, Ebert A, Süß A, Fischer E, Auerswald E, Dessoi S, Hofmann W, Schmidt S, Neubert K, Renner R, Sohl S, Hradetzky U, Krusche U, Wenzel HC, Staginnus A, Schaller J, Müller V, Tauer C, Gebhardt M, Schubert K, Almustafa Z, Stadler R, Fuchs A, Sitaru C, Retzlaff C, Overbeck C, Neumann T, Kerschnitzki A, Krause S, Schaller M, Walker B, Walther T, Köhler L, Albrecht M, Willing U, Monod M, Salamin K, Burmester A, Koch D, Krüger C, Uhrlaß S. *Spread of Terbinafine-Resistant Trichophyton mentagrophytes Type VIII (India) in Germany-“The Tip of the Iceberg?”*. *J Fungi (Basel)* 2020;6(4):E207. doi: 10.3390/jof6040207.
2. Uhrlaß S, Ebert A, Krüger C, Nenoff P. *Trichophyton species von Arthroderma benhamiae – ein neuer häufiger zoophiler Dermatophyt: Daten zur Prävalenz im mitteldeutschen Raum*. *Derm Prakt Dermatol* 2013;19(5):370-72.

9 Danksagung

Ich möchte mich bei allen Mitarbeitern des Mikrobiologischen Labors in Mölbis für die freundliche Unterstützung bei der Durchführung meiner Promotion bedanken. Insbesondere danke ich Herrn Prof. Dr. med. Pietro Nenoff, Betreuer meiner Arbeit und Leiter des Labors, für die enge und wertschätzende Zusammenarbeit, die Überlassung eines immens spannenden Promotionsthemas und das in mich gesetzte Vertrauen. Ich danke Frau Silke Uhrlaß für ihre intensive und geduldige Anleitung bei der Durchführung der Versuchsreihen sowie allen Co-Autoren der Publikation. Hier seien insbesondere Michel Monod und Shyam B. Verma genannt, die mir durchgehend mit ihrer langjährigen Expertise zur Seite standen.

Mein tiefer Dank gilt zudem meinen Eltern und meiner Lebenspartnerin Philine Wagner, die mir stets jegliche Form der Unterstützung – sei es finanziell, über Ideenaustausch oder stärkende Worte - gewährten.