

T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**DERMATOFİTLERİN ÇABUK TANISINDA (GACA)4, ITS1 VE
ITS2 BÖLGELERİNİ HEDEF ALAN PRİMERLERİN
ETKİNLİĞİNİN KARŞILAŞTIRILMASI**

Tuba YÜKSEL

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**TEZ DANIŞMANI
Prof.Dr. Macit İLKİT**

ADANA-2011

T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**DERMATOFİTLERİN ÇABUK TANISINDA (GACA)4, ITS1 VE
ITS2 BÖLGELERİNİ HEDEF ALAN PRİMERLERİN
ETKİNLİĞİNİN KARŞILAŞTIRILMASI**

Tuba YÜKSEL

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**TEZ DANIŞMANI
Prof.Dr. Macit İLKİT**

**Bu çalışma; Ç.Ü. Rektörlüğü Araştırma Fonu TF2009YL19
no'lu proje olarak desteklenmiştir.**

ADANA-2011

TEŞEKKÜR

Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans eğitimime başlama vesile olan ve desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. Fatih KÖKSAL hocam başta olmak üzere ve tez sürecimde yardımlarını, desteklerini ve engin bilgilerini esirgemeyen danışman hocam Sayın Prof. Dr. Macit İLKİT'e, bölümümüz kıymetli hocalarından Prof. Dr. Akgün YAMAN ve Prof. Dr. Fügen YARKIN'a; bilgilerinden her daim yararlandığım Gülhane Askeri Tıp Akademisinden değerli hocam Doç. Dr. Mehmet Ali SARAÇLI ve Yrd. Doç. Dr. Ramazan GÜMRAL'a; klinik örneklerin temininde desteklerini esirgemeyen Dermatoloji Anabilim Dalından hocam Sayın Prof. Dr. Mehmet KARAKAŞ'a; Anabilim Dalımız kıymetli doktorlarından Uzm Dr. Beril AKÇİMEN, Uzm. Dr. Aygül TURAÇ BİÇER, Uzm Dr. Esra POLAT, Arş. Gör. Tülin GÜVEN GÖKMEN ile Yüksek lisans öğrencisi Berkin ÖZTÜRKCAN'a ve Mümtaz GÜRAN'a, sıkıntılı ve içinden çıkamadığımız anlarda kurtarıcımız olan bölüm sekreterimiz Suna GÖKMEN'e ve teknisyenimiz Seher ÖKSÜZ'e; moleküler malzeme temini ve çalışmamızda desteklerini esirgemeyen Roche firmasının değerli elemanlarından Mehmet KURUL'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam boyunca yardım ve desteklerini gördüğüm Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı ailesi içerisindeki asistan, doktora ve yüksek lisans yapan arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Doğumumdan yaşamımın her anına kadar, her zaman yanımda olan beni hiç yalnız bırakmayan, desteklerini esirgemeyen biricik AİLEME ve Serkan YÜKSEL'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tuba YÜKSEL

İÇİNDEKİLER

KABUL ve ONAY	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
TABLolar DİZİNİ	viii
KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ÖZET	x
ABSTRACT	xi
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Tarihçe	3
2.2. Sınıflandırma	5
2.3. Etiyolojik faktörler	6
2.3.1. Anomorf şekil	6
2.3.1.1. <i>Epidermophyton</i> cinsi	6
2.3.1.2. <i>Microsporum</i> cinsi	6
2.3.1.3. <i>Trichophyton</i> cinsi	7
2.3.2. Teleomorf şekil	7
2.4. Epidemiyoloji	8
2.5. Ekoloji	9
2.5.1. Antropofilik türler	9
2.5.2. Geofilik türler	10
2.5.3. Zoofilik türler	10
2.6. Patogenez	11
2.7. Laboratuvar tanısı	12
2.7.1. Örnek alma	12
2.7.2. Doğrudan mikroskop incelemesi	12
2.7.3. Kalkoflor beyazı boyama yöntemi	13

2.7.4. Periyodik Asit-Schiff (PAS) boyama yöntemi	13
2.7.5. Kültür Yöntemi	13
2.7.6. Nadiren Makrokonidiyum Oluşturan Mikro-organizmalar ve Özellikleri	14
2.7.6.1. <i>Microsporum audouinii</i>	14
2.7.6.2. <i>Microsporum ferrugineum</i>	15
2.7.6.3. <i>Trichophyton concentricum</i>	15
2.7.6.4. <i>Trichophyton soudanense</i>	16
2.7.6.5. <i>Trichophyton schoenleinii</i>	16
2.7.6.6. <i>Trichophyton verrucosum</i>	17
2.7.6.7. <i>Trichophyton violaceum</i>	17
2.7.7. Makrokonidiyum Oluşturan Mikro-organizmalar ve Özellikleri	18
2.7.7.1. <i>Microsporum canis</i>	18
2.7.7.2. <i>Trichophyton mentagrophytes</i>	18
2.7.7.3. <i>Trichophyton raubitschekii</i>	19
2.7.7.4. <i>Trichophyton rubrum</i>	20
2.7.7.5. <i>Trichophyton tonsurans</i>	20
2.8. Moleküler yöntemler	22
2.8.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)	22
2.8.2. PCR'ın temel bileşenleri	22
2.8.3. PCR aşamaları	24
2.8.4. PCR çeşitleri	25
2.8.4.1. Yuvalanmış (Nested) PCR	25
2.8.4.2. Demirlenmiş (Anchored) PCR	25
2.8.4.3. Geri (Reverse) Transkripsiyon PCR'si (RT-PCR)	25
2.8.4.4. Asimetrik PCR	26
2.8.4.5. Ters (Invers) PCR (IPCR)	26
2.8.4.6. Çoklu (Multipleks) PCR	27
2.8.4.7. Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA (RAPD)	27
2.8.4.8. Real-Time PCR	27
2.8.4.8.1. Real-Time Kullanım Alanları	28
2.8.4.8.2. Real-Time'da Kesinlik ve Doğruluk	28

2.8.4.8.3. Real-Time analizi	29
2.8.4.8.4. Floresan Prob Sistemleri	29
2.8.4.8.5. DNA'ya bağlanan boyalar	29
2.8.4.8.6. Real-Time PCR temel fazları	31
2.8.4.8.7. Real-Time PCR avantajları	32
2.8.4.8.8. Real- Time PCR dezavantajları	32
3. GEREÇ ve YÖNTEM	33
3.1. Klasik (Geleneksel) yöntemler	33
3.1.1. Besiyerleri	33
3.1.1.1. Sabouraud Glikoz Agar	33
3.1.1.2. Patates Dekstroz Agar	34
3.1.2. Laktofenol pamuk mavisi	34
3.2. Moleküler Yöntem	35
3.2.1. DNA izolasyonu için kullanılan solüsyonlar	35
3.2.1.1. TEN buffer	35
3.2.1.2. % 10'kuk SDS solüsyonu	35
3.2.1.3. Fenol-Kloroform-İzoamil Alkol	35
3.2.1.4. % 70'lik Etil Alkol	35
3.2.1.5. 10 x TE	35
3.2.1.6. 10 x TBE	36
3.2.1.7. Yükleme tamponu	36
3.2.2. DNA izolasyon protokolü	36
3.2.3. PCR karışımı	37
3.2.4. PCR şartları	37
3.2.5. Çalışmada kullanılan primer dizisi	37
3.2.6. Real-Time PCR	37
4. BULGULAR	43
5. TARTIŞMA	50
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	54
7. KAYNAKLAR	56
8. ÖZGEÇMİŞ	60

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 1:	Epitel hücreler	11
Şekil 2:	Artrospor	11
Şekil 3:	PCR aşamaları	24
Şekil 4:	Taqmqn probe	30
Şekil 5:	Taqmqn probe'un hedef DNA'ya bağlanması	30
Şekil 6:	DNA polimeraz enziminin hedef DNA'ya bağlanması	31
Şekil 7:	ITS primerleri	37
Şekil 8:	<i>T. verrucosum</i>	47
Şekil 9:	<i>T. violaceum</i>	47
Şekil 10:	<i>T. schoenleinii</i>	47
Şekil 11:	<i>T. concentricum</i>	47
Şekil 12:	<i>T. tonsurans</i>	48
Şekil 13:	<i>T. mentagrophytes</i>	48
Şekil 14:	<i>M. canis</i>	48
Şekil 15:	<i>M. audouinii</i>	48
Şekil 16:	<i>M. ferrugineum</i>	49
Şekil 17:	Şekil 8-16 Real-time PCR ile referans ve klinik izolatların dağılımı	49

TABLO DİZİNİ

Tablo 1:	Sınıflandırma	5
Tablo 2:	Dermatofitlerin anamorf ve telemorf durumları	8
Tablo 3:	Dermatofitlerin konak tercihlerine göre dağılımları	10
Tablo 4:	ITS1, 5,8S ve ITS2 rDNA bölgeleri dizi analizine göre oluşturulan <i>Arthrodermataceae</i> ailesine ait ağaç	21
Tablo 5:	PCR ve Real-Time PCR karşılaştırılması	32
Tablo 6:	Real-Time PCR karışımı	38
Tablo 7:	Real-Time PCR şartları	39
Tablo 8a,b:	Çalışmada kullanılan standart kökenlere ait bilgiler	40-41
Tablo 9:	Real-Time PCR’da kullanılan primer ve probe dizileri	42
Tablo 10:	Çalışmada kullanılan klinik örneklerle ait bilgiler	44
Tablo 11:	Klinik örneklerden izole edilen <i>T. rubrum</i> suşlarının (GACA) ₄ ile dendrogramı	46

KISALTMALAR DİZİNİ

AFLP	: Amplified
CBS	: Centraalbureau voor Schimmelculturs
DMO	: Dimetil sülfoksit
DTM	: Dermatofit test mediumu
dNTP	: Deoksiribonükleozid trifosfat
ITS	: Internal transcribed spacer
KOH	: Potasyum hidroksit
MgCl ₂	: Magnezyum klorür
mtDNA	: Mitokondriyal DNA
PAS	: Periyodik asit-schiff
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
PDA	: Patates dekstroz agar
RAPD	: Rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA
RT-PCR	: Revers transkripsiyon PCR
SGA	: Sabouraud glikoz agar
TE	: Tris-EDTA
TBE	: Tris-borik asit-EDTA

ÖZET

Dermatofitlerin Çabuk Tanısında (Gaca)4, Its1 Ve Its2 Bölgelerini Hedef Alan Primerlerin Etkinliğinin Karşılaştırılması

Dermatofitozların patogenezinin ve klinik öneminin tam olarak anlaşılabilmesi için dermatofit grubu mantarların doğru identifikasyonu gereklidir. Rutin çalışmalarda, dermatofit grubu mantarların doğru sınıflandırılması ve tanısı kolay değildir. Uygun *in vitro* koşullar altında bol miktarda üretilen makrokonidiyum morfolojisi dermatofitlerin sınıflandırılmasında önemli bir kriterdir. Ancak, bazı dermatofit türleri, *M. audouinii*, *M. ferrugineum*, *T. concentricum*, *T. schoenleinii*, *T. soudanense*, *T. verrucosum*, *T. violaceum*, ve *T. yaoundei*, nadiren makrokonidiyum oluşturur ve identifikasyonları güçtür. Bu çalışmada, real-time PCR yönteminin dizaynı, optimizasyonu ve değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Testin performansı, nadiren makrokonidiya üreten ve yukarıda bahsedilen 8 türü temsil eden 26 standart köken ile laboratuvarımızda izole ve identifiye edilen, *M. canis* ($n = 4$), *T. mentagrophytes* ($n = 2$), *T. rubrum* ($n = 20$), *T. rubrum* morfotip "*raubitschekii*" ($n = 2$) ve *T. tonsurans* ($n = 1$)'in dahil olduğu 29 klinik izolat olmak üzere toplam 55 dermatofit suşu ile değerlendirilmiştir. Çalışmada real-time PCR 12 dermatofit türünü de doğru tanıdı. Sonuç olarak, real-time PCR yüksek özgüllük ve duyarlılığı ile dermatofit türlerinin, özellikle nadiren makrokonidiya oluşturan türlerin tanısını kolaylaştırdı ve çabuklaştırdığı görüldü. Bu yöntemin en önemli avantajı dermatofit grubu mantarların doğru ve güvenilir tanısına olanak sağlamasıdır.

Anahtar kelimeler: Dermatofit, tanı, makrokonidiya, real-time PCR

ABSTRACT

Comparison Of Efficiency Of (Gaca)₄ And Primers Targeting Its1-Its2 Regions In Rapid Identification Of Dermatophytes

It is essential to correctly identified the dermatophytic fungi in order to well-understand the pathogenicity and clinical significance of such tinea. In routine practice, reliable identification of dermatophytic fungi are notoriously difficult to classify and identify. The morphology of macroconidia, which are produced abundantly under suitable conditions, *in vitro*, has provided useful criteria for classifying dermatophytes. However, several dermatophytic fungi, e.g., *M. audouinii*, *M. ferrugineum*, *T. concentricum*, *T. schoenleinii*, *T. soudanense*, *T. verrucosum*, *T. violaceum*, and *T. yaoundei* are rarely produce macroconidia and cannot be easily identified. The objective of this study was to analyse the design, optimization, and evaluation of real-time PCR assay in the laboratory setting. The performance of the assay was evaluated with 55 dermatophyte isolates; 29 clinical strains from our laboratory including *M. canis* ($n = 4$), *T. mentagrophytes* ($n = 2$), *T. rubrum* ($n = 20$), *T. rubrum* with the "*raubitschekii*" morphotype ($n = 2$), and *T. tonsurans* ($n = 1$) as well 26 rare macroconidia producing reference strains including above mentioned eight species. Real-time PCR correctly identified the all 12 dermatophyte species. Finally, real-time PCR assay facilitated the identification of dermatophytic species with excellent sensitivity and specificity, particularly for rare macroconidia producing species. The advantage of the assay is to provide accurate and reliable diagnosis of dermatophytic fungi.

Key words: Dermatophyte, diagnosis, macroconidia, real-time PCR

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Dermatofitler, ana kaynağı toprak olan keratinofilik özel bir grup küf mantarıdır. İnsanda derinin stratum korneum katmanı, kıl ve tırnaklar gibi keratinli dokularda enfeksiyon oluştururlar. Dermatofitler, yalnızca stratum korneum'u kolonize ederler ve canlı dokuda enfeksiyona neden olmazlar. Ancak, etken mantar ve metabolik ürünleri konakta genellikle alerjik ve yangısal ekzematöz bir yanıt oluşturur. Konak yanıtının tipi ve şiddeti etken dermatofitin türüne, suşuna, virulansına ve bulunduğu bölgenin çevresel faktörlerine bağlıdır^{1,3,27}.

Dermatofitler, eşeysiz büyük sporlar olan makrokonidiyumlarının morfolojisine göre *Epidermophyton*, *Microsporum* ve *Trichophyton* olmak üzere üç cinse ayrılır. Tür düzeyinde identifikasyonları morfolojik özelliklerinden faydalandığı geleneksel yöntemler ile yapılmaktadır. Örneğin, koloninin makroskopik görünümü (yüzey ve taban rengi, yapısı ve (gelişme oranı), mikroskop görünümü (makrokonidiyalarının büyüklük ve şekli, mikrokonidiyaları, hif yapısı ve dallanma şekli), besin gereksinimleri (vitamin ve aminoasitler), sıcaklık toleransları, üreaz aktiviteleri ve *in vitro* kıl delme gibi özelliklerine göre tanınır^{1,2,3}.

Morfolojik ve fizyolojik özellikler sıklıkla değişkenlik göstermekte, özellikle fenotipik özellikler dış faktörlerden kolayca etkilenmektedir. Örneğin, sıcaklık değişimi, ortam farklılığı ve kemoterapi gibi durumlarda dermatofitlerin metabolik gelişimlerine engel olabilmekte ve *in vitro* kültür sonuçlarının yorumunu olumsuz etkileyebilmektedir. Ayrıca, geleneksel yöntemler koloninin gelişmesi ve belirgin morfolojik özelliklerinin uzun süreye gereksinim duyması, zaman bağımlı olması sebebiyle tür düzeyinde tanıyı zorlaştırmaktadır³. Fenotipik özellikler; genellikle suştan suşa değişebilir, mikro-organizma ayırt edici özelliklerini ya da spor oluşturma özelliğini yitirebilir. Bu gibi değişken faktörler göz önünde bulundurularak dermatofitlerin gerek cins, gerekse tür düzeyinde identifikasyon için daha güvenilir temellere dayalı yöntemlerin uygulanması gerekir⁷. Son yıllarda yapılan genotipik uygulamalar dermatofitlerin taksonomik problemlerinin çözümünde etkili olmuştur.

Moleküler biyolojik temelli teknikler, dermatofitlerin mikolojik tanısında çabuk, güvenilir ve tekrarlanabilir sonuçların alınmasını sağlamıştır. Günümüzde mitokondriyal DNA (mtDNA), 18S ve 28S ribozomal RNA'yı (rRNA) kodlayan gen bölgeleri, ITS1, ITS2 ve nontranscribed spacer (NTS) bölgelerinin keşilmiş bant uzunluğu farklılığı (RFLP); rastgele başlatıcılı PCR (AP-PCR, RAPD ya da DNA fingerprinting); çoğaltılan parça uzunluğu farklılığı (AFLP); yuvalanmış PCR (nested PCR); çoklu PCR (multiplex PCR); LightCycler PCR ve hibridizasyon gibi birçok moleküler yöntem dermatofitlerin identifikasyonunda kullanılmaktadır^{8,17}.

PCR temelli teknikler basit, tekrarlanabilir, hızlı ve birçok dermatofit türünün sahip olduğu özel nükleotid dizileri hakkında bilgi verebilmekte ve bu yönüyle morfolojik ve fenotipik karakterlerin değişkenliğinden kaynaklı problemleri çözebilmektedir⁸.

Mikoloji laboratuvarlarında genel olarak, dermatofitlerin tanısında makrokonidyum morfolosi klasik tanıda ilk sırayı alan önemli bir özelliktir. Ancak, *Trichophyton* spp. de genelde bazı türler makrokonidyum oluşturmaz. Aksine, *Microsporum* spp. varyetelerinde makrokonidyum şekli tür içi tanıda yardımcı olmaktadır. Diğer taraftan, *Epidermophyton floccosum*'un makrokonidyumları; ince duvarlı, 3 ile 5 arasında değişen hücreli ve çomak şeklindedir. Bazı dermatofit türleri, örneğin, *T. rubrum* morfotip '*raubitschekii*' bol miktarda makro ve mikrokonidyum oluşturur. Ancak, bazı türler nadiren makrokonidyum oluşturur; *M. audouinii*, *M. ferrugineum*, *T. concentricum*, *T. schoenleinii*, *T. soudanense*, *T. verrucosum*, *T. violaceum* ve *T. yaoundei*.

Bu çalışmada, klinik mikoloji laboratuvarlarında sık karşılaşılan dermatofit grubu mantarların identifikasyonunda yüksek ayırım gücü olan Real-Time PCR yönteminin; (i) optimizasyonu ve etkinliğinin sorgulanması, (ii) mikro-organizmalar arasındaki ayırım gücünün ortaya konulması ve (iii) makrokonidyum oluşturmeyen türlerin tanısında yerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

Dermatofitler, dünya genelinde bulaşıcı infeksiyonlara sebep olan keratinofilik küf mantarlarıdır. Çoğalabilmek için keratine ihtiyaç duyan bu mantarlar deri, saç ve tırnakta yüzeysel infeksiyonlara sebep olurlar, ancak mukozal yüzeylerde infeksiyona sebep olmazlar^{3,4,8}.

Dermatofit türü mantarlar stratum korneum tabakasına invaze olurlar çünkü bu tabakada mantarın gelişimi için bir çok uygun şartlar mevcuttur, diğer tabakalarda ise bu şartlar bulunmamaktadır. Şöyle ki;

1. Stratum korneum katmanı kan damarlarından yoksun bir tabakadır, kan damarlarından yoksun olmasına karşılık yüksek oranda özelleşmiş dokular içerir, ancak ölü hücrelerdir ve vücut savunma mekanizmalarına uzaktırlar.
2. Stratum korneum katmanı yüksek oranda su içerir ve su yönünden zengin bir tabakadır. Ter bezleri ve deri aracılığıyla su kaybeder. Vücut sıcaklığından daha düşük sıcaklığa sahiptir ve pH 5.5 ile 6.7 arasındadır ve aerop şartlara maruz kalır.
3. Dermatofitlerin gelişimi için ihtiyaç duydukları protein, amino asit, lipitler, karbonhidratları, çeşitli elementleri ve demir içerir.

Dermatofitlerin iki önemli özelliği; keratinofilik ve keratinolitik olmalarıdır, saprofit özellikleri ile *in vitro* keratinize dokuları parçalayıp kullanırlar. *In vivo* keratinize dokulara nüfuz ederek tinea'ya neden olurlar^{2,10}.

2.1. Tarihçe

Dermatofitler çok eski çağlardan beri bilinen mikro-organizmalardır. Bu mantarların deride veya saçta bir lezyon oluşturması ve bu lezyonun yuvarlak olmasından dolayı Yunanlılar hastalığı herpes olarak adlandırmışlar; bu adlandırma daha sonraları *Herpes tonsurans*, *Herpes circinatus* ve *Herpes desquamans* olarak değiştirilmiştir. Romalılar oluşan lezyonu böceklerle benzettiklerinden hastalığı, küçük böcek larvası anlamına gelen “tinea” olarak tanımlamışlardır. Bu tanımlama klinik terminolojide hala kullanılmakta olup “ringworm” kelimesi daha sonraları Yunan ve Latince terimleri anlamlarının birleştirilmesiyle ortaya çıkmıştır^{1,3,10}.

Robert Remark, 1834'de favuslu olguların mikroskopisinde mantar elemanlarını görmüştür. Kendi gözlemlerini yayımlamamış, ancak 1837'de Xavier Hube doktora tezinde Remark'ın çalışmalarından söz etmiştir. Prof. Johann Lucas Schöenlein, 1839'da favusun etkeninin mantar olduğunu bildirmiştir¹.

Remak 1842'de favus'lu bir hastadan aldığı kabuklu örnekleri kendi koluna sürterek etken mantarın bulaşıcı olduğunu göstermiş, 1845'de ise bu mantarı izole edip mikroskop özelliklerini tanımlamış ve *Achorion schoenleinii* olarak adlandırmıştır. Lebert mikro-organizmayı *Oidium schoenleinii* olarak bildirmiş, Malmsten, yine 1845'de *Trichophyton* cinsini diğer mantarlardan ayırarak *T. tonsurans*'ı tanımlamıştır. Remark ve Schöenlein'in bulgularından habersiz olan ve gerçekte tıbbi mikolojinin kurucusu sayılan Parisli fizikçi David Gruby; 1841'de favus etkenini önce besiyerinde izole etmiş, daha sonra deriye inoküle ederek hastalık oluşturduğunu göstermiştir. Yine Gruby, 1843'de *Microsporum audouinii*'nin kıldışı infeksiyonunu, 1844'de ise *Herpes (Trichophyton) tonsurans*'ın kılıçı infeksiyonunu tarif etmiştir^{1,3,10}.

Charles Robin, 1847'de insan ve hayvan mantar hastalıklarını tanımladığı ilk kitabını yayımlamış, yine aynı yıllarda Heinrich Anton de Bary küflerin fizyolojisini ve morfolojisini tanımlayan çalışmalar yapmıştır¹.

Ducloux ve Alman bilim adamı Gravith 1886'da *Trichopyton* sp. ve *Achorion schoenleinii*'nin saf kültürünü elde etmişler. Dermatofitlerin büyük bir çoğunluğu 19.yüzyılın sonlarına doğru tanımlanmıştır, ancak halen günümüzde standart bir sınıflandırma yoktur^{1,3,4}.

Tıbbi mikoloji alanında çalışmaları ile ünlü Raimond Sabouraud 1892'de ringworm ve dermatofitleri çalışmaya başlamış, yüzlerce kültürde test çalışmaları ile standardize test ortamı geliştirmiş, 1910'da 855 sayfalık ünlü eseri '*Les Teignes*'i yayımlamıştır. Çalışmalarında taksonomi, morfoloji, dermatofit kültür yöntemleri ve dermatofit infeksiyonlarının tedavilerinden bahsetmiş ve yaptığı dermatofit sınıflandırması *Achorion*, *Epidermophyton*, *Microsporum* ve *Trichopyton* olmak üzere dört cins içermiştir^{1,3}.

Chester W. Emmons, 1934'de dermatofitleri temelde makrokonidyumların yapısal özelliklerine ve mikrokonidiya bulup bulunmamasına göre sınıflandırmış ve *Achorion* cinsini çıkarmış, *Epidermophyton*, *Microsporum* ve *Trichophyton* olmak üzere üç cins tarif etmiştir^{1,3}.

L. Georg (1952), M. Silva ve Benham (1952), Benham (1953), Swartz ve Georg (1955), L. Ajello ve Georg (1957), Georg ve Camp (1957) dermatofitlerin besin gereksinimlerini ve fizyolojik özelliklerini belirlemişlerdir.

Gentles, 1958'de kobaylarda deney yolu ile oluşturulan *M. canis* infeksiyonunu griseofulvin ile tedavi etmiş ve dermatofitlerin özellikle de saçlı deri infeksiyonlarının tedavisinde köklü bir değişikliği başlatmıştır^{1,3,10}.

2.2. Sınıflandırma

Tablo 1. Sınıflandırma⁴⁶

Alem:	Mantar
Bölüm:	Ascomycota
Sınıf:	Eucomycetes
Takım:	Onygenales
Aile:	Arthrodermataceae
Cins:	<i>Epidermophyton</i> <i>Microsporum</i> <i>Trichophyton</i>
Tür:	<i>T. mentagrophytes</i> <i>T. rubrum</i>

Dermatofitlerin taksonomisi güç olup henüz kesinlik kazanmamıştır. Bu durum, klinik kökenlerin çoğunun eşeysiz şekiller olmasına karşılık, çoğu türün eşeyli şekillerinin de bulunmuş olmasına bağlanmıştır.

Dermatofitler, zoolojik olarak farklı aile, takım ve sınıflarda populasyon konaklarına sahip olan türler arasında farklılık gösteren, iki populasyon genetiği paterni gösterirler⁶.

2.3. Etiyolojik Faktörler

Dermatofitler üreme özelliklerine göre anamorf (eşeysiz) ve teleomorf (eşeyli) olmak üzere iki farklı şekilde bulunurlar. Anamorf şekilde eşeysiz ya da somatik üreme ve özgün bir morfoloji gözlenirken, teleomorf şekilde eşeyli üreme esastır^{3,10}.

2.3.1. Anamorf şekil

Dermatofitler üç anamorfik (eşeysiz) cinse ayrılır. Bunlar, Deuteromycota'nın Hyphomycota sınıfında, Onygenales takımından *Arthrodermataceae* ailesine ait *Epidermophyton*, *Microsporum* ve *Trichophyton* cinsleridir. Daha önceleri bu eşeysiz durum Fungi imperfecti ya da Deuteromycota'dan ayrı bir grup olarak bilinmekte idi, ancak moleküler çalışmalar ve mantarların sınıflandırmasıyla ilgili verilerdeki değişiklikler ile bu yapay taksonomide yer almıştır^{4,6}.

2.3.1.1. *Epidermophyton* cinsi (Sabouraud 1907)

Bu cinse ait çok sayıda çomak şeklinde ve düz duvarlı makrokonidyumları vardır, ancak mikrokonidyumları yoktur. Bu cins içerisinde insanda enfeksiyona sebep olan *E. floccosum* yer alır. *E. floccosum* antropofiliktir, saçsız deri ve tırnaklarda enfeksiyona sebep olur, saçlı deri enfeksiyonu ise ender olarak bildirilmiştir. Makrokonidyumları ortalama 10 gün içerisinde gelişir, hardal sarısı veya zeytin yeşili renkte kadifemsi koloniler oluştururlar^{2,10}.

2.3.1.2. *Microsporum* cinsi (Gruby 1843)

Bu cinse ait türler genellikle hem makrokonidyum hem de mikrokonidyum oluştururlar. Saçlı deri, saçsız deri ve tırnak enfeksiyonlarına neden olur. Bölmeli ve duvarları paralel hipleri vardır. Makrokonidyumları iğ ya da oval şekilde olup 1-15 bölmelidir. Makrokonidyumları, türlerine göre farklılık gösterirler. Örneğin, *M. canis* fiçi şeklinde, 1-15 hücreli ve bir ucu sivri iken; *M. gypseum* yuvarlak uçlu olup 6 veya daha az bölmelidir. *Microsporum audouinii*'nin çoğu zaman mikrokonidyumları yoktur, makrokonidyum ise nadir görülür. Ancak, uç klamidosporeler ile taraksı hiplere sıklıkla rastlanır ve bu özellikler tanı koydurucudur. PDA'daki koloni yapısı incelendiğinde *M. canis* limon sarısı, *M. gypseum* ise kahverengi pigment oluşturur^{2,5,10}.

2.3.1.3. *Trichopyhton* cinsi (Malmsten 1845)

Bu cins içerisinde bulunan türler düzgün duvarlı makrokonidyum ve mikrokonidyum oluştururlar. Makrokonidyumları kalem, çomak, lobut, iğsi ya da silindirik-iğsi gibi değişik şekillerde bulunur. İnce duvarlı (2 µm) düz ve 1-10 bölmelidir. Mikrokonidyumları ise küre ve armut şeklinde olup 2.5-4 µm çapındadır. Mikrokonidyumları *T. rubrum*'da gözyaşı damlası, *T. mentagrophytes*'de ise kısa, düzgün yüzeyli ve üzüm salkımı şeklindedir. PDA'daki koloni morfolojileri incelendiğinde *T. rubrum* yünümsü, beyaz renkli kolonilerin dip kısmında kırmızı pigment oluştururken, *T. mentagrophytes* pudramsı ve sarı-krem renkte koloniler oluşturur. Saçlı deri, saçsız deri ve tırnağı infekte eder^{1,2,5,7}.

2.3.2. Teleomorf (Eşeyli) şekil

Bazı dermatofitler, çoğunlukla zoofilik ve geofilik türlerden *Microsporum* ve *Trichophyton* eşeyli olarak çoğalabilmekte ve askospor (askus adı verilen kesemsi yapı içerisinde oluşan eşeysiz spor) ve asci ile askomata üretir. Ascomycota, ascospor olumsuz çevre şartlarına konidyalardan daha dirençlidirler. Bu türler Ascomycota bölümünde, Onygenales takımının Arthrodermataceae ailesinde teleomorfik *Arthroderma* cinsi içerisinde sınıflandırılırlar⁷.

Askomatal yapı çok değişkendir ve Arthrodermataceae ailesi içerisinde ilişkili diğer türlerle eşleşirler. Son filogenetik çalışmalarda, plesiomorphous karakterleri tutan ve eşeyli çoğalan dermatofitler arasında bir ilişki olduğu belirlenmiştir. Örneğin *T. mentagrophytes*; gibi üç büyük kümeye sahiptir. *A. benhamiae*, *A. vanbreuseghemii* ve *A. simii* kümeleri. Bu kümelerin morfolojileri ayırt edilemeyebilmekte ya da çok yakın özellikleri nedeni ile hem anamorf hem de teleomorf olarak eşleşebilmekte^{4,5,10}.

Tablo 2. Dermatofitlerin anamorf ve teleomorf özellikleri³

Teleomorf (eşeyli)	Anamorf (eşeysiz)
<i>Arthroderma</i> spp.	<i>Microsporum</i> ve <i>Trichophyton</i> spp.
<i>A. benhamiae</i>	<i>T. mentagrophytes</i>
<i>A. fulvum</i>	<i>M. fulvum</i>
<i>A. grubyi</i>	<i>M. vanbreuseghemii</i>
<i>A. gypseum</i>	<i>M. gypseum</i>
<i>A. incurvatum</i>	<i>M. gypseum</i>
<i>A. obtusum</i>	<i>M. nanum</i>
<i>A. otae</i>	<i>M. canis</i> var. <i>canis</i> , <i>M. canis</i> var. <i>distortum</i>
<i>A. persicolor</i>	<i>M. persicolor</i>
<i>A. simii</i>	<i>T. simii</i>
<i>A. racemosum</i>	<i>M. racemosum</i>
<i>A. vanbreuseghemii</i>	<i>T. mentagrophytes</i>

2.4. Epidemiyoloji

Dermatofitozların dağılımı ve bulaşma yolları büyük oranda enfeksiyonun kaynağına bağlıdır. Ekolojik olarak konak özgülüklerine ve doğal ortamlarına göre hayvan (zoofilik), insan (antropofilik) ve toprak (geofilik) kökenli olmak üzere üç gruba ayrılırlar³.

Dermatofitler çok bulaşıcıdır. Büyük çoğunluğu uygun çevre koşullarında varlığını sürdürebilmekte, geofilik türler keratin yapıları parçalayarak (saç, hayvan tüyleri ve boynuzumsu yapılar) toprakla birlikte geniş alana yayılmıştır. Antropofilik ve zoofilik türler öncelikli olarak insan ve hayvanları enfekte eder, sosyo-ekonomik koşullar, turizm ve göç benzeri hareketlilik ile endemilere sebep olurlar^{3,4}.

Bazı dermatofitozların yaş ile ilgisi vardır. *Tinea capitis* çocukluk çağı enfeksiyonu olup adölesan dönemden sonra ender görülür; bu durum, puberteden sonra deride doymuş yağ asitlerinin artmasına bağlanmıştır. *Tinea pedis* ise adölesanlar ve genç erişkinlerde sık görülür, çocuklarda nadiren görülür.

İhbarı zorunlu hastalıklar olmadığı için dermatofitozlar gerçek insidansı bilinmemektedir. Ancak toplumun yaklaşık %20'sinde kronik dermatofitoz bulunduğu, erişkin erkeklerin yaklaşık %90'ında en az bir kez dermatofitoza yakalandıkları tahmin edilmektedir. Erkeklerde, kadınlara göre daha sıktır, bunun sebebi erkeklerin kışla, yatılı okul gibi toplu yaşanan ortamlarda ve spor salonlarında daha sık bulunmalarına bağlıdır. Zoofilik ve geofilik dermatofitler genellikle yoğun

inflamasyondur, ancak kendiliğinden iyileşmeye eğilimlidir ve tedaviye duyarlıdır, ancak antropofilik dermatofitlerde inflamasyon daha hafiftir, kronikleşme görülür ve tedaviye direnç gösterirler. Halk sağlığı ve bulaşın kontrol altına alınabilmesi için epidemiyolojik veriler önemlidir^{2,4}.

2. 5. Ekoloji

Dermatofitler, doğada uygun ekolojik şartlara göre antropofilik, geofilik ve zoofilik olmak üzere üç temel gruba ayrılırlar. Patojenite, konak tercihleri ve popülasyonları için bu sınıflandırma esastır⁴.

2.5.1. Antropofilik türler

Antropofilik dermatoflerin genellikle zoofilik türlerden köken aldığı ileri sürülmüştür. Ancak, son dönemlerde yapılan moleküler çalışmalarda antropofilik *E. floccosum*, geofilik *M. gypseum* kompleks içerisinde çıkarılmıştır. Antropofilik türlerin doğru konağı insandır ve bulaş doğrudan temas veya dolaylı olarak ortak kullanılan eşyalar ile (saç fırçası, havlu, çarşaf, terlik, ayakkabı ve çorap) bulaşır, ancak antropofilik dermatofit türleri insanla sınırlı olsa da, literatür de nadir de olsa hayvanlarda da enfeksiyona sebep olduğu gösterilmiştir. Antropofilik türler daha çok kasık ve ayak gibi vücudun kapalı bölgelerinde görülür, türlere göre değişmek üzere, baş saçlı derisi (*Tinea capitis*), saçsız deri (*Tinea glabrosa*) ve tırnak enfeksiyonlarına (*Tinea unguium*) neden olurlar. En sık bulaş etkeni *T. rubrum* olup onu *T. interdigitale* izler. Antropofilik türlere ilişkin *tinea capitis* belirli bölgelerde endemiktir. Bu durum, çocukların erişkinlere oranla daha az seyahat etmelerine bağlıdır örneğin; *T. soudanense*, *T. yaoundei* ve *T. gourvilii*, Batı Afrika'nın belirli bölgelerinde. *T. tonsurans*, İngiltere, Amerika Birleşik Devletleri ve Meksika'da belirli bölgelerinde; *T. violaceum* ise Hindistan, Doğu Afrika ve Orta Doğu'nun belirli bölgelerinde en sık görülen *tinea capitis* etkenleridir. Türkiye'de *T. violaceum* Akdeniz bölgesinde en baskın tür iken, Ege Bölgesinde *M. canis*'ten sonra ikinci sırada yer almıştır^{2,4,8,10}.

2.5.2. Geofilik türler

Patojen dermatofitlerin atasal türleri olduğu düşünülmüştür. Bu türlerin doğal ortamları toprak olup toprakta bulunan keratini ayrıştırırlar (saç, tırnak ve kıl). İnsanlar

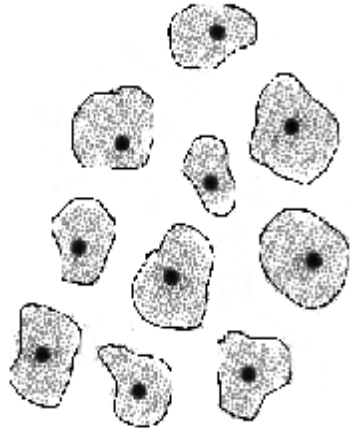
için enfeksiyonun ana kaynağı toprağa maruz kalmalarıdır. Geofilik türlerde insandan insana ya da insan'dan hayvana geçiş çok azdır. Geofilik dermatofitlere en iyi örnek, *M. gypseum*'dur. İki sıradışı salgın *M. gypseum* rapor edilmiş, ilk salgını salatalık sera bahçesinde çalışanın toprak teması ile ortaya çıkmıştır^{2,5}.

2.5.3. Zoofilik türler:

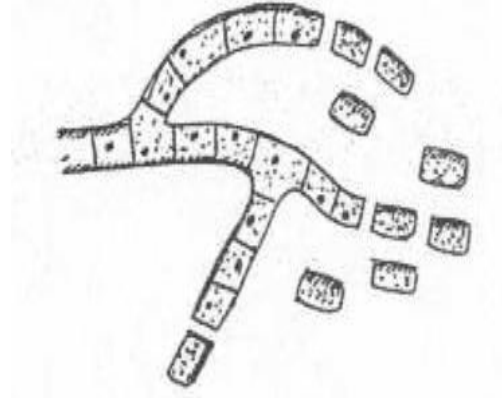
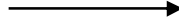
Enfekte hayvan ile doğrudan veya enfekte kıllar ile kontamine eşya ile dolaylı ilişki sonucu insana bulaşır ve baş, yüz, el ve kol gibi vücudun açık yerlerinde enfeksiyon oluştururlar. Zoofilik türlerde konak dağılımı etkene göre değişir. Örneğin, *T. mentagrophytes* geniş konak dağılımı gösterip kemiriciler, kedi, köpek ve atları enfekte eder; ancak *M. nanum* yalnız domuzları enfekte eder^{2,3}.

Tablo 3. Dermatofitlerin konak tercihlerine göre dağılımları³

Antropofilik	Zoofilik	Geofilik
<i>E. floccosum</i>	<i>M. canis</i>	<i>E. stockdaleae</i>
<i>M. audouinii</i>	<i>M. equinum</i>	<i>M. amazonicum</i>
<i>T. concentricum</i>	<i>M. gallinae</i>	<i>M. boullardii</i>
<i>T. gourvilii</i>	<i>M. persicolor</i>	<i>M. cookei</i>
<i>T. kanei</i>	<i>T. equinum</i>	<i>M. gypseum</i>
<i>T. megninii</i>	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>M. nanum</i>
<i>T. mentagrophytes</i>	<i>T. sarkisovii</i>	<i>M. praecox</i>
<i>T. raubitschekii</i>	<i>T. simii</i>	<i>M. racemosum</i>
<i>T. rubrum</i>	<i>T. verrucosum</i>	<i>M. ripariae</i>
<i>T. schoenleinii</i>		<i>M. vanbreuseghemii</i>
<i>T. soudanense</i>		<i>T. ajelloi</i>
<i>T. tonsurans</i>		<i>T. flavescens</i>
<i>T. tonsurans</i>		<i>T. gloriae, T. longifusum</i>
<i>T. violaceum</i>		<i>T. phaseoliforme</i>
<i>T. yaoundei</i>		<i>T. terrestre</i>
		<i>T. vanbreuseghemii</i>



Şekil 1: Epitel hücreler⁴⁵



Şekil 2: Artrospor⁴⁵

2.6. Patogenez

Dermatofit infeksiyonlarının ilk döneminde mikro-organizmaların ekolojik özelliklerine bakılmaksızın benzerlik görülür. Saçlı deride keratinize bölgelerde kolonizasyonun başlaması, saçsız deride de tipik ringworm görünümü dikkati çeker. İnfekte kişilerin çevreye epitel döküntüleri ve kıl ile yaydığı artrosporlar bulaştıran sorumludur. Artrosporlar dış ortam şartlarına dayanıklıdır ve aylarca canlılığını sürdürebilir. Artrosporlar yeni konakta önce keratinositlere tutunur daha sonra germinasyon gösterip enfeksiyonu başlatır^{4,10}.

Dermatofitlere duyarlılık konaktan konağa değişmektedir. Bu durum, aynı cins ve tür dermatofitin farklı suşlarının farklı virülans göstermeleri ile açıklanır. Dermatofitlerde yangısal yanıt 9-16. günde en üst düzeye ulaşır ve bu süreden sonra lezyonlar iyileşmeye başlar. Antropofilik türler, stratum corneum, kıl ve tırnak keratini içinde kalıp ağır dermo-epidermal yangısal reaksiyonlara neden olmazlar ve genelde alerjik reaksiyonlar veya bağışıklık gelişmez. Geofilik ve zoofilik türlerde ise insana uyumları daha sınırlı ve az olduğu için, metabolik ürünlerinin derinin alt katmanlarına inmesi ile alerjiye sebep olurlar, ancak enfeksiyonları kendiliğinden iyileşmeye eğimli oldukları gibi re-enfeksiyona karşı direnç sağlarlar⁴.

2.7. Laboratuvar Tanı

2.7.1. Örnek Alma

Klinik örneğin alınacağı anatomik bölgenin durumuna göre uygun asepsi uygulanır ve tanı testleri için yeteri miktarda örnek alınır. Örneğin alınacağı bölge %70'lik alkol ile temizlenerek floradaki yabancı mikro-organizmalar ve eğer uygulanmışsa pudra ve krem gibi maddeler ortamdaki uzaklaştırılır, lezyonun durumuna göre steril 15'lik bistüri ve saç örnekleri için cımbız, saç fırçası ve diş fırçası ile örnek alınır^{4,6,59}.

1. **Saçlı deri:** Tinea capitis ve Tinea barbae'de kıl köklerinden steril cımbız ile örnekler alınır; özellikle saçta rengini kaybetmiş ve kırılmış saç kökleri tercih edilir, ancak saç kırılma değilse ve klinik örnek alımı güç ise, saç derisinden kazıntı ya da saç kökünden küçük parçalar kullanılabilir. Tinea capitis'de saç fırçası ile lezyonun bulunduğu bölgede karşılıklı hareketle ölü hücreler ve saç telleri başarılı bir şekilde toplanır. *Microsporum* spp. ve *T. schoenleinii* infeksiyonlarında Wood ışığı kullanılarak tanıya yardımcı olabilir⁴.
2. **Saçsız deri:** Lezyonun bulunduğu bölge %70'lik alkol ile temizlenir, lezyonun keskin sınırlı olan kenarları kazınır, kazıntı örnekleri steril petri veya steril kağıtlar içerisine alınır. Eğer lezyonda vezikül veya bül varsa tepeleri kesilerek örnekleme yapılır. Cerahatli lezyonlarda eküvyon kullanılarak klinik örnek alınır^{4,6}.
3. **Tırnak:** Tinea unguium'un en sık görülen distal-subungual tipinde lezyonlu bölge alkol ile temizlendikten sonra tırnak yatağından alt kısımdan canlı yere yakın yere kadar kazıntı örneği steril kağıt veya petri içerisine alınır. Proksimal subungual lezyonda tırnak makası veya küret ile epitel kazıntı alınır⁴.

2.7.2. Doğrudan mikroskop incelemesi

Mantar enfeksiyonlarının belirlenmesinde uygun klinik örneklerin direkt mikroskobisi ile incelenmesi hızlı ve etkili bir yöntemdir. Bu yöntem infeksiyonun varlığı/yokluğu hakkında bilgi verir. Her klinik örnek önce mikroskopta incelenmelidir. Ancak, yalnızca mikroskop incelemesi gerek infeksiyon gerekse tür düzeyinde tanı için yeterli değildir. Klinik örnek üzerine birkaç damla %10'luk potasyum hidroksit (KOH)

damlatılıp üzerine lamel kapatıp preparatı çok hafif ısıtıp mantar elemanlarını açığa çıkartılır ve incelenir. %10'luk KOH'de bazı eklemeler yapılarakta hızlı tanımlama yapılabilir. Sık kullanılan bir yöntem %25'lik potasyum hidroksit veya sodyum hidroksite kurumayı önleyici %5 gliserin eklenmesidir, diğer bir yöntem %20'lik potasyum hidroksite %36'luk dimetil sülfoksit (DMSO) eklenerek ısıtmaya gerek kalmadan preparatı incelemektir. KOH kullanışlı ve maliyeti düşük bir bileşiktir^{2,4,59}.

2.7.3. Kalkoflor beyazı boyama yöntemi

Kalkoflor beyazı kağıt ve tekstil endüstrisinde beyazlaştırıcı olarak kullanılan boyadır. Boya mantar hücre duvarındaki kitin ve selüloza bağlanarak uzun dalga boylu ultraviyole ve kısa dalga boylu görünür ışıkta floresans verir. Birçok laboratuvar için ultraviyole ile uyumlu filtre gereksiniminden dolayı direkt mikroskoba göre daha pahalı yöntemdir. Kalkoflor beyazı KOH ile birlikte kullanılabilir ve örneğin hızlı bir şekilde temizlenmesine yardımcı olur. Kullanılan filtreye göre hif yapıları mat beyaz ve yeşil renkte floresans verir².

2.7.4. Periyodik Asit-Schiff (PAS) boyama yöntemi

PAS mantar hücre duvarındaki polisakkaritleri boyar, mantar elemanları kırmızı-mor boyanır. Onikomikoz kuşkusunda tırnak örneklerinin histopatolojik incelemeleri için önerilen bir yöntemdir^{2,3}.

2.7.5. Kültür Yöntemi

Kültür, direkt mikroskopik incelemeyi tamamlayıcı olarak ihtiyaç duyulan yöntemdir. Etkenin kesin tanısında gerekli ve yararlıdır. İnvaziv küf mantarı infeksiyonlarında ve özellikle deri ve tırnak infeksiyonlarına sebep olan dermatofit dışı küf mantarlarının (*Aspergillus*, *Scopulariopsis* vb.) tanısında önemlidir^{4,6,10}.

Dermatofitlerin ilk izolasyonların da bakteri ve saprofit küflere karşı seçici besiyerleri kullanılabilir. En sık iki besiyeri tercih edilmektedir. (a) Kloramfenikol ve sikloheksimit içeren Sabouraud glikoz agar (SGA) ve (b) dermatofit test mediumu (DTM) dur. Her iki besiyeride ticari olarak hazır bulunur, içerdikleri sikloheksimit saprofit kontaminasyonuna neden olan küflerin baskılanması için, kloramfenikol ve gentamisin ise bakteri kontaminasyonuna karşı kullanılır. DTM besiyerinde fenol

kırmızısı ayıraç görevi yapar ve dermatofit üremesi sırasında ortam alkalileşir ve sarı olan besiyeri rengi kırmızıya döner. Dermatofit dışı küf mantarlarının direkt mikroskop incelemelerinde mantar elemanları dermatofit elemanlarına benzerlik gösterir, bu sebeple dolayı kültürde bu türlerin izolasyonunda genellikle sikloheksimitsiz besiyerlerine çok ihtiyaç duyulmaz⁵⁹.

Dermatofitler genel olarak yavaş üreyen mikro-organizmalardır, 1-4 hafta arasında üreme gösterirler. İdeal üreme ısısı 25 °C'dir, ancak bazı türlerin sıcaklık gereksinimleri değişkendir. Örneğin; *T. verrucosum* ve *T. tonsurans*'ın bazı türleri 37 °C'de daha iyi ürer¹⁰.

Bir çok mantarın identifikasyonun da genel olarak kullanılan, gözleme dayalı üç durum değerlendirilir.

1. Koloni görüntüsü; koloninin rengi (beyaz, sarı ve mor), yoğunluk (pamuğumsu ve kabarık), yüzey özelliği (düz, kıvrımlı ve buruşuk)
2. Taban rengi; spesifik besiyerlerinde pigment oluşumu
3. Mikroskop morfolojisi; makro-mikrokonidyum görüntüsü, şekli, büyüklüğü, miktarı ve hif yapısı.

Kültür ile birlikte kesin tanı için laktofenol pamuk mavisinde konidyum varlığı da önemlidir. Diğer yöntemlerde tür ayırımında yararlı olabilir örneğin; *iv vitro* kıl delme deneyi *T. mentagrophytes* (+) ile *T. rubrum* (-); *M. canis* (+) ile *M. equinum* (-) ayırımında kullanılmaktadır^{2,10}.

2.7.6. Nadiren Makrokonidyum Oluşturan Mikro-organizmalar ve Özellikleri

2.7.6.1. *Microsporum audouinii* Gruby 1843

Tinea capitis ve tinea corporis salgınlarına sebep olan mantardır. Salgınlar Kuzey Amerika ve Avrupa'da rapor edilmiştir. Saçta kıldışı bulaş nedenidir. Wood ışığında parlak floresans verirler

1. **Koloni görüntüsü:** SGA besiyerinde yavaş ürerler, ortalama 7-10 gün sürer, kolonileri düz, yayılan, ışınal, koloni rengi; beyaz, gri, devetüyü rengi nadiren pas rengi ya da kahverengimsidir. Koloni tabanı, somon-şeftali rengine görülür³⁸.

2. **Mikroskopik görünüm:** Genellikle birkaç konidiya görülür. Bölmeli hif ve hif uçlarında klamidospore varlığı *M. audouinii* için özgün bir bulgudur. Makrokonidiyum görülmez^{1,2,4}.

2.7.6.2. *Microsporum ferrugineum* Ota 1921

Çocuklarda tinea capitis salgınlara sebep olurlar. Asya ülkeleri, Japonya, Rusya, Doğu Avrupa, Balkanlar ve Afrika'da bulaş sebebidir. Saçta kıl dışı bulaş yapar. Wood ışığında flöresans vermez.

1. **Koloni görüntüsü:** Yavaş oluşan ve hızlı oluşan-yayılan olmak üzere iki farklı koloni oluştururlar. Yavaş oluşan koloni; kabarık, yüzeyi engebeli ve kırmızımsı-sarı renkte tonlara sahiptir. Uzak Doğu ülkelerinde en sık görülen biçimdir. Hızlı oluşan ve yayılan koloni; yassıdır özellikle Balkanlar'da sık görülür.
2. **Mikroskopik görünüm:** Düzgün olmayan konidiyasız miçeller görülür. Hifler dallanmış, uçları lobutumsu biçim almıştır. Bazen tipe özgü kaba, uzun, düz ve belirgin bölmeli hifler görülür; bunlara bambu hif denir. Makrokonidiyum görülmez^{1,10}.

2.7.6.3. *Trichophyton concentricum* Blanchard 1896

İnsan kökenli bir mantardır ve tinea imbricata veya 'tokelau' adı verilen özel bir tinea corporis etkenidir. Çok kaşıntılıdır ve pullanmaya sebep olur, kıl bulaşı görülmez ve hayvanlarda infeksiyona sebep olmaz. Güney Pasifik Adalarında salgınlara neden olur, ayrıca Güney Asya, Guetemala, Meksika ve Brezilya'da görülür. Üremeleri yavaştır koloniler 16-18 günde ürer. Suşların yaklaşık yarısı tiyaminli besiyerinde daha iyi ürer.

1. **Koloni görüntüsü:** Tallus yukarı doğru gelişir, koloni diplerden katlanmış ve kıvrılmıştır yüzeyi çıplaktır, kremi görülür, beyaz, bej, kahverengimsi zamanla mercan kırmızısı renge döner. Hava miçelleri kadifemsi ya da bulanık gelişir, koloniler yavaş ürer 10 gün sonra çapı 5-20 mm olur, koloni morfolojisi *T. schoenleinii*'ye benzer.
2. **Mikroskopik görünüm:** Kıvrık, biçimsiz, konidiyasız hifleri vardır. Geyik boynuzu gibi dallanmış miçelleri ile *T. schoenleinii*'yi andırır².

2.7.6.4. *Trichophyton soudanense* Joyeux 1912

Afrika ve özellikle Batı Afrika'da endemik endotriks türler bulunur. Sıklıkla Avrupa, Brezilya ve Amerika'da kayıt altına alınan olgular mevcuttur. *Tinea capitis* ve *tinea corporis* sebepleri olabilir. Kıl içi bulaş yapan mantardır. Hayvanlarda enfeksiyona sebep olmaz.

- 1. Koloni görünümü:** Yavaş üreyen kolonileri 14-18 günde olgunlaşır. Kolonilerin düz ve tüysü görünümü vardır. Sarı-kayısı rengi kolonileri oluşur, çevresinde besiyeri içerisine uzanan hiflerin yaptığı ışınal yapılar oluşur. Löwenstein-Jensen besiyerinde koyu renkli koloniler oluşturur ve *M. ferrugineum*'un açık sarı kolonileri ile kıyaslanabilir.
- 2. Mikroskopik görünüm:** Hifleri bölmelere ve artrosporlara ayrılmıştır, karşı yönde büyüme veya dik açı yapacak şekilde dallanma gösterir. Miçellerin yan tarafında armut şeklinde mikrokonidyumlar görülebilir^{2,4,10}.

2.7.6.5. *Trichophyton schoenleinii* (Lebert) Langeron et Milochevitch 1930

İnsan kaynaklı olup kellik (favus) etkenidir. Kellik saçlı deriyi tutar, skutulom oluşumu, kabuklanma ve saçın döküldüğü yerde ömür boyu saç çıkmaz. Kılıcı bulaşa sebep olur, kıl içerisinde hifler ve ayrıca bu mantara özgü olarak yapılarını yitirmiş, bozulmuş hiflerin bulunduğu hava boşlukları görülür. Artrospor ya hiç görülmez veya azdır. Wood ışığında mavimsi beyaz bir flöresans verir. Kolonileri yavaş ürer 15 günde olgunlaşır. Mantar saçsız deri ve tırnakta da bulaş tutulum yapar. Asya ve Avrupa'da endemiktir, ancak Batı Bölgelerinde sporadiktir. Endemik olduğu odaklar Kentucky, Guatemala, São Paulo'dur. Nadiren hayvanlarda enfeksiyona sebep olur; kedi, köpek, kirpi, inek, at, tavşan ve kobaylarda enfeksiyon rapor edilmiştir^{1,2}.

- 1. Koloni görüntüsü:** Yavaş üreyen koloniler mumsu, çıplak, hafif kıvrımlar yapan kolonileri vardır, besiyeri içerisine doğru üreme gösterirler, biçimsiz ve sarmal görülür. Zamanla eski kültür kolonileri düz ve tüysü yapı alır. Bazı izolatlar başlangıçta mayalara benzer ve 37 °C'de daha iyi gelişirler. Koloni tabanı ya renksizdir ya da sarımsı bej rengine yakın bir tonda olur. Üremek için tiyamine ihtiyaç duymazlar².

2. **Mikroskobik görünüm:** Konidiyum görülmez, hifler bölmeli, çok düzensiz, girintili çıkıntılıdır. Özellikle besiyeri içerisine uzanan hifler geyik boynuzunu andırır ve 'favus şamdani' adı verilen şişkinlikler görülür^{2,4,10}.

2.7.6.6. *Trichophyton verrucosum* Bodin 1902

Dünya genelinde sığırlardan yayılan bir mikro-organizmadır. Sığırlarda da epidemilere sebep olan hastalıktır ve 'ahır kaşıntısı' olarak adlandırılmıştır. İnsana bulaşı sığırlardan veya nesneden geçer, çok yangılı, tek veya yayılmaya eğimli lezyonlar oluşturur. Büyük ektotriks konidiyumları bulunur, bulaşlar daha çok saçlı deri ve sakal bölgesinde olmakta, bulaşlı insan kılı floresans vermez, ancak bulaşlı sığır kılı flöresans verebilir. Yavaş üreyen kolonileri 14-21 gün'de olgunlaşır. En iyi 37 °C'de ürerler, tiyamin ve inositol eklenmiş kanlı besiyerinde yaygın, kısa tüylü ve yassı koloniler oluştururlar.

1. **Koloni görünümü:** *T. verrucosum* var. *album*; en sık görülen koloni biçimidir. Koloni beyaz rekte, çıplak kabarık ve düğmeye benzer ve yavaş gelişir. *T. verrucocum* var. *ochraceum*; yassı, çıplak ve sarı renkte koloniler oluşturur. *T. verrucosum* var. *discooides*; yassı, çok kısa tüylü ve grimsi beyaz koloniler oluşturur.
2. **Mikroskobik görünüm:** Zincir şeklinde dizilmiş klamidosporlar ve az sayıda geyik boynuzu biçiminde sonlanan hifler görünür. Tiyamin zenginleştirilmiş besiyerlerinde çok sayıda hif boyunca dizilmiş gözyaşı damlası biçiminde mikrokonidiyumlar; klamidospor dizileri ve bazen uzun, ince, düzensiz makrokonidiyum oluştururlar^{1,2,4,7}.

2.7.6.7. *Trichophyton violaceum* Sabouraud apud Bodin 1902

Güney Amerika, Meksika, Avrupa ve Asya'da endemik olan insan kökenli mikro-organizmadır. Saçlı deride kelliğe benzer kabuklanma yapar, yaşam boyunca saç kaybına neden olan lezyonlar oluşturur. Endotriks enfeksiyon yapar, kıl içerisini dolduran spor zincirleri görülür, sporların baskısı ile kıl parçalanır ve kıvrılır; saçta kara noktalar oluşur. Wood ışığında flöresans vermez, nadiren hayvanları infekte eder. Buzdolabı ısısında kısa sürede ölürler.

- 1. Koloni görünümü:** Yavaş üreyen koloniler 14-21 günde olgunlaşır. Mumsu, kabarık, yüzeyi girintili çıkıntılı ve koyu mor koloni oluştururlar. Eski stok kültürlerde koloniler daha düz, beyaz ve tüysü olabilir. Koloni tabanı morumsu renktedir.
- 2. Mikroskopik görünüm:** Dallanmış, düzensiz, konidiyasız hifler ve klamidosporlar görülür. Tiyamin ile zenginleştirilmiş besiyerin de birkaç mikrokonidiyum ve nadiren *T. rubrum*'da olduğu gibi makrokonidiyum görülür^{2,10}.

2.7.7. Makrokonidiyum Oluşturan Mikro-organizmalar ve Özellikleri

2.7.7.1. *Microsporum canis* Bodin 1902

Dünya'da yaygın görülen, tinea capitis ve tinea corporis etkeni mantardır. Kedi ve köpeklerde mantar bulaşı yapar; enfekte olan hayvanlarla temas sonrası insana bulaşır. Saçta kıl dışı bulaş yapar, kılın çevresini saran çok sayıda hifin bölünmesi ile küçük sporlar oluşur Wood ışığında parlak flöresans verirler. Kolonileri orta hızda, ortalama 6-10 günde gelişir.

- 1. Koloni görünümü:** Hızlı gelişen kolonileri pamuğumsu ya da yünsü bir görünüm alırlar, beyazdan sarıya değişen ışınal kolonileri oluşur, pigmentasyon en iyi patates Dekstroz Agarda (PDA) gözlenir, koloni tabanı daha koyu sarı renkte görülür.
- 2. Mikroskopik görünüm:** Büyük ve yoğun makrokonidiyum oluşturur (8x20 µm, 40x150 µm), kalın duvarlı ve çok bölmeli (15'den fazla), kenarları pürtüklü, girintili çıkıntılı ve iğ şeklinde makrokonidiyumları vardır. İnce armut şeklinde mikrokonidiyumları vardır, ancak tanıya katkısı yoktur^{10,14}.

2.7.7.2. *Trichophyton mentagrophytes* (Robin) Blanchard 1896

Hem insan hem de hayvanlarda bulaş yapan *T. mentagrophytes* kompleks içerisinde dört büyük filogenetik tür yer alır. Bunlar, *T. mentagrophytes sensu stricto*, *T. erinacei*, *A. benhamiae* ve *T. interdigitale*'dir. Konak ilişkisi, konidiyumu, morfolojisi ve koloni rengi ile uzun bir binomial sınıflandırma da yer alır. İnsanda saçsız deri, saçlı deri ve tırnak bulaşlarına neden olur, yangılı ve kolay iyileşirler. Hayvan kaynaklı

suşlar^{10,13} özellikle fare, tavşan ve kobay gibi deney hayvanlarında ve atlarda salgınlara sebep olabilir. Hayvan kaynaklı suşları kıldı, orta sayıda sporlar ile kıl dışı bulaş yapar; insan kaynaklı olanlar kıldı bulaş yapmaz.

- 1. Koloni görünümü:** Değişken bir pigmentasyon gösterirler bunlar, sarı-kahverengi, kırmızımsı-kahve ve *T. rubrum*'a benzer şarap kırmızısı renklerinde görülürler. Hayvan kaynaklı suşlar yassı, krem veya sarımsı renkte, pudramsı görülür ve koloni tabanı açık renktedir be-kahverengij renge dönüşür. İnsan kaynaklı suşlar ise tüysü ve krem renge dönüşür. PDA'da yıldız şeklinde pudramsı görülür. Üreme süreleri ortalama 7-10 gündür. *T. erinacei* (-) dışındaki tüm türlerde üreaz olumludur.
- 2. Mikroskopik görünüm:** Hayvan kaynaklı suşlarda konidyum sayısı, insan kaynaklı suşlara oranla daha fazla ve çeşitlidir. Üzüm salkımı şeklinde dizilen küçük mikrokonidyumlar bu türe özeldir. Makrokonidyumlar daha çok hayvan kökenli suşlarda görülür ve lobut-püro şeklinde görülür. Sarmal ve düğüm şeklinde görülen hifleri vardır¹³.

2.7.7.3. *Trichophyton raubitschekii*

Dr. Julius Kane ve ark. 1981'de antropofilik bu türü insan saçsız deri lezyonlarından izole etmişlerdir. *T. rubrum* kompleksi içerisinde yer alır ve genetiksel olarak ayırımları yapılamamaktadır. Güney Avrupa kökenli olduğu düşünülmektedir.

- 1. Koloni görünümü:** Granüler ve kadifemsi yüzeyi vardır, koyu kırmızı ve kahverengimsi koloniler oluşturur. Üreaz aktiviteleri 3 gün sonunda kuvvetli pozitifdir. %3-9 oranlarında değişen NaCl ilaveli SGA besiyerinde gelişimleri sınırlıdır ve konidyum oluşturmazlar.
- 2. Mikroskopik görünümü:** Primer kültürlerinde yoğun makro ve mikrokonidyum oluştururlar, sonraki kültürlerde makrokonidyum miktarları azalır. Silindirik-püro şeklinde 4.8-6.3 µm eninde, 46-51µm uzunluğunda makrokonidyumları, değişen şekil ve boyutlarda mikrokonidyumları vardır^{1,12,14}.

2.7.7.4. *Trichophyton rubrum* (Castellani) Sabouraud 1911

Dünya'da yaygın olarak görülen insan kaynaklı (antropofilik) dermatofittir. Özellikle saçsız deri ve tırnakta bulaş yapar. Tinea pedis, tinea corporis, tinea manuum

ve tinea unguium olgularında sıklıkla karşılaşılır. Bazen genç bayanların bacaklarında granülomlu yangı (Majocchi granülomu) yapar. Suşa göre değişmekle birlikte orta hızda (7 günde gelişen) veya yavaş üreyen (14 günde olgunlaşan) suşlarda vardır.

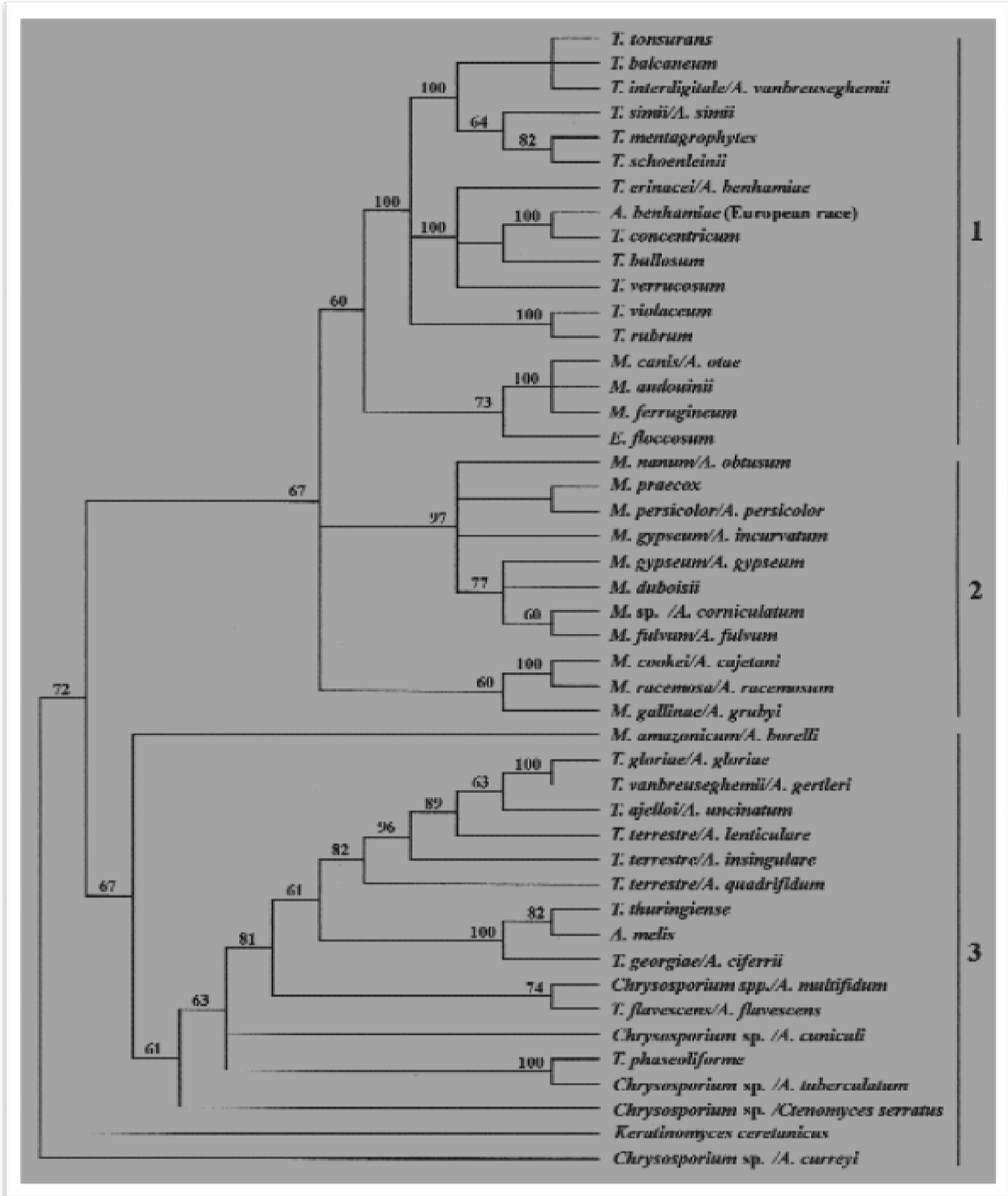
- 1. Koloni görünümü:** Koloni yüzeyi, beyaz, tüysü ve pamuğumsu görülür. Koloni tabanı koyu kırmızı ve morumsu bir renktedir. Kronik tinea pedis ve tinea corporisli hastalardan izole edilen suşlar, beyaz, tüysü, konidiyasız ve değişken pigmentler oluşturur. Diğer izolatlarda, pamuğumsu, açık pigmentasyon ve çok sayıda makrokonidiyum görülür. Güçlü üreaz aktiviteleri yoktur ve *in vitro* ortamda kıl delmez^{14,56}.
- 2. Mikroskopik görünüm:** Bölmeli hifler boyunca dizilen gözyaşı damlası biçiminde mikrokonidiyumlar (2-3 x 3-5 µm) görülür. Tüysü kolonilerde makrokonidiyum ya çok azdır ya da hiç görülmezken, yüzeyi taneli veya kısa tüylü olan kolonilerde çok sayıda makrokonidiyum görülür, ince duvarlı, yüzeyleri düzgün kalem biçiminde görülürler. Mikrokonidiyumların makrokonidiyumlar üzerinde gelişmesi bu dermatofite özgüdür. Hem hiflerden hem de makrokonidiyumlardan artrosporlar oluşur^{2,5,56}.

2.7.7.5. *Trichophyton tonsurans* Malmsten 1845

Tüm dünyada görülen insan kaynaklı dermatofit türüdür. Sıklıkla saçlı deride infeksiyon yapar nadiren saçsız deri ve tırnak bulaşında görülür. Kıl içi (endotriks) bulaş görülür, kılın tümünü dolduran zincir biçiminde dizilmiş sporlar görülür. Spor baskısı ile kıl parçalanır, kıvrılır ve o bölge kara nokta gibi görünür. İnfekte kıl Wood ışığında floresan vermez. Yavaş üreyen kolonileri yaklaşık 12 günde olgunlaşır. Tiyaminli besiyerinde daha iyi gelişirler.

- 1. Koloni görünümü:** Yaygın olarak dört koloni şekli görülür; kenarları kabarık ortası çukur, kıvrımlı, düz ve yassı olmak üzere. Sıklıkla izole edilen suşlar başlangıçta düz olarak gelişir ve pudramsı sarımsı renktedir. Koloni geliştikçe engebeli ve kıvrımlı bir görüntü alır, krem, sarımsı bazen pembe renkte görülürler¹⁷.
- 2. Mikroskopik görünüm:** Bölmeli hifler üzerinde çok sayıda ve değişik şekillerde mikrokonidiyum görülür. Mikrokonidiyumları gözyaşı damlası ve lobut şeklinde görülür. Makrokonidiyum görülmez, ara ve uç klamidosporeler görülür^{2,5,54}.

Tablo 4. ITS1, 5,8S ve ITS2 rDNA bölgeleri dizi analizine göre oluşturulan *Arthrodermataceae* ailesine ait ağaç; Grup 1'e ait türler antropofilik/zoofilik, grup 2'ye ait türler geofilik/zoofilik ve grup 3 türleri tam olarak geofilik türlerdir⁴⁵



2.8. Moleküler Yöntemler

2.8.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Spesifik bir DNA parçasının kopyalarının primerler tarafından yönlendirilerek, enzimatik olarak sentezlenmesi şeklinde tanımlanan *in vitro* bir yöntemdir.

Polimeraz zincir reaksiyonu çift iplikli bir DNA molekülünde hedef dizilere iki oligonükleotid primerin bağlanması ve uzaması esasına dayanır. Amplimer olarak da adlandırılan oligonükleotid primerler, kalıp DNA molekülü yüksek sıcaklık derecelerinde denatüre edildikten sonra, tek iplikli DNA molekülleri üzerinde kendilerine tamamlayıcı olan bölgelerle eşleşirler. Primerlerin spesifik olarak hedef dizilere bağlanması düşük sıcaklık derecelerinde gerçekleşir. DNA polimeraz enzimi, uygun tampon ve dört çeşit deoksiribonükleozid trifosfat (dNTP) varlığında primerin 3' hidroksil ucundan uzamasını sağlar. Böylece kalıp DNA ipliğine tamamlayıcı olan yeni DNA molekülü sentezlenmiş olur. Bir PCR döngüsü denatürasyon, primerlerin bağlanması (annealing) ve uzama (extension) olmak üzere üç aşamadan oluşur. Ardarda tekrarlanan denatürasyon, primerlerin bağlanması ve primerlerin uzaması ile DNA parçaları logaritmik olarak artar. Böylece her PCR döngüsü DNA molekülü üzerinde istenilen bölgenin iki katına çıkması ile sonuçlanır. PCR verimini etkileyen önemli bir faktör, DNA polimeraz enzimidir^{18,19}.

Normalde enzim miktarı, 25-30 PCR döngüsü sonucunda hedef dizi artışı ve termal denatürasyon nedeniyle sınırlayıcı bir etken haline gelir. Verimliliği azaltan bir diğer faktör de konsantrasyonu artan hedef dizilerin primer ile bağlanma yarışına girmesi.

2.8.2. PCR'in temel bileşenleri

PCR'nin temel bileşenleri, kalıp olarak kullanılan DNA molekülü, DNA polimeraz enzimi, primerler, dNTP karışımı, tampon ve MgCl₂'dür.

1. Kalıp DNA: PCR'da genomik DNA'lar, plazmid ve faj DNA'ları, çeşitli genler ve herhangi bir DNA parçası kalıp olarak kullanılabilir. PCR'da kalıp olarak tek ya da çift iplikli DNA'nın yanı sıra RNA'da kullanılabilir. Kalıp olarak RNA kullanılacaksa total RNA ya da poli (A)⁺ RNA'dan önce klasik yolla cDNA elde edilir ya da *Thermus thermophilus* kaynaklı rekombinant Tth DNA polimeraz

enzimi kullanımıyla aynı tüpte RNA'dan DNA ürünü elde edilmesi tek kademede yapılabilir. Genellikle kalıp DNA'da hedef dizinin konsantrasyonu bilinmediğinden, PCR'ın pozitif kontrol DNA ile optimizasyonu faydalıdır. Klonlanmış bir DNA parçası için nanogram, genomik DNA için ise mikrogram düzeyindeki miktarlar kullanılır.

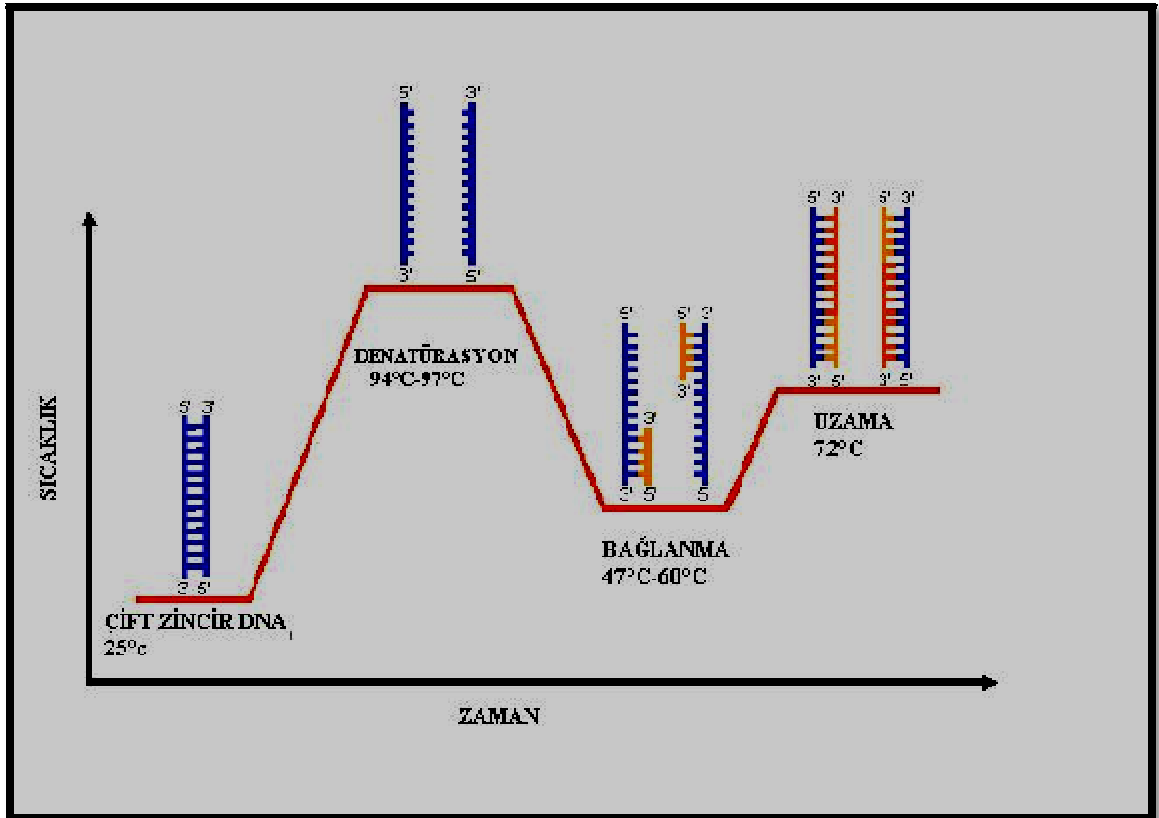
- 2. Polimerazlar:** DNA polimeraz enzimleri, kalıp ipliğe tamamlayıcı bir DNA ipliği meydana getirmek üzere, orijinal kalıp iplikteki baz bilgisini kullanarak dört çeşit deoksiribonükleozit trifosfattan uzun polinükleozid zincirin sentezini kataliz ederler. Bu enzimler, sentezi başlatmak için kalıp moleküldeki tamamlayıcı diziye bağlanan kısa DNA parçalarına (primerlere) gerek duyarlar. Sentezin yönü 5' uçtan 3' uca doğru olup, primerin serbest 3' hidroksil ucuna ortamdaki dNTP'lerin nükleofilik etki yapmalarıyla, fosfodiester bağlarının katalizi ve yeni DNA ipliğinin polimerizasyonu sağlanır^{18,19}.
- 3. dNTP karışımı:** Deoksiribonükleozit trifosfatlar (dATP, dGTP, dTTP ve dCTP) yüksek saflıkta ya tek tek ya da dördü karışım halinde ticari olarak sağlanır. Taq DNA polimeraz düşük dNTP konsantrasyonlarında (10-100µM) kalıba uygun doğru bazları seçmede daha başarılı olmakla birlikte, normal koşullarda PZR 100µM dNTP konsantrasyonu ile gerçekleştirilir. Optimal dNTP konsantrasyonu; MgCl₂ konsantrasyonuna, reaksiyon koşullarına, primer konsantrasyonuna, çoğaltılmış ürünün boyuna ve PCR döngü sayısına bağlıdır¹⁸.
- 4. Tamponlar ve MgCl₂:** PZR'de en çok kullanılan tampon Taq/Amplitaq enzimlerine özgü olanlardır. MgCl₂'ün reaksiyon karışımındaki final konsantrasyonu genellikle 0,5-5,0 mM arasında değişir. Mg⁺² iyonları dNTP'ler için çözünebilir kompleksler oluştururlar, polimeraz aktivitesini stimüle ederler ve çift iplikli DNA'nın Tm değerini artırır, ayrıca primer/kalıp etkileşimini sağlar. Düşük Mg⁺² konsantrasyonu, ürün oluşumunda azalmaya, yüksek Mg⁺² konsantrasyonu ise spesifik olmayan ürün birikimine sebep olur^{18,19}.

2.8.3. PCR Aşamaları

1.Denatürasyon: İlk aşamadır ve DNA molekülünün çift zincirli yapısı yüksek ısı yardımıyla birbirinden ayrılır (denatürasyon). Çoğunlukla 94°C- 97°C arasında 15-60 sn süresince uygulanır.

2.Annealing (Bağlanma): Denatürasyonu takiben daha düşük ısılarda oligonükleotid primerler, ayrılmış olan tek zincirli DNA üzerinde kendi eşlenikleri olan bölgelere bağlanırlar. Bu olay çoğunlukla 47°C- 60°C arasında 30-60 sn de gerçekleşir. G/C oranı yüksek olan bölgelerde bağlanma ısısı 68°C'ye kadar arttırılabilir.

3.Elongasyon (uzama): Son aşamada ısı 72°C'ye kadar arttırılarak DNA polimeraz enziminin tamamlayıcı DNA zincirini uzatması sağlanır. Elongasyon basamağının süresi kullanılan polimerazın cinsine ve amplifiye edilecek DNA'nın uzunluğuna göre 30sn ile 3 dakika arasında değişir⁴⁷.



Şekil 3. PCR aşamaları⁴⁷.

2.8.4. PCR ÇEŞİTLERİ

2.8.4.1. Yuvalanmış (Nested) PCR

Yuvalanmış (Nesdet) PCR özgün olmayan ürünlerin oluşumunu engelleyen, yüksek özgünlükte bir PCR yöntemidir. Bu yöntemde ardı ardına iki PCR yapılır. İlk PCR özgün olmayan ürünlerin oluşumuyla sonuçlar. İkinci PCR ise ilk PCR sonucu çoğaltılmış DNA' nın iç kısımlarına ait diziler içeren “nested” primerler ile yapılır. İlk PCR ürünleri ikinci PCR için kalıp olarak kullanılır ve istenilen hedef bölge çoğaltılarak özgün ürünleri elde edilir. Böylece “nested” PCR doğru ürünlerin çoğaltılması için kullanılabilir^{18,19,25}.

2.8.4.2. Demirlenmiş (Anchored) PCR

Demirlenmiş (Anchored) PCR çoğaltılacak olan DNA' nın sadece bir bölgesinin (yani bir primer bölgesinin) bilindiği durumda uygulanır. Amaç bilinen bölgeden yararlanılarak ilgilenilen DNA parçasının çoğaltmasıdır. Bu amaçla çoğaltılacak DNA bilinen bir diziye bağlanır ve bu bilinen dizi 2. primer bölgesi olarak kullanılır.

“Anchored” PCR için kullanılan temel yöntemlerden biri çoğaltılacak DNA' nın bir vektöre klonlanmasını içerir. İkinci primer bağlanma dizisini sağlamak üzere “anchor” diziligiyle standart bir vektöre bağlanır. Böylece biri bilinen bir dizi, diğeri hemen yanında çoğaltılacak DNA' nın yerleştirildiği vektöre ait dizi olmak üzere iki primerle PCR gerçekleştirilir¹⁸.

2.8.4.3. Geri (Reverse) Transkripsiyon PCR'si (RT-PCR)

RNA PCR olarak da adlandırılan RT-PCR iki aşamalı olup RNA'dan tamamlayıcı DNA sentezi (geri transkripsiyon) ve tamamlayıcı DNA' nın da standart PCR yoluyla çoğaltılması aşamalarını kapsar. RT-PCR tek aşamalı bir reaksiyonla da gerçekleştirilebilir. *T. thermophilus* (*Tth*) DNA polimerazı gibi bazı polimerazlar mangan varlığında hem RNA hem de DNA kalıp ipliklerini kullanabildiğinden tüm işlem aynı tüpte tek aşamada yapabilmektedir.

RT-PCR mRNA veya viral RNA miktarlarının belirlenmesi ile RNA düzeyinde gen anlatımı çalışmalarında oldukça duyarlı bir yöntemdir. “Aynı zamanda Message Amplication Phenotyping –MAPPING–“ olarak da bilinen bu yöntem az sayıdaki

hücreden aynı anda fazla RNA örneğindeki tüm mRNA Lardan PCR yoluyla cDNA kitaplıklarının oluşturulması için de yararlı bir yöntemdir. Böylece, çok az sayıdaki, hatta tek bir hücreden ya da çoğaltılmayan hücrelerden bile cDNA kitaplıklarının kurulması gerçekleştirilebilir^{18,19}.

cDNA sentezinde kullanılacak çeşitli kaynaklardan izole edilmiş revers transkriptaz enzimleri vardır. Bunlara örnek olarak “avian myeloblastosis virus” (AMV) ve “Moloney murine leukemia virus” (MMLV) revers transkriptazları verilebilir¹⁸.

2.8.4.4. Asimetrik PCR

Bu PCR çeşidinde, kullanılan iki çeşit primerden biri miktarca diğerinden çok daha fazla kullanılır. Bu nedenle asimetrik PCR sonucu ipliklerden biri diğerinden çok daha fazla çoğaltılır. Asimetrik PCR yöntemi fazla miktarda çoğaltılan tek iplikli ürünün dizilenmesi için kullanılır.

Asimetrik PCR herhangi bir kalıp ipliğiyle uygulanabilir. Ancak tek iplikli ürünün fazla miktarda elde edilememesi gibi bir sonuçla karşılaşmak da olasıdır. Bu nedenle çoğunlukla klasik PCR (simetrik PCR) ile önce çift iplikli hedef DNA çoğaltılır, ardından asimetrik PCR uygulamasıyla, kalıp yeniden çoğaltılarak tek iplikli ürün yeterli miktarda üretilir. Tek iplikli ürünün çift iplikli üründen kolaylıkla ayırt edilebilmesi için iki yol izlenebilir. İlkinde P³² ile işaretli dNTP kullanıp, oluşan PCR ürününün Southern blotting’den sonra tek iplikli ürünün tamamlayıcısı olan bir oligonükleotid prob ile melezlenmesi yoluyla tek iplikli ürünler belirlenir. İkinci yol ise EtBr ile boyanmış ürünlerin agaroz ya da poliakrilamid jeller kullanılarak elektroforetik ayırımıdır^{18,19}.

2.8.4.5. Ters (Invers) PCR (IPCR)

Ters (inverse) PCR bilinen bir DNA dizisinden yararlanılarak bu DNA’nın her iki ucundaki bilinmeyen bölgelerin çoğaltılması için kullanılır. Bu yöntemle bilinen diziyi içeren DNA önce restriksiyon enzim kesimi ile doğrusal ve sonra bilinen DNA’yı içerecek şekilde halkasal hale getirilir. Ardından bilinen DNA dizilerine ikinci bir restriksiyon kesimi uygulanmasıyla tekrar doğrusal olarak elde edilen DNA molekülü bilinen dizilere uygun olarak tasarlanan primer yardımıyla çoğaltılır. Böylece dizisi bilinmeyen DNA parçası çoğaltılmış olur^{18,19}.

Ters PCR özellikle transpozonlarla gen yakalanması yöntemi “**gene tagging**” ile birlikte kullanıldığında bilinmeyen DNA dizilerinin çoğaltılması için faydalıdır .

2.8.4.6. Çoklu (Multipleks) PCR

Bir PCR ile birden fazla hedef dizinin birlikte çoğaltılması çoklu (multipleks) PCR olarak adlandırılır. Multipleks PCR birden fazla bölgeye bağlanan multipleks primerler ile gerçekleştirilir. Bu PCR gen delesyonlarının haritalanması, küçük delesyonların, çerçeve kayması ve nokta mutasyonlarının analizinde kullanılan bir yöntem olduğundan “Duchenne Muscular Dystrophy” (DMD) ve kistik fibrozis gibi genetik hastalıkların tanısında kullanılır^{18,31}.

2.8.4.7. Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA (RAPD)

RAPD nükleotid dizilimi rastgele seçilmiş primerler kullanılarak yapılan polimeraz zincir reaksiyonu olup nükleotid dizi bilgisine sahip olmaksızın polimorfizmin belirlenmesini sağlar.

Polimorfizmin belirlenmesi genetik işaretlerin (marker) elde edilmesinde ve genetik harita yapımında kullanılır. RAPD'nin temeli yaklaşık 10 nükleotid dizilimi rastgele seçilmiş tek çeşit primerlerin kullanımına dayanır. Bu primerler tasarlanırken primerlerin GC/AT oranlarının %50 ya da daha büyük olmasına dikkat edilir^{18,31}.

2.8.4.8. Real-Time PCR

Real-Time, nükleik asit amplifikasyonu ile eş zamanlı olarak artış gösteren flöresans sinyalin ölçülmesiyle kısa sürede, kantitatif sonuç verebilen PCR yöntemidir. DNA boya ya da flöresan probolar gibi analiz için gerekli olan reaktifler PCR karışımına amplifikasyondan önce eklenir. Veriler, amplifikasyon süresince aynı tüp içinden ve aynı cihaz ile toplanır. Örnek transferi, reaktif eklenmesi ve ayırımı yoktur. Çünkü kapalı sistemden örneğin çıkarılmasına ihtiyaç yoktur, takip eden reaksiyonlarda ürünün kontamine olma riski büyük ölçüde azalmıştır^{18,19,25,31}.

Real-Time PCR güçlü, basit ve hızlıdır, ayrıca mikrobiyoloji laboratuvarlarındaki pek çok geleneksel tekniğin geleceğini değiştirmektedir. Real-time tekniklerinin uygulamaya girmesinden önce niceliksel tayin için PCR süresince periyodik olarak verilerin toplanması yaygın olarak kullanılmakta idi. Farklı döngülerde

örnekten küçük miktarlar çıkarıldıktan sonra, ürünler elektroforez ile ayrılmış ve radyoaktivite ile miktar saptanması yapılmıştır. Bugün 'Real-Time' PCR'da flöresans tercih edilen bir indikatördür. Çift sarmallı PCR ürünlerini göstermek için etidyum bromid kullanılan ilk tekniktir, her döngüde flöresansa ihtiyaç duyarlar. Eğer hedef DNA varsa, flöresans artar. Başlangıçtaki hedef DNA miktarına bağlı olarak artış görülür. Real-Time PCR'ın tüm gücü her bir döngüde sadece bir izlemin yapılmasıdır. Sıcaklık değişirken flöresans izlendiğinde, ergime eğrileri hangi ürünlerin amplifiye edildiğini ortaya koyar ve tek bir baza kadar dizilim değişimlerini saptayabilir^{17,18,31}.

Real-Time PCR'da, hedef DNA moleküllerinin sayısı ısı döngüleri kullanılarak artırılır, bu nedenle kolaylıkla saptanabilirler. DNA boyaları ya da diziye özgül problardan elde edilen flöresans, PCR'ın her döngüsünde izlenebilir. Her döngüde izlenen flöresans değişimlerinin analiziyle elde edilen bilgisayar verileri ile reaksiyonlar pozitif olarak tanımlanır. PCR süreci çok hızlıdır ve kültüre göre çok daha özgüdür.

Amplifikasyonu görünür hale getiren ve monitorize edebilen flöresan işaretli prob ve boyaların kullanılır. Floresan, oluşan DNA ile doğru orantılı olarak artar^{25,31}.

2.8.4.8.1. Real-Time Kullanım Alanları

1. DNA'nın kopya sayısını sayısal değerlere dönüştürme (DNA konsantrasyonu bilinen bir örnek kullanılarak)
2. Gen ekspresyonunun (mRNA) kantitasyonu
3. Multiplex PCR'da etkili değerlendirme
4. Viral kantitasyon
5. Genotipleme melting-curve analizi²⁵

2.8.4.8.2. Real-Time'da Kesinlik ve Doğruluk

Real-Time PCR niceliksel ölçümün doğruluğu standartlara bağlıdır. Spektrofotometre ile niceliksel ölçümü yapılan saflaştırılmış PCR ürünleri kolaylıkla elde edilir. Alternatif olarak saflaştırılmış plazmitler veya genomik DNA standart olarak kullanılabilir. Niceliksel Real-Time PCR'ın kesinliği kopya sayısına bağlıdır. Eğer başlangıçtaki hedef konsantrasyonu düşükse kesinlik de düşük olacaktır. Değişkenlerin bir kısmı Poisson dağılımı tarafından tarif edilmiş tesadüfi sınırlamalardan kaynaklanmaktadır^{18,19,25,31}.

2.8.4.8.3. Real-Time Analizi

Real-Time PCR sırasında flöresans ile sıcaklık grafiğinin göstermektedir ki, belirli boyalar veya proplar kullanıldığında ısı döngüsü sırasında hibridizasyon bilgileri elde edilebilmektedir. Örneğin, SYBR Green I boyası ile PCR ürünleri ergime sıcaklıkları yolu ile tanımlanabilmektedir^{25,31}.

Klasik mikrobiyolojide kültür pozitifliğinden sonra genellikle ek işlemler; kimyasal testler ile tür tanımlaması, serolojik testler ile suşun tiplendirilmesi ve çeşitli yöntemlerle antibiyotik duyarlılığının incelenmesini içerir. Pek çok olguda, uygun veriler mevcut olduğunda, DNA dizilim analizi bir seçenektir, ancak maliyet ve iş gücüne dayanır. Bütün bu yöntemler kültür tanımlandıktan sonra, ikinci bir ayırım prosedürü olarak uygulanır^{18,19,31}.

'Real-Time' PCR'da, analiz basamağı, ergime eğrisi olarak ısı-döngü protokolünün içerisine eklenebilir. Ergime eğrileri, ergime noktalarına bakılarak PCR ürünlerini ve dizilim çeşitlerini tanımlar. Saptama ve ölçüm için kullanılan bazı boya ve proplar aynı zamanda ergime-eğrisi analizi de yapabilirler. Real-Time PCR, mikro-organizmaları saptama, ölçüm ve analizlerini içine alan hızlı bir yöntemdir²⁰.

2.8.4.8.4. Floresan Prob Sistemleri

1. Hidrolizasyon proplar (TaqMan, Beacons, Scorpions).
2. Hibridizasyon proplar (LightCycler, Roche)
3. DNA'ya bağlanan (binding) boyalar (SYBR Green)²⁰.

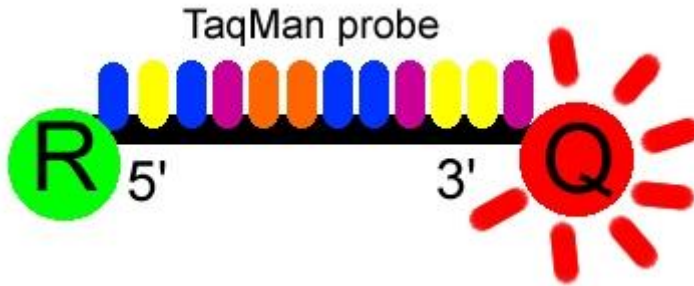
2.8.4.8.5. DNA'ya bağlanan boyalar

SYBR Green: "SYBR Green I" en fazla kullanılan boya çeşididir. Spesifik olmayan çift zincirli DNA'nın çoğaltımında "SYBR Green I" yöntemi kullanılır. Bu yöntemde kullanılan floresan boya sadece çift zincirli DNA'ya bağlandığından çoğalan DNA miktarındaki artışa paralel olarak "real-time" PCR cihazında okunan flöresanın miktarı da eş zamanlı olarak artar²⁵.

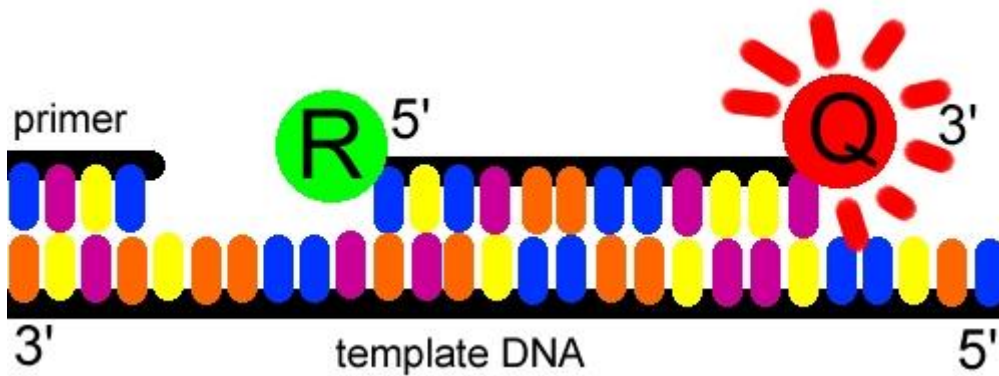
Serbest DNA molekülü çok az bir flöresan ışımaya yapar. Primerler bağlanıp uzama başladığında boya molekülü çift zincirli DNA'nın arasına girer ve floresan yayılımı başlar. Başlangıçtaki döngü boyunca sinyal zayıftır; ürün miktarı arttıkça flöresan miktarı hızla artar ve bu artış "real-time" cihazının monitöründen izlenebilir.

Taqman Probe Yöntemi: Amplifiye edilmek istenilen DNA'ya komplementer olan ve floresan isaretlenmiş tek zincirli (özgül) problemler içerir. Floresan isaretleli problemlerin 5' ucunda "reporter" boya (acceptor dye) 3' ucunda "quencher" boya (donor dye) bulunmaktadır. Problemler hedef ampliconlar üzerinde birbirine yakın (1-5 nükleotit uzaklıkta) yere bağlanmakta ve işaretli uçlar yan yana gelmektedir^{19,20}.

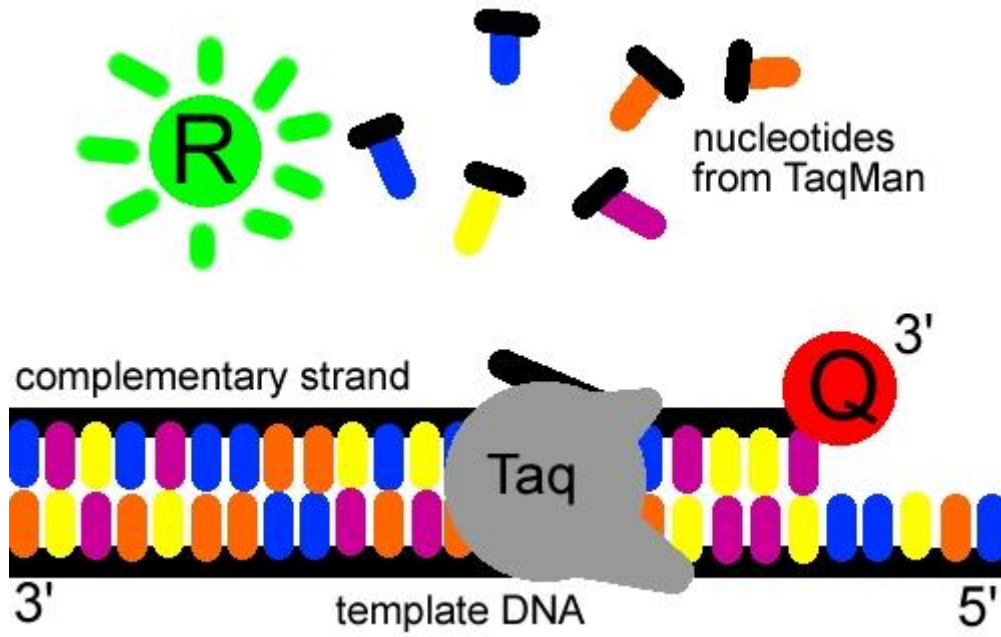
Primerlerin hedef nükleik asite bağlanmasının ardından primer uzaması prob'un bağlandığı noktaya kadar geldiğinde, sentezin devam edebilmesi için *Taq* DNA polimeraz enzimi 5'→3' nükleaz aktivitesini kullanarak probu 5' uçtan yıkmaya başlar. Böylece raportör boya ve quencher boya ayrılır. İki boyanın ayrılması sonucu Fluorescence resonance energy transfer, (FRET)" olarak adlandırılan bir enerji transferi oluşur. Bu transfer sonucunda oluşan flöresans miktarı, PCR siklusu süresince oluşan ampliconların miktarına bağlı olarak artmaktadır^{18,19,20,25}.



Şekil 4: Taqman probe⁴⁷.



Şekil 5: Taqman probe'un hedef DNA'ya bağlanması⁴⁷.



Şekil 6: Hidrolizis veya TaqMan problemlerinde prob ters uçlarından bir flüoresan “reporter” bir de “quencher” ile işaretlenir. PCR sürecinde hedefe yapışık olan problemler taq polimeraz enziminin 5'-3' ekzonükleaz aktivitesi ile hidrolize edilir “reporter” ucundan flüorofor ayrılır ve flüoresan miktarı artar. Buradaki flüoresan artışı prob hidrolizinin bir sonucu olduğu için (prob birleşmesi değil), bu problemlere hidrolizis problemleri denir. Birden fazla prob kullanımı ve her proba farklı bir flüorofor etiketlenmesi ile multiplex (çoklu) deteksiyon yapmak olanaklıdır⁴⁷.

2.8.4.8.6. Real time PCR Temel Fazları

1. Üssel (Exponential) faz : PCR ürün miktarı her siklуста tam olarak iki kat artar, reaksiyon spesifik ve tamdır.
2. Doğrusal (Linear) faz: Reaksiyonun komponentleri tükenmeye başlar ve reaksiyon yavaşlar.
3. Plato faz: Reaksiyon sonlanmaktadır²⁵.

2.8.4.8.7. Real-Time PCR Avantajları

1. Spesifik olmayan amplifikasyonlardan etkilenmez.
2. Reaksiyon anında analiz imkanı verir.
3. PCR sonrası tekrar bir işlem gerektirmez ve hızlı bir yöntemdir.
4. Duyarlılığı, özgüllüğü ve tekrarlanabilirliği yüksektir^{25,37}.

2.8.4.8.8. Real-Time PCR Dezavantajları

1. Teknik donanım, alt yapı, tecrübe ve deneyim gerektirir.
2. Yüksek ekipman ihtiyacı vardır.
3. Aynı ve farklı laboratuvarlarda sonuçlar arasında farklılıklar olabilir.
4. Standardizasyon problemi yaşanabilir^{25,37}.

Tablo 5. PCR ve Real-Time PCR karşılaştırılması⁴⁷.

PCR tipi	Hedef	Uygulama	Avantaj	Dezavantaj
Klasik	DNA	DNA dizisinin amplifikasyon ve araştırması	En kolay uygulanan düşük maliyetli, az ekipmanlı	Amplifikasyon sonrası analiz gerekir, Daha fazla zaman, insan hatası, kontaminasyon riski.
Real-Time	DNA	Hedef nükleik asit dizinin kopya sayısı ve kantifikasyonu	Hızlı, amplifikasyon sonrası analize gerekmez sonuçlar daha kesin Kontaminasyon riski azdır.	Pahalı ekipman ve sarf malzeme gerektirir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmada, Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS), Utrecht, Hollanda'dan sağlanan 26 standart köken ve Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Mikoloji Bilim Dalında stoklanan ve her biri ayrı olgulardan izole edilen 29 dermatofit suşu kullanıldı. Tanı testleri, klasik ve moleküler olmak üzere iki aşamada çalışıldı. Test öncesinde saf kültür elde etmek amacı ile izolatlar; gentamisin, kloramfenikol ve sikloheksimit katkılı Sabouraud glikoz agara inoküle edildi. Besiyerleri aerop koşullarda, 26°C'de 4 hafta inkübe edildi.

Klasik tanıda morfolojik (makro ve mikro-konidyum ve hif yapısı), fizyolojik (*in vitro* kıl delme deneyi) ve biyokimyasal (üreaz tepkimesi) özelliklerden yararlandı. Moleküler çalışma öncesinde saf kültürde üreyen suşlardan DNA ekstraksiyonu yapıldı. Ekstrakte edilen suşların DNA'ları kısa oligonükleotid dizisine sahip (GACA)₄ primeri ile PCR'ı çalışıldı²¹ ve bant profilleri yönünden incelendi. Sonra, yüksek ayırım gücüne sahip real-time PCR yöntemi uygulandı ve real-time PCR yöntemi multipleks olarak çalışıldı. Bu amaçla, ITS1 ve ITS2 bölgeleri için iki ayrı tüp hazırlandı²².

3.1. Klasik (Geleneksel) Yöntem

3.1.1. Besiyerleri

3.1.1.1. Sabouraud Glikoz Agar (SGA, Merck, Darmstadt, Germany)

Glikoz	40gr
Pepton	10gr
Agar	15gr
Distile su	1000ml
pH	5.6-6.0
Sikloheksimit (Sigma, Steinheim, Germany)	500mg
Kloramfenikol (Sigma, Steinheim, Germany)	50mg
Gentamisin (Sigma, Steinheim, Germany)	200mg

Ticari olarak hazırlanmış besiyeri 65g tartıldı, 1000 ml distile su eklendikten sonra 121°C'de 15 dk 1 atm basınçta otoklavda steril edildi. Sıcaklığının düşmesi beklendi, ardından besiyeri içerisine %95'lik etil alkolde çözdürülmüş sikloheksimit ve kloramfenikol ve gentamisin eklendi. Steril tek kullanımlık plastik petri kutularına besiyeri kalınlığı 4mm olacak şekilde 25'er ml dağıtıldı. Moleküler çalışmada kullanmak amacıyla hazırlanan besiyerinden steril tüplere 5ml konulup temiz bir yüzeyde eğik olara katılaşımları beklendi, sonra kullanım sürelerine kadar +4 °C'de bekletildi. Kontrol amaçlı 26 ve 37°C'lik etüvlere birer adet besiyeri konuldu ve olası kontaminasyon risklerine karşı 10 gün bekletildi.

3.1.1.2. Patates Dekstroz Agar (PDA, Merck, Darmstadt, Germany)

Patates infüzyon	200 gr
Dekstroz	20 gr
Agar	15 gr
Distile su	1000 ml
pH	5.6-6.0

Ticari olarak hazırlanmış besiyerinden 39 gr tartılıp, 1000 ml distile su eklendikten sonra 121°C'de 15 dk 1 atm basınçta otoklavda steril edildi daha sonra steril tek kullanımlık plastik petriyer içerisine kalınlığı 4 mm olacak şekilde 25'er ml dağıtılıp katılaştıktan sonra kullanım sürelerine kadar +4°C'de bekletildi. Kontrol amaçlı 26 ve 37°C'lik etüvlere konularak olası kontaminasyon risklerine karşı 10 gün bekletildi.

3.1.2. Laktofenol pamuk mavisi (Merck, Darmstadt, Germany)

Ticari olarak hazır halde temin edilen laktofenol pamuk mavisi kullanıldı. 7 gün 26°C'de inkübasyonu tamamlanan dermatofit kökenlerinin hif, klamidospore ve mikrokonidiyumlarını göstermek amacıyla kullanıldı. Selofan bant yardımı ile koloni yüzeyine hafif değdirip laktofenol pamuk mavisi yayılmış temiz bir lam üzerine yapıştırıldı, önce x10'luk ardından x40'luk objektifte incelendi⁴.

3.2. Moleküler Yöntem

3.2.1. DNA izolasyonu için kullanılan solüsyonlar

3.2.1.1. TEN buffer (Parçalama solüsyonu)

Tris-HCl 50 mM

EDTA 25 mM

NaCl 75 mM

Ultrapure su içerisinde çözdürüldü. pH 8 olarak ayarlandı ve otoklavda steril edildikten sonra +4°C'de saklandı.

3.2.1.2. %10'lük SDS solüsyonu

SDS 1gr

Ultrapure su 10 ml'ye tamamlandı

Oda ısısında saklandı.

3.2.1.3. Fenol-Kloroform-İzoamil Alkol (25:24:1)

Sıvı fenol 25 ml

Kloroform 24 ml

İzoamil alkol 1 ml

Karışım hazırlanıp vortekslendi ve +4°C'de buzdolabında saklandı.

3.2.1.4. %70'lik Etil Alkol

Etil alkol 70 ml

Steril distile su 30 ml

Karışım hazırlandı ve steril cam şişede +4°C'de buzdolabında saklandı.

3.2.1.5. 10 x TE

Tris-HCl 0.157 gr

EDTA 0.0372 gr

100ml ultrapure su içerisinde çözdürüldü ve otoklavda steril edildi. pH 7.5-7.6 olarak ayarlandı.

3.2.1.6. 10 x TBE

Tris-base	10.78 g
Borik asit	5.5 g
EDTA	0.744 g

100ml ultrapure su içerisinde çözdürüldü, otoklavda steril edildi. pH 8'e ayarlandı.

3.2.1.7. Yükleme tamponu

1 gr agaroz, 100 ml 0,5 x TBE'de mikrodalga fırın içerisinde eritildi.

3.2.2. DNA izolasyon protokolü

1. Eğik katı, sikloheksimit ilaveli SGA'da 7 gün 26°C'de üreyen dermatofit kökenlerinin üreme çizgisinin üzerine kadar TEN buffer eklendi ardından bir kaç defa kısa vorteksler yapıldı ve 30 dk bekletildi.
2. Tüplerden ependorf içerisine 400 µl alınıp üzerine 10 µl Lyticase enzimi (7mg/mL) ilave edildi ve 30 °C'de 30 dk inkübe edildi.
3. Her ependorfa 100 µl % 10luk SDS, 10 µl proteinaz-k (20.0mg/ml) eklendi 55 °C'de 60 dk inkübe edildi.
4. 600 µl fenol/kloroform/izoamilalkol (25:24:1) karışımı eklenip 12000 rPm'de 10 dk santrifüj edildi (santrifüj öncesi kısa vorteksler yapıldı).
5. Üst faz yeni ependorfa alınıp üzerine, örneğin 2 katı izopropil alkol eklendi, 12000 rPm de 10 dk santrifüj edildi.
6. Üst faz atılıp alttaki pellete 600 µl % 70'lik etanol ilave edildi ve 12000 rPm'de 10 dk santrifüj edildi.
7. Üst faz döküldü ve etüv içerisinde kurumaya bırakıldı.
8. Örneğin miktarına göre 100 µl 1 x TE ilave edildi. Spektrofotometrede DNA miktarları ölçüldü.
9. Bir sonraki çalışma süresine kadar -20°C'de saklandı¹¹.

3.2.3. PCR karışımı

MgCl ₂ (25mM)	2 µl
dNTP _s (10mM)	2 µl
primer 1 (0.5 µg/ml)	10 pmol
Tag (5U/µL)	0.5µl
DNA örneği	5 µl
Distile su	50 µl tamamlanır ²¹ .

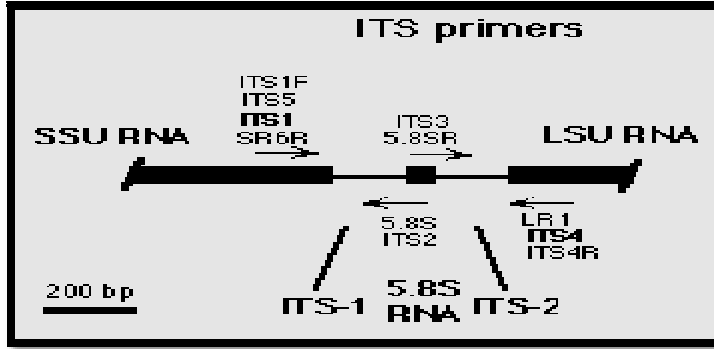
3.2.4. PCR şartları

- 93 °C’de 3dk
 - 93 °C’de 1 dk
 - 50 °C’de 1dk
 - 72 °C’de 1dk
 - 72 °C’de 7dk²¹
- } 39 siklus

3.2.5. Çalışmada kullanılan primer dizisi

(GACA)₄: GACAGACAGACAGACA²¹

Hedef aldığı bölgeler



Şekil 7. ITS primerleri.

3.2.6. Real-Time PCR

Real-time PCR’da kullanılan karışımda 1x syber green Master Mix (roche-applied-science), 5 nM forward ve revers primerler ve PCR grade su kullanıldı.

Karışımın final hacmi 20 µl oldu. Real-Time PCR protokolünün ilk adımı olan DNA polimerazın aktive olması için 95°C de 10 dk bekletildi. Amplifikasyon için 95°C 10 sn, 60°C 30 sn ve 72°C 1 sn PCR programı kullanıldı. Her döngü 45 defa tekrarlandı. Soğutma aşamasında 40°C'de 30 sn bekletildi. Bu aşamalar Roche LigthCycler 2.0 Real-time PCR cihazında kullanıldı. Değerlendirme cihazın kalitatif deteksiyon programı ile yapıldı^{25,31,35,37}.

Örnek elde edilen mantar DNA'larından LightCycler Taqman Master (Roche, Almanya) yöntemine göre Real-Time PCR tekniği kullanılarak araştırma yapıldı. Kalitatif sonuçlar için fungal DNA'lara uygun primer (forward ve revers) ve proplar TIB MOLBIOL (Berlin, Almanya) firmasında sentezi yaptırılıp temin edildi.

Real-time PCR'da tespiti için önce karışım hazırlandı. Her bir örnek için PCR tüplerine 5 µl örneklerden izole edilen template (örnek DNA'sı) ve üzerine sırayla Roche firmasının Taqman master karışımından 4 µl (içeriğinde; fast start Taq DNA polimerase, reaksiyon buffer, MgCl₂, dNTP miks), 1 µM forward primer ve revers primer, propların her (FAM, YAK ve CY5) birinden son konsantrasyon hacmi 0,2 µM eklendi. Toplam hacim 20 µl olacak şekilde PCR grade su eklenip tamamlandı^{31,35,37}.

Tablo 6. Real-Time PCR karışımı²²

Forward primer	(1µM)	2µl
Revers primer	(1µM)	2µl
FAM probe	(0.2 µM)	2µl
YAK probe	(0.2 µM)	2µl
CY5 probe	(0.2 µM)	2µl
Master miks		4µl
Distile su		3µl
DNA		5µl

ITS1 ve ITS2 bölgelerini hedef alan primer ve probe'lar iki ayrı tüp içerisinde hazırlandı, çalışma multipleks olarak gerçekleştirildi bir defada 16 örneğin hem ITS1

hemde ITS2 bölgeleri çalışıldı. 32 kapilleri bulunan LightCycler 2.0 (Roche, Almanya) cihazına yüklendi.

Tablo 7. Real-Time PCR şartları²⁵

PCR aşamaları		Hedef ısı (°C)	Bekleme süresi (sn)	Isı geçiş oranı (°C/sn)	Floresan okuma
Ayrılma		95	600	20	yok
Amplifikasyon 45 Döngü	Ayrılma	95	10	20	yok
	Bağlanma	55	60	20	Tek okuma
	Uzama	72	1	20	yok
Soğuma		40	30	20	yok

Çalışmada kullanılan farklı sıcaklıklar ve özellikleri:

a. 95 °C’de 600 saniye; Amplifikasyondan önce ortamda bulunan bütün DNA’ların denatüre edilerek tek iplikli hale gelmesini sağlamak.

b. 95 °C’de 20 saniye; Amplifikasyon programının ilk basamağıdır. Primerlerin bağlanmasını sağlamak amacıyla DNA ların tek iplikli hale gelmesini sağlamaktır.

c. 55 °C’de 60 saniye; Kullanılan primerlerdeki G, C, A ve T baz miktarları gözönünde bulundurularak $Tm=(G+C)x4+(A+T)x2$ formülü (Tm =melting temperature=erime ısısı) ile ayarlanmıştır ve bu sıcaklıktan 5°C aşağısı kullanılmıştır. Bu programdaki sıcaklık seviyesi; primerlerin, çoğaltılması hedeflenen nükleik asitte bulunan ve primerlere spesifik yerlere bağlanması için gerekli olan sıcaklıktır.

d. 72 °C’ de 1 saniye; DNA Taq polimeraz enziminin çalışma sıcaklığı olup, c’deki programın çalışması ile spesifik bölgelere bağlanan primerlerin uzaması için ayarlanmıştır. Bu sıcaklıkta DNA Taq polimeraz enzimi dNTP’leri kullanarak amplifikasyonu gerçekleştirir^{25,31,35,37}.

LightCycler PCR 2.0 sisteminin en önemli özelliklerinden biri hava ısıtma prensibi ile çalışmasıdır. Makine içindeki hava ısıtılarak bir fan aracılığı ile makine içi ortama homojen ve hızlı bir biçimde dağıtılır. Diğer konvansiyonel PCR makineleri su

ısıtma islemi ile çalışırlar. LightCycler PCR 1.5 ve 2.0 makineleri diğerk PCR sistemlerinden farklı olarak PCR tüpleri yerine özel kapiller borosilikat borucuklarla çalışır. Öncelikle hava suya göre çok daha hızlı ısınıp soğuduğı için PCR zamanı minimuma iner. Bu sistemlerde PCR zaman süreci ortalama 30-45 dakika sürer.

Tablo 8a. Çalışmada kullanılan standart suşlara ait bilgiler.

Tür ismi	Referans no	Anatomik bölge	Coğrafik Bölge
<i>T. soudanense</i> ^a	CBS 437.63	Saçlı deri	Afrika
<i>T. soudanense</i> ^a	CBS 436.63	Saçlı deri	Afrika
<i>T. soudanense</i> ^a	CBS 411.88	Saçlı deri	Hollanda
<i>T. soudanense</i> ^a	CBS 363.88	Saçlı deri	Hollanda
<i>T. verrucosum</i>	CBS 460.59	Saçlı deri	Hollanda
<i>T. verrucosum</i>	CBS 123.97	Saçlı deri	Bilinmiyor
<i>T. schoenleinii</i>	CBS 434.63	Saçlı deri	Hollanda
<i>T. schoenleinii</i>	CBS 855.71	Saçlı deri	Hollanda
<i>M. ferrugineum</i>	CBS 457.80	Saçlı deri	Kenya
<i>M. ferrugineum</i>	CBS 118546	Saçlı deri	Çin
<i>M. ferrugineum</i>	CBS 118547	Saçlı deri	Çin
<i>M. ferrugineum</i>	CBS 118548	Saçlı deri	Çin
<i>M. ferrugineum</i>	CBS 449.61	Saçlı deri	Zaire
<i>T. concentricum</i>	CBS 452.59	Saçsız deri	Bilinmiyor

Tablo 8b. Çalışmada kullanılan standart suşlara ait bilgiler.

Tür	Referans no	Anatomik bölge	Coğrafik Bölge
<i>T. schoenleinii</i>	CBS 564.94	Saçlı deri	Bilinmiyor
<i>T. schoenleinii</i>	CBS 114328	Saçlı deri	Çin
<i>T. schoenleinii</i>	CBS 118537	Saçlı deri	Çin
<i>T. violaceum</i>	CBS 442.63	Saçlı deri	Almanya
<i>T. violaceum</i>	CBS 118534	Saçlı deri	Çin
<i>T. violaceum</i>	CBS 119446	Saçlı deri	Gabon
<i>T. yaoundei</i> ^b	CBS 730.88	Saçlı deri	Fransa
<i>T. yaoundei</i> ^b	CBS 305.60	Saçlı deri	Bilinmiyor
<i>M. audouinii</i>	CBS 760.87	Saçlı deri	Mısır
<i>M. audouinii</i>	CBS 732.88	Saçlı deri	Mısır
<i>M. audouinii</i>	CBS 545.93	Saçlı deri	Hollanda
<i>M. audouinii</i>	CBS 102894	Saçlı deri	Hollanda

CBS: Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, Hollanda

a/b: Bu suşlar CBS'de 2001 den sonra *T. violaceum* olarak isimlendirilmiştir.

Table 9. Real-Time PCR’da kullanılan primer ve probe dizileri²².

Hedef dizi	Amplifiye türler	Primer ve probe dizileri	5’-boya
ITS 1	<i>T. mentagrophytes</i> complex, <i>T. schoenleinii</i> , <i>T. verrucosum</i> , <i>T. violaceum</i> <i>T. tonsurans</i> , <i>T. equinum</i>	5’-CTGCGGAAGGATCATTAAC-3’	
		5’-AAGAGATCCGTTGTTGAAAG-3’	
		5’-TTACTCGGTTGCCTC-3’ (BBQ)	FAM
		5’-CAAGGAAAATTCTCTGAAGGGCTG-3’ (BBQ)	CY5
		5’-TTGAGCCGCTATAAAG-3’ (BBQ)	YAK
ITS 2	<i>M. canis</i> , <i>M. audouinii</i> <i>M. ferrugineum</i> , <i>M. audouinii</i> <i>M. canis</i> , <i>M. ferrugineum</i> <i>T. rubrum</i> , <i>T. violaceum</i>	5’-CTGTTTCGAGCGTCATTTTC-3’	
		5’-GGGTATCCCTACCTGATCC-3’	
		5’-CAGTAACCACCCACC-3’ (BBQ)	FAM
		5’-CAATAACCACCCACC-3’ (BBQ)	YAK
		5’-GCCCTGGCCCAATCTTT-3’ (BBQ)	CY5

ITS, internal transcribed spacer; reporter dyes: FAM, 6-carboxy-fluorescein; CY5 (indodicarbocyanine); YAK (Yakima Yellow); BBQ (BlackBerry Quencer)

4. BULGULAR

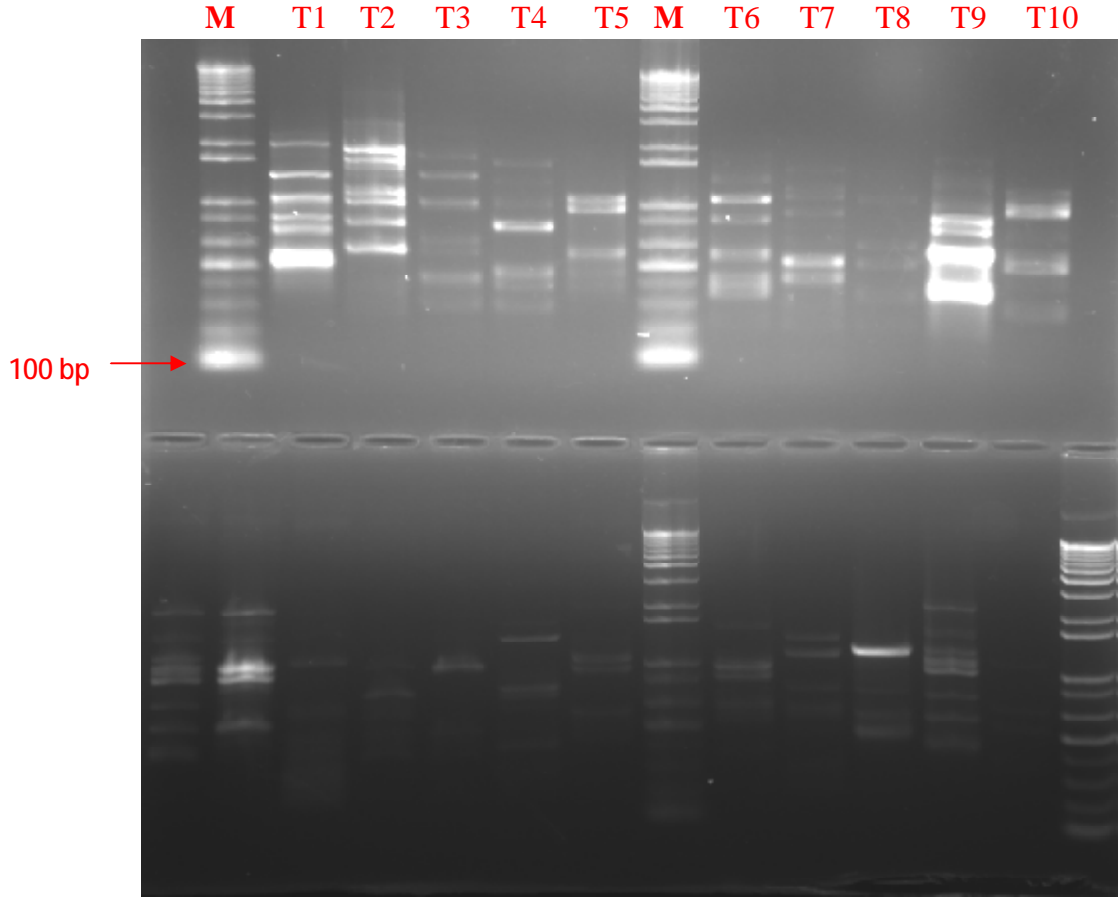
Çalışmada kullanılan 29 klinik izolattın 8 (%28)'i ayak tırnağı, 4 (%14)'ü saçlı deri, 3 (%10.3)'ü ayak parmak arası (APA), 3 (%10.3)'ü ayak tabanı, 2 (%7)'si ayak yan yüzeyi, 2 (%7)'si avuç içi, 2 (%7)'si el üst yüzeyinden, 1 (%3.4)'i bacak, 1 (%3.4)'i el tırnağı, 1 (%3.4)'i gövde, 1 (%3.4)'i göğüs ve 1 (%3.4)'i boyundan izole edildi. İzolatların 20 (%70)'si *T. rubrum*, 4 (%14)'ü *M. canis*, 2 (%7)'si *T. mentagrophytes*, 2 (%7)'si *T. rubrum* var. *raubitschekii* ve 1 (%3.4)'i *T. tonsurans* idi (Tablo 7).

Çalışmada, CBS'den sağlanan 26 standart köken ile 29 klinik izolatta hedef alınan ITS1 ve ITS2 bölgelerine ait primerler ve kısa oligonükleotid dizisine sahip (GACA)₄ primeri, etkinlikleri ve ayırım güçleri PCR ve multipleks Real-Time PCR yöntemi ile çalışıldı. Ayırım gücü yüksek PCR temelli Real-Time PCR'da çalışılan toplam 55 örnek (26 standart köken + 29 klinik izolat) için pozitif ve beklenen sonuçlar vermiştir. Ayrıca, yanlış pozitiflik görülmedi. Her türe ait birer Real-Time PCR sonucu şekil 4.1-4.10 arasında gösterildi. (GACA)₄ ile çalışılan 55 örnekte oluşan bant profillerine göre tür ayırımı kolaylıkla yapılabildi. (GACA)₄ primeri ile RFLP'ye gerek duyulmadan tür düzeyinde tanı kolaylıkla yapılabildi.

Hastalarımıza verilen sonuçlarda geleneksel yöntemler kullanılarak yapılan tür identifikasyonlarının tam bir doğrulukla yapıldığı moleküler yöntemler ile de teyit edilmiş oldu. Ancak, geleneksel yöntemler zamana bağımlı olduğu için sonuçlar 1-4 hafta arasında değişen sürelerde verilmiştir.

Çalışmada hedef aldığımız bölgelere ait (ITS1-ITS2) spesifik primer ve prob dizileri ile moleküler yöntem ile 55 örneğin tür düzeyinde tanıları başarılı olarak yapıldı. Tanıda multipleks real-time PCR'ın ayırım gücü yüksek, kontaminasyon riski az ve kısa sürede sonuç verdiği için tercih edildi ve yine çalışmamıza dahil edilen kısa oligonükleotid dizisine sahip (GACA)₄ primeri, kolay tekrarlayan dizilerden oluşan primer olup 300 ile 2500 bp uzunluğunda, 4-11 arasında değişen bant profilleri ile tek adımda tür ayırımını yapmayı sağladı. PCR-RFLP'den daha kompleks bant profilleri gözlemlendi ve bu profiller doğrultusunda *T. rubrum* olarak tanıya ettiğimiz klinik

izolatlarımız arasındaki genotipik benzerlik ve farklılıkları dendrogram yardımı ile görüntülendi (Tablo 11).



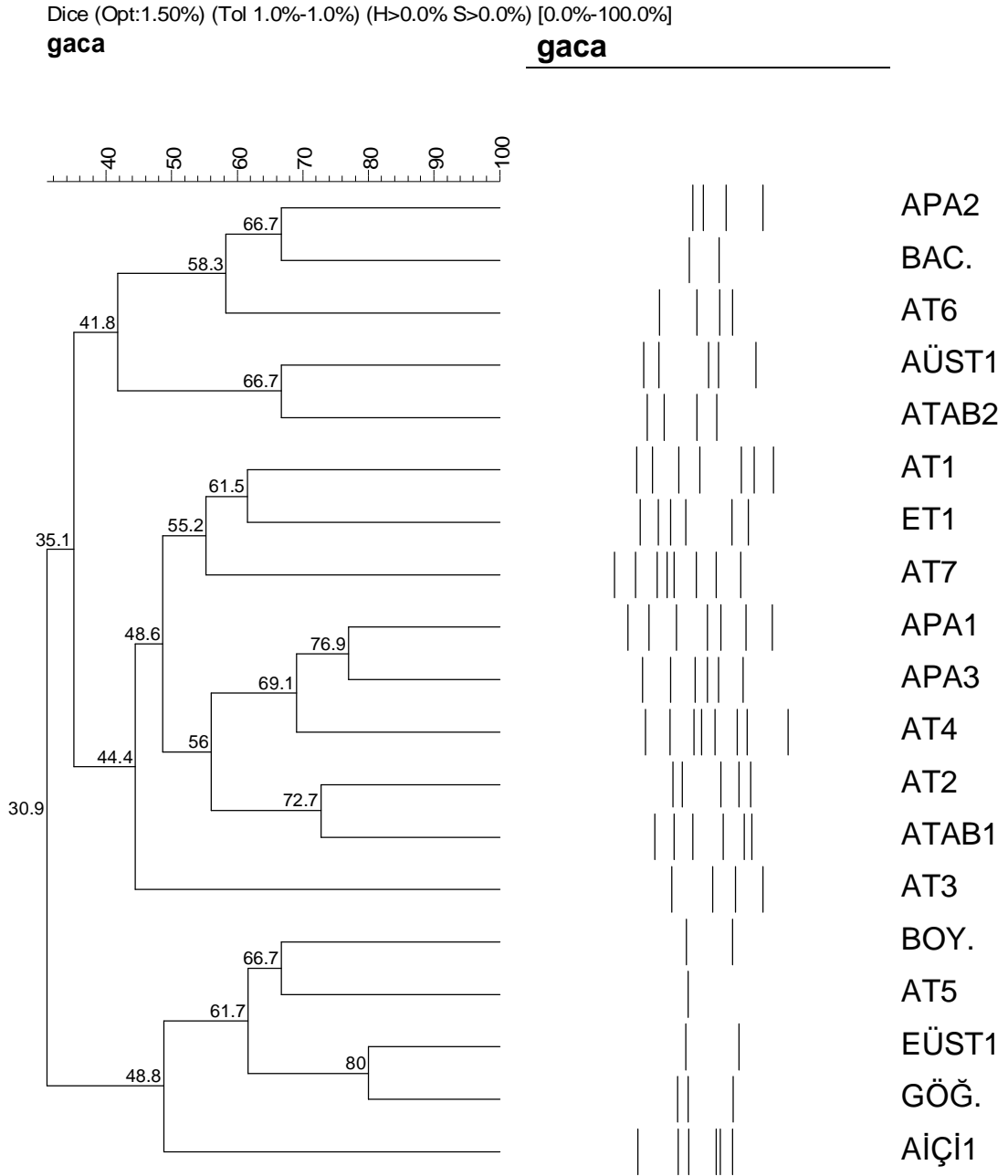
T11 T12 T13 T14 T15 T16 T17 M T18 T19 T20 T21 M

M: DNA ladder (NANOHELIX) (300-2500 bp), T1-21: Farklı hastalardan izole edilen *T. rubrum* suşları.

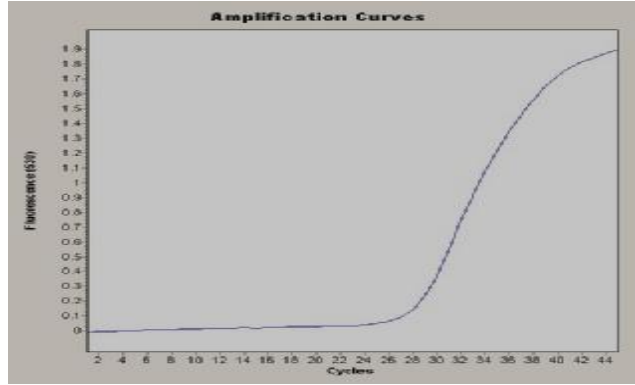
Tablo 10. Çalışmada kullanılan klinik izolatlara ait bilgiler.

Örnek no	Lezyonun bölgesi	Direkt mikroskobi	Mantar kültürü
1	Saçlı deri	+	<i>M. canis</i>
2	Saçlı deri	+	<i>M. canis</i>
3	Saçlı deri	+	<i>M. canis</i>
4	Saçlı deri	+	<i>M. canis</i>
5	Gövde	+	<i>T. tonsurans</i>
6	Ayak yan yüzeyi	+	<i>T. mentagrophytes</i>
7	Ayak tırnak	+	<i>T. mentagrophytes</i>
8	Ayak parmak arası	+	<i>T. rubrum</i>
9	Ayak tırnak	+	<i>T. rubrum</i>
10	Ayak tırnak	+	<i>T. rubrum</i>
11	Ayak tabanı	+	<i>T. rubrum</i>
12	Ayak tırnak	+	<i>T. rubrum</i>
13	El tırnak	+	<i>T. rubrum</i>
14	Ayak tırnak	+	<i>T. rubrum</i>
15	Avuç içi	+	<i>T. rubrum</i>
16	Ayak parmak arası	+	<i>T. rubrum</i>
17	El üst yüzeyi	+	<i>T. rubrum</i>
18	Ayak tırnak	+	<i>T. rubrum</i>
19	Ayak parmak arası	+	<i>T. rubrum</i>
20	Boyun	+	<i>T. rubrum</i>
21	Bacak	+	<i>T. rubrum</i>
22	Ayak tabanı	+	<i>T. rubrum</i>
23	Ayak tırnak	+	<i>T. rubrum</i>
24	Ayak yan yüzey	+	<i>T. rubrum</i>
25	Ayak tabanı	+	<i>T. rubrum</i>
26	Ayak tırnak	+	<i>T. rubrum</i>
27	Göğüs	+	<i>T. raubitschekii</i>
28	El üst yüzeyi	+	<i>T. raubitschekii</i>
29	Avuç içi	+	<i>T. rubrum</i>

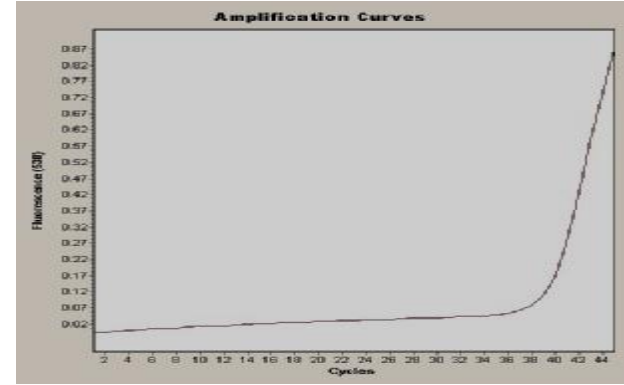
Tablo 11. Klinik örneklerden isole edilen *T. rubrum* suşlarının (GACA)₄ ile dendrogramı



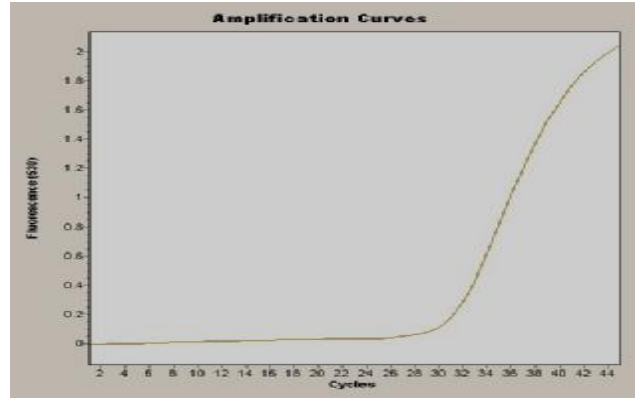
APA: Ayak parmak arası, AT: Ayak tırnak, AÜST: Ayak üst yüzey, ET: El tırnak, EÜST: El üst yüzey, BAC: Bacak, BOY: Boyun, GÖĞ: Göğüs, AiÇi: Avuçiçi



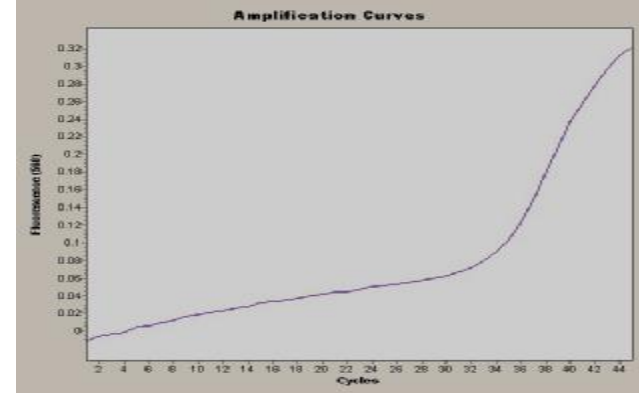
Şekil 8. *Trichophyton verrucosum*



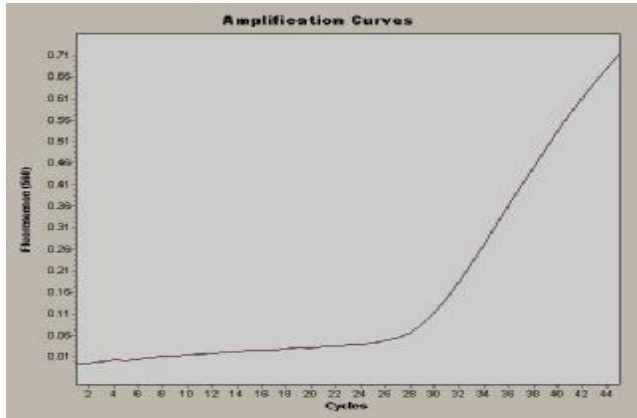
Şekil 9. *Trichophyton violaceum*



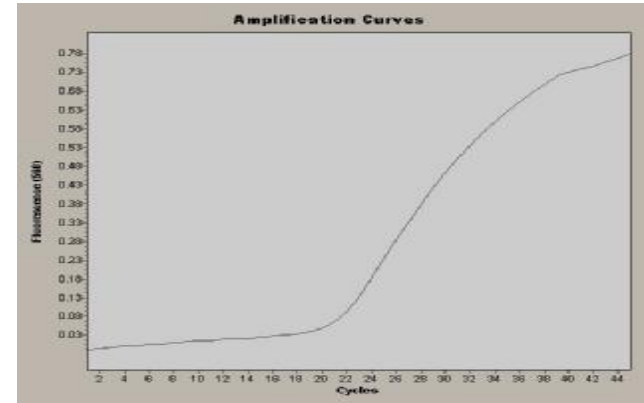
Şekil 10. *Trichophyton schoenleinii*



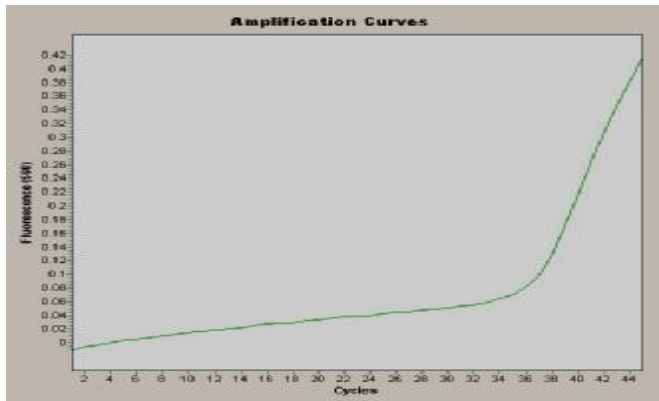
Şekil 11. *Trichophyton concentricum*



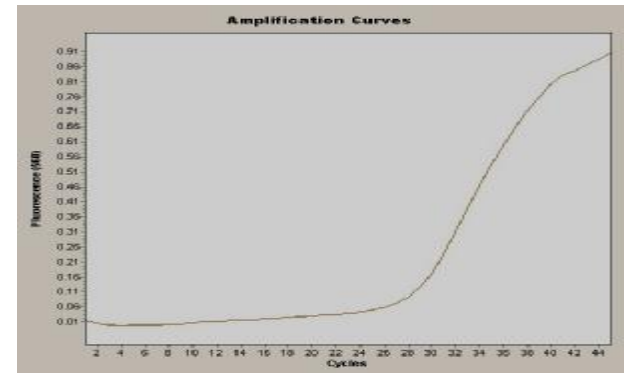
Şekil 12. *Trichophyton tonsurans*



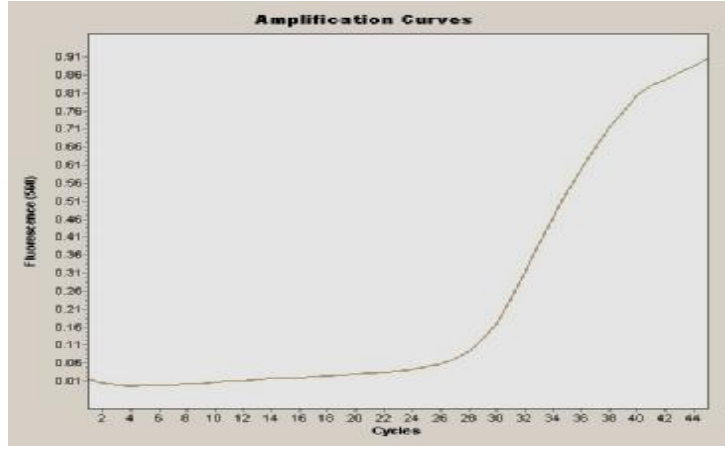
Şekil 13. *Trichophyton mentagrophytes*



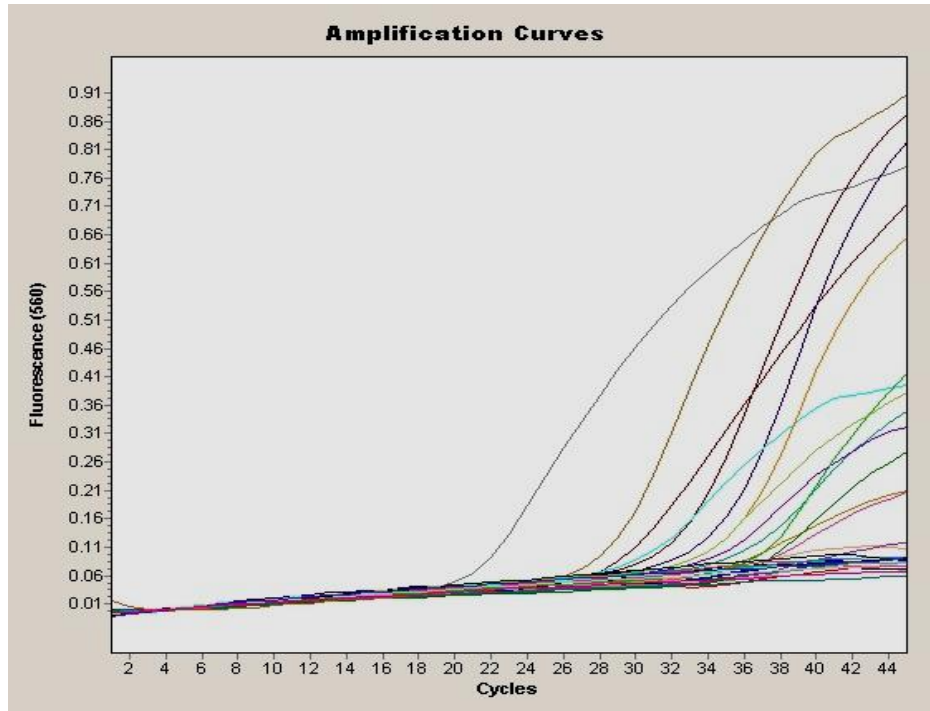
Şekil 14. *Microsporum canis*












Şekil 15. *Microsporum audouinii*



Şekil 16. *Microsporium ferrugineum*



Şekil 17. Şekil 8-16 Real-time PCR ile referans ve klinik izolatların dağılımı.

- | | | |
|---|--|--|
|  <i>Microsporium audouinii</i> |  <i>Trichophyton concentricum</i> |  <i>Trichophyton tonsurans</i> |
|  <i>Microsporium canis</i> |  <i>Trichophyton mentagrophytes</i> |  <i>Trichophyton verrucosum</i> |
|  <i>Microsporium ferrugineum</i> |  <i>Trichophyton schoenleinii</i> |  <i>Trichophyton violaceum</i> |

5. TARTIŞMA

Yüzeysel mantar infeksiyonlarının en sık etkeni olarak izole edilen mikro-organizmalar, hemen daima dermatofit grubu küf mantarlarıdır. Bu keratinofilik mantarların toplam popülasyonun %20'sinde semptomatik ve/veya asemptomatik infeksiyona neden olduğu düşünülmektedir. Kontrol edilebilir veya tedavi edilebilir bir infeksiyon oluşturmalarına karşılık, yüksek oranda bulaşıcı olmaları ve rekürrens göstermeleri nedeni ile tür düzeyinde tanıları tedavi ve profilaksi için, ayrıca epidemiyolojik ve ekolojik verilerin kayıt altına alınması yönünden önemlidir^{2,6,8,10}.

Dermatofitlerin klasik laboratuvar tanısında, en sık ve güvenle kullanılan yöntem eşeysiz büyük sporlarının yani makrokonidyumlarının yapısal özelliğidir^{2,4}. Ancak, genellikle ilk izolasyonlarda makrokonidyum oluşumu görülmez. Bu nedenle, mikro-organizmanın daha iyi sporlanacağı ve mantar elemanlarının daha iyi değerlendirilebileceği bir besiyerine, genellikle patates dekstroz agar'a, pasajlarının yapılması ve değerlendirilmesidir. Ateş ve ark¹⁴. makrokonidyum oluşumunda Beyin-kalp infüzyon agar (BKİA), Malt extract agar (MEA), Löwenstein-Jensen (LJ), Patates Dekstroz agar (PDA), Oat meal agar (OA), Cornmeal dekstroz agar (CMDA), Oxoid kromojenik Candida agar (OCCA) ve Üre agar ve besiyerlerini karşılaştırmış ve makrokonidyum oluşumunda en uygun besiyerinin LJ besiyeri ve sırası ile BKİA, MEA, PDA, OA, OCCA'da ,Üre agar ve CMDA besiyerleri olduğunu belirlemiş ve bu besiyerlerinin rutin mikoloji laboratuvarlarında kullanılabilceğini bildirmişlerdir.

Dermatofitlerin moleküler yöntemlerle tiplendirilmesi; epidemiyolojilerinde, popülasyon biyolojilerinde ve patojenitelerinde yeni bakış açısı sağlayabilmekte, ayrıca bu teknikler sayesinde tür içi varyasyonlar ortaya konulabilmektedir^{9,13,15,20}.

Önemle vurgulamak gerekir ki dermatofit identifikasyonu ile ilgilenen mikoloji laboratuvarlarında, hangi yöntem ile tanımlama yapılacağı daha çok laboratuvarın alt yapısına ve sosyo-ekonomik olanaklarına bağlıdır. PCR temelli yöntemler, geleneksel yöntemlere daha iyi bir alternatif olarak önerilmemekte, başlıca neden olarak da dermatofit türlerinin, özellikle antropofilik türlerin, cins ve türlerine özgü başarılı primer dizaynlarına olanak sağlamaması gösterilmektedir. Diğer taraftan 'altın standart'

olarak kabul edilen ve dermatofitlerin tür düzeyinde identifikasyonu için yeterli polimorfizmi olan rRNA genleri arasındaki internal transcribed dizileri gösterilmiştir^{28,30}. Ek olarak, klinik örneklerden farklı dermatofitik mantarların tanınması ve real-time PCR ile belirlenmesinde öne çıkan iki çalışma yöntemin başarısını kanıtlamakta ve dikkat çekmektedir.

İlk olarak 2007'de Arabatzis ve ark²². dermatofit türlerinin tanısına özelleşmiş real-time PCR testini tasarlamışlardır. Araştırmacılar, dermatofitoz kuşkulu 67 hastadan alınan 92 klinik örneği (deri, tırnak ve saç) çalışmış ve bu örneklerin 40'ı (%43.5) direkt mikroskopide, 30'u (%32.6) mantar kültüründe ve 47'si (%51.1) real-time PCR'da pozitif sonuç vermiştir. Real-time PCR'da pozitif veren örneklerden 7'si mikroskopi ve kültürde negatif bulunmuş ve real-time PCR'ı yüksek pozitif (%95.7) ve negatif (%100) prediktivite değerleri ile daha duyarlı olduğu kanısına varılmıştır. Klinik örneklerden 24 saatten daha kısa sürede tür düzeyinde tanıya gidilebilmiştir.

Bergmans ve ark³⁴. 2010'da internal transcribed dizilerini kullanarak dermatofitlere spesifik tek tüpte real-time PCR yöntemini kullanmış ve bu yöntem ile deri, saç ve tırnak örneklerinde birkaç saat içerisinde *Epidermophyton*, *Microsporum* ve *Trichophyton* cinslerinde yeralan 11 ayrı dermatofit türünü hızlı bir şekilde belirlemişlerdir. 145 klinik örneği ise (36 deri, 2 saç ve 107 tırnak) hem real-time PCR hem de PCR reverse line blot (PCR-RLB) yöntemi ile belirlemiş ve 145 örneğin 133'ü real-time PCR ve PCR-RLB ile uyumlu bulunmuştur. Ayrıca, 6 örnek real-time PCR'da pozitif PCR-RLB'da negatif bulunmuştur. Ancak, 83 pozitif örneğin yalnızca birinde her iki yöntem de uyuşmayan sonuç elde edilmiştir. Çalışılan tek tüp real-time PCR yöntemi deri, tırnak ve saç örneklerinde dermatofitlerin doğrudan belirlenmesi ve identifikasyonunda uygun bir yöntem olduğunu kanıtlamıştır. Kısa sürede (bir gece lysis sonrası 4 saatte) öncül bir PCR analizine ihtiyaç duymadan ve çok duyarlı özgül bir yöntem olduğu belirlenmiştir.

Sugita ve ark³⁵. Amerika, Avrupa ve Japonya'da endemik olan *T. tonsurans*'ın sebep olduğu tinea capitis'in tanısında kültürden bağımsız saç fırçası örneklerinde real-time PCR TaqMan yöntemini ile *T. tonsurans*'ı 5 saat gibi kısa bir süre içerisinde tanımlamışlardır. Yazarlar, 32 judo çalıştırıcısı ve 5 sağlıklı kişiye ait saç örneklerini; (a) saç fırçası ile örneklemiş ve mantar kültürü yapmış, (b) ikinci bir saç fırçası örneği ile

kolay, hızlı ve çok pahalı olmayan real-time TaqMan yöntemi geliştirmiş ve kültür yapmaksızın identifikasyonu başarmışlardır.

Bu çalışmada ise nadiren makrokonidiyum oluşturan dermatofit türleri ile farklı anatomik bölgelerden alınan klinik örneklerden elde edilen dermatofit türlerinden bir koleksiyon oluşturulmuş ve bu mikro-organizmaların mikolojik tanısında ITS1 ve ITS2 bölgelerini hedef alan primerlerin etkinlikleri multipleks real-time PCR yöntemi ile tartışmaya açılmıştır. Bu amaçla, *M. audouinii*, *M. ferrugineum*, *T. concentricum*, *T. schoenleinii*, *T. soudanense*, *T. verrucosum*, *T. violaceum* ve *T. yaoundei* türleri çalışmaya dahil edilmiştir.

Çalışmada kullanılan 55 izolatta geleneksel ve moleküler tanıları birbirlerini desteklemiş, ancak mantar kültür ve geleneksel identifikasyon yöntemi ile doğru, ancak geç sonuç alınmıştır. Klinik izolatlar [20 *T. rubrum*, 4 *M. canis*, 2 *T. mentagrophytes*, 2 *T. raubitschekii* ve 1 *T. tonsurans*] ITS1 ve ITS2 bölgelerine spesifik primer ve prob dizileri ile çalışılan multipleks Real-Time PCR yönteminde, özellikle ITS bölgeleri benzer türlerde multipleks ITS1 bölgesinde *T. mentagrophytes*, *T. schoenleinii*, *T. verrucosum*, *T. violaceum* ve *T. tonsurans* türlerinin varlığına ait eğriler elde edilmiştir. ITS2 bölgesinde ise *Microsporum* türüne ait *M. audouinii*, *M. ferrugineum* ve *M. canis* türlerine ait eğriler elde edilmiştir (Şekil 14-16). Nadiren makrokonidiyum üreten türlere ait eğrilerde de real-time PCR yönteminin tür düzeyinde tanıya yardımcı olabileceği sonuçlar doğrultusunda görülmüştür. Çalışmamızın önemli sonuçlarından birisi de literatürde ilk kez 12 dermatofit türünün real-time PCR yöntemi ile ayırt edilmiş olmasıdır.

PCR'da kullanılan (GACA)₄ primeri 55 örnekte en az real-time PCR'daki kadar etkili ayırım gücü göstermiştir. PCR-RFLP'ye gerek duymadan tür düzeyinde tanıya yardımcı olmuştur. Elde edilen bant profilleri PCR-RFLP'ki kadar kompleks olup etkili bir ayırım sağlamıştır. Çalışmamızda, real-time PCR yöntemi *M. canis*, *T. rubrum* ve *T. tonsurans* gibi türlerin tanısında pratik önemi olmasına karşılık pahalı bulunmuş, ancak tanısı güç olan ve ender olarak makrokonidiyum oluşturan türler için uygulanabilir bir yöntem olarak kabul edilmiştir.

Sonuç olarak, real-time PCR dermatofitlerin tanısında ve özellikle ender makrokonidiya oluşturan ve bu nedenle geç ve güç tanınan türlerin identifikasyonunda yüksek derecede duyarlı ve özgül bulunmuştur. Yine önemli bir bulgu olarak tür

identifikasyonunda çelişkili sonuç elde edilmediği dikkate değerdir. Testin bir diğer avantajı da identifikasyon süresini hızlandırması ve bir iş günü içerisinde kesin tanı sürecini tamamlamasıdır. Test pahalı olmasına karşılık, rutin mikoloji laboratuvarları için çabuk, güvenilir ve kolay uygulanabilir bulunmuştur.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmada, Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS), Utrecht, Hollanda'dan sağlanan 26 standart köken ve 29 klinik izolat kullanıldı. Bu araştırmada 12 farklı türü temsil eden toplam 55 izolat hem geleneksel hem de moleküler yöntemler ile çalışıldı. Moleküler çalışmada, SGA'da üretilen izolatlardan DNA ekstraksiyonu yapıldı, sonra sırası ile PCR ve real-time PCR yöntemleri uygulandı.

1. Geleneksel yöntemler ile mantar kültürü ve identifikasyon yapılan klinik örneklerden *M. canis*, *T. mentagrophytes*, *T. rubrum*, *T. rubrum* var. *raubitschekii* ve *T. tonsurans* izole edildi. Ancak geleneksel yöntemler ile koloninin gelişmesi ve belirgin morfolojik özelliklerinin uzun süreye gereksinim duyması sebebiyle tür düzeyinde tanı öngörüldüğü gibi 1-4 hafta arasında yapılabilirdi. Ayrıca, altın standart olarak kabul görseler de moleküler yöntemlerin; dış faktörlerden kolayca etkilenmeleri (sıcaklık değişimi, ortam farklılığı ve ilaç tedavisi) ve kontaminasyona yatkın olmalarına karşılık, bu sorunları en aza indirip tür düzeyinde tanı kolaylık sağladığı ve çabuk sonuç alınabildiği görüldü. Çalışmada, geleneksel yöntemler ile moleküler temelli yöntemi uyumu tam (%100) bulunmuştur.
2. Nadiren makrokonidiyum üreten ve bu sebeple güç tanınan (*M. audouinii*, *M. ferrugineum*, *T. concentricum*, *T. schoenleinii*, *T. soudanense*, *T. verrucosum*, *T. violaceum* ve *T. yaoundei*) türlerinden bir koleksiyon oluşturuldu ve bu türlere ilişkin 26 standart köken çalışmaya dahil edildi. Klinik ve standart suşlar, ITS1 ve ITS2 bölgeleri hedef alınarak dizayn edilen primer ve prob dizileri ile real-time PCR çalışıldı. Çalışma sonunda elde edilen eğriler ile mikro-organizmaların ayırımı kolay ve hızlı bir şekilde yapılabilirdi. Real-time PCR'ın kontaminasyon riskinin az oluşu, tekrarlanabilir olması, öncü PCR yapmayı gerektirmemesi ve ayırım gücünün yüksek olması sebebi ile ve alt yapı uygun olduğu sürece, emek ve zamandan kazanç sağladığı, ancak maliyeti yüksek bir yöntem olduğu belirlendi.
3. Çalışmada yer alan 55 izolat kısa oligonükleotid dizisine sahip (GACA)₄ primeri kullanılarak yapılan PCR'da primerin ayırım gücünün yüksek olduğu her türü

kolaylıkla ayırabildiği ve RFLP'ye gerek duymadan kompleks bantlar elde edilebileceği kanısına varıldı.

4. Çalışmada, (GACA)₄, ITS1 ve ITS2 bölgelerini hedef aldığımız primerlerin ayırım güçlerinin yüksek olduğu ve dermatofitlerde tanı ve identifikasyon amaçlı çalışmalarda kullanılmalarının yarar sağlayacağı belirlendi.
5. Sonuç olarak, yukarıda bahsedilen hem geleneksel hem de moleküler yöntemlerin tanıya sağladıkları katkı karşılaştırıldığında; yüksek oranda sensitif ve spesifik oldukları, ancak yüksek maliyet gibi dezavantajlarının da olduğu görülmüştür. Esasen temel sorun, tanıda hangi yöntem(ler)in kullanılması ile dermatofit identifikasyonun da kesin, çabuk, kolay ve tekrar edilebilir sonuçlara ulaşılacağıdır. Bu soruya en gerçekçi yanıtın, her laboratuvara göre değişken olabileceği, alt yapı ve sosyo-ekonomik koşullar göz önünde bulundurularak bir yol izlenmesi gerektiği düşünülmüştür.

KAYNAKLAR

1. **Summerbell RC, Kane J.** The genera *Trichophyton* and *Epidermophyton*. In: Kane J, Summerbell R, Sigler L, Kraiden S, Land G, Eds. *Laboratory Handbook of Dermatophytes: A Clinical Guide and Laboratory Manual of Dermatophytes and Other Filamentous Fungi From Skin, Hair and Nails*. Belmont, CA: Star Publishing Company, **1997**: 131-193.
2. **Padhye AA, Summerbell RC.** The dermatophytes. In: Hay R, Merz W, Eds. *Topley and Wilsons Microbiology and Microbial Infections. Mycology*, Vol 5, 10th edn. London: Arnold, **2005**: 220-243.
3. **Weitzman I, Summerbell RC.** The dermatophytes. *Clin Microbiol Rev*, **1995**; 8:240-259.
4. **Tümbay E.** *Pratik Tıp Mikolojisi*. İzmir: Bilgehan Basımevi, **1983**: 7-190.
5. **Elewski B, Hazen PG.** The superficial mycoses and the dermatophytes. *J Am Acad Dermatol*, **1989**; 21:655-673.
6. **Tümbay E.** Dermatofitler. In: Topçu-Willke A, Söyletir G, Doğanay M, Eds. *İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, **2002**: 1785-1796.
7. **Gräser Y, el Fari M, Presber W, Sterry W, Tietz HJ.** Identification of common deratophytes (*Trichophyton*, *Microsporum*, *Epidermophyton*) using polymerase chain reactions. *Br J Dermatol*, **1998**; 138:576-582.
8. **Faggi E, Pini G, Campisi E, Bertellini C, Difonzo E, Mancianti F.** Application of PCR to distinguish common species of dermatophytes. *J Clin Microbiol*, **2001**; 39: 3382-3385.
9. **Gräser Y, Kuijpers AFA, El Fari M, Presber W, de Hoog GS.** Molecular and conventional taxonomy of the *Microsporum canis* complex. *Med Mycol*, **2000**; 38: 143-153.
10. **Rippon JW.** *Medical Mycology*. 3rd ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company, Harcourt Brace Jovanovich, Inc.; **1988**; 169-275.
11. **Turin L, Riva F, Galbiati G, Cainelli T.** Fast, simple and highly sensitive double-rounded polymerase chain reaction assay to detect medically relevant fungi in dermatological specimens. *Eur J Clin Invest*, **2000**; 30: 511-518.
12. **İlkit M, Saraçlı MA, Yuksel T.** *Trichophyton rubrum* with the *'raubitschekii* morphotype: the first report from Turkey. *Mycopathologia*, 2011; **171**: 119-122.
13. **Jackson CJ, Mochizuki T, Barton RC.** PCR fingerprinting of *Trichophyton mentagrophytes* var. *interdigitale* using polymorphic subrepeat loci in the rDNA nontranscribed spacer. *J Med Microbiol*, **2006**; 55: 1349-1355.
14. **Ateş A, Özcan K, İlkit M.** Diagnostic value of morphological, physiological and biochemical tests in distinguishing *Trichophyton rubrum* from *Trichophyton mentagrophytes* complex. *Med Mycol*, **2008**; 46: 811-822.
15. **Barry L. Hainer, M.D.** Dermatophyte Infections. *Am Fam Physician*, **2003**; 67:101-108.

16. **Dahdah MJ, MD, Richard K. Scher, MD.** Dermatophytes. *Curr Fungal Infection Rep*, **2008**; 2: 81-86.
17. **El Fari M, Gräser Y, Presber W, Tietz J.** An epidemic of tinea corporis caused by *Trichophyton tonsurans* among children (wrestlers) in Germany. *Mycoses*, **1999**; 43: 191-196.
18. **Durmaz R.** Polimeraz zincir reaksiyonunun tipleri. *Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji*. 2. Baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitap Evleri; **2001**. s. 35-43.
19. **Temizkan G, Arda N.** DNA'nın Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile çoğaltılması. *Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler*. 2. Baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitap Evleri, **2004**. s. 101-120.
20. **Faggi E, Pini G, Campisi E, Bertellini C, Difonzo E, Mancianti F.** Amplication of PCR to Distinguish Common Species of Dermatophytes. *J Clin Microbiol*, **2001**; 39: 3382-3385.
21. **Shehata AS, Mukherjee PK, Aboulatta HN, Akhras AIE, Abbadi SH, Ghannoum MA.** Single Step PCR Using (GACA)₄ Primer: Utility for Rapid Identification of Dermatophyte Species and Strains. *J Clin Microbiol*, **2008**; 46: 2641-2645.
22. **Arabatzis M, Bruijnesteijn van Coppenraet LES, Kuijper EJ.** Diagnosis of common dermatophyte infections by a novel multiplex real-time polymerase chain reaction detection/identification scheme. *Br J Dermatol* **2007**; 157: 681-689.
23. **Makimura K, Mochizuki T, Hasegawa A, Uchida K.** Phylogenetic classification of *Trichophyton mentagrophytes* complex strain based on DNA sequenses of nuclear ribosomal internal transcribed spacer 1 region. *J Clin Microbiol* **1998**; 36: 2629-2633.
24. **Brasch J, Gräser Y.** *Trichophy eboreum* sp. nov. Isolated from Human Skin. *J Clin Microbiol* **2005**; 43: 5230-5237.
25. **Edwards K, Logan J, Saunders N.** Real-time PCR essential guide. *Genomics proteomics and Bioinformatics Unit, specialist and Reference Microbiology Division Health Protection Agency*. London, **2004**.
26. **Gräser Y, Scott J, Summerbell R.** The new species concept in dermatophyte- a polyphasic approach. *Mycopathologia* **2008**; 166: 239-256.
27. **Weinstein A, Berman B.** Topical treatment of common superficial tinea infections. *Am Fam Physician* **2002**; 65: 2095-2102.
28. **Ohst T, Presber W, Stavrakieva V, Gräser Y.** Origins of microsatellite diversity in the *Trichophyton rubrum*-*T. violaceum* Clade (Dermatophytes). *J Clin Microbiol* **2004**; 42: 4444-4448.
29. **Seebacher C, Bouchara PJ, Mignon B.** Updates on the epidemiology of dermatophyte infections. *Mycopathologia* **2008**; 166: 335-352.
30. **Borman A, Campbell CK, Fraser M, Johnson EM.** Analysis of the dermatophyte species isolated in the British Isles between 1980 and 2005 and review of worldwide dermatophyte trends over the last three decades. *Med Mycol* **2007**; 45: 131-141.
31. **Tekeli A, Ustaçelebi Ş.** Real-Time PCR. *Moleküler Mikrobiyoloji: Tanı Prensipleri ve Uygulamalar*. Ankara: Palme Yayıncılık, 2004. s. 71-84.
32. **Hay RJ, Jones RM.** New molecular tools in the diagnosis of superficial fungal infections. *Clin Dermatol*, **2010**; 28: 190-196.

33. **Abdel-Rahman SM, Sugita T, Arabatzis M, Ellis D, Hiruma M.** Divergence among an international population of *Trichophyton tonsurans* isolates. *Mycopathologia*, **2010**; 169: 1-13.
34. **Bergmans AMC, Klaassen A, Böhm N.** Evaluation of a single-tube real-time PCR for detection and identification of 11 dermatophyte species in clinical material. *Clin Microbiol Infect*, **2010**; 16: 704-710.
35. **Sugita T, Shiraki Y, Hiruma M.** Real-time PCR TaqMan assay for detecting *Trichophyton tonsurans*, a causative agent of tinea capitis, from hairbrushes. *Med Mycol*, **2006**; 44: 579-581.
36. **Abdel-Rahman SM.** Strain differentiation of dermatophytes. *Mycopathologia*, **2008**; 166: 319-333.
37. **Mochizuki T, Tanabe H, Kawasaki M, Ishizaki H.** Rapid identification of *Trichophyton tonsurans* by PCR-RFLP analysis of ribosomal DNA regions. *J Dermatol Sci*, **2003**; 32: 25-32.
38. **Roque HD, Vieira R, Rato S, Martins ML.** Specific primers for rapid detection of *Microsporum audouinii* by PCR in clinical samples. *J Clin Microbiol*, **2006**; 44: 4336-4341.
39. **Mirzahoseini H, Omidinia E, Ghahfarokhi MS, Sadeghi G, Abyaneh MR.** Application of PCR-RFLP to rapid identification of the main pathogenic dermatophytes from clinical specimens. *Iranian J Publ Health*, **2009**; 38: 18-24.
40. **Kanbe T, Suzuki Y, Kamiya A, Mochizuki T.** Species-identification of dermatophytes *Trichophyton*, *Microsporum* and *Epidermophyton* by PCR and PCR-RFLP targeting of the DNA topoisomerase II genes. *J Dermatol Science*, **2003**; 33: 41-54.
41. **Kamiya A, Kikuchi A, Tomita Y, Kanbe T.** PCR and PCR-RFLP techniques targeting the DNA topoisomerase II gene rapid clinical diagnosis of the etiologic agent of dermatophytosis. *J Dermatol Sci*, **2004**; 34: 35-48.
42. **Kardjeva V, Summerbell R, Kantardjiev T, Devliotou D, Sotiriou E, Gräser Y.** Forty-eight-hour diagnosis of onychomycosis with subtyping of *Trichophyton rubrum* strains. *J Clin Microbiol*, 2006; 44: 1419-1427.
43. **Achterman R, Smith AR, Oliver B, White TJ.** Sequenced dermatophyte strains: Growth rate, conidiation, drug susceptibilities, and virulence in an invertebrate model. *Fungal Gen Biol*, **2010** (Baskıda).
44. **Ilkit M, Saraçlı MA, Kurdak H, Turaç-Biçer A, Yüksel T, Karakaş M, Schuenemann E, Abdel-Rahman S.** Clonal outbreak of *Trichophyton tonsurans* tinea capitis gladiatorum among wrestlers in Adana, Turkey. *Med Mycol*, **2010**; 48: 480-485.
45. Erişim: www.bio.davidson.edu.
46. Erişim: www.genetiklab.com.
47. Erişim: www.dorak.info/genetics/realtime.
48. **Mochizuki T, Kawasaki M, Tanabe H, Anzawa K, Ishizaki H.** Molecular epidemiology of *Trichophyton tonsurans* isolated in Japan using RFLP analysis of non-transcribed spacer region of ribosomal RNA genes. *Jpn J Infect Dis*, **2007**; 60: 188-192.
49. **Faggi E, Pini G, Campisi E.** PCR fingerprinting for identification of common species of dermatophytes. *J Clin Microbiol*, **2002**; 40: 4804-4805.
50. **Kanbe T.** Molecular approaches in diagnosis of dermatophytosis. *Mycopathologia*, **2008**; 166: 307-317.

51. **White TC, Oliver BG, Gräser Y, Henn MR.** Generating and testing molecular hypotheses in the dermatophytes. *Euk Cell*, **2008**; 7: 1238-1245.
52. **Gaedigk A, Gaedigk R, Abdel-Rahman S.** Genetic heterogeneity in the rRNA gene locus of *Trichophyton tonsurans*. *J Clin Microbiol*, **2003**; 41: 5478-5487.
53. **Gräser Y, Kuijpers AFA, Presber W, De Hoog GS.** Molecular taxonomy of *Trichophyton mentagrophytes* and *T. tonsurans*. *Med Mycol*, **1999**; 37: 315-330.
54. **Abdel-Rahman SM, Talib N, Solidar A, Noppers A.** Examining *Trichophyton tonsurans* genotype and biochemical phenotype as determinants of disease severity in tinea capitis. *Med Mycol*, **2008**; 46: 217-223.
55. **Garg J, Tilak R, Singh S, Gulati AK, Garg A, Prakash P.** Evaluation of pan-dermatophyte nested PCR in diagnosis of onychomycosis. *J Clin Microbiol*, **2007**; 45: 3443-3445.
56. **Baeza CL, Matsumoto MT, Almedia AMF, Mendes-Giannini MJS.** Strain differentiation of *Trichophyton rubrum* by randomly amplified polymorphic DNA and analysis of rDNA nontranscribed spacer. *J Med Microbiol*, **2006**; 55: 429-436.
57. **Abdel-Rahman S, Preuett B, Gaedigk A.** Multilocus genotyping identifies infections by multiple strains of *Trichophyton tonsurans*. *J Clin Microbiol*, **2007**; 45: 1949-1953.
58. **Cenis JL.** Rapid extraction of fungal DNA for PCR amplification. *Nuc Acid Res*, **1992**; 20: 2380.
59. **Robert R, Pihet M.** Conventional methods for the diagnosis of dermatophytosis. *Mycopathologia* **2008**; 166 (5-6): 295-306.
60. **Uchida T, Makimura K, Ishihara K, Goto H, Tajiri Y, Okuma M, Fujisaki R.** Comparative study of direct polymerase chain reaction, microscopic examination and culture-based morphological methods for detection and identification of dermatophytes in nail and skin samples. *J Dermatol*, **2009**; 36: 202-208.

ÖZGEÇMİŞ

Ünye/Ordu'da 1983'de dünyaya geldim. İlk, orta ve lise eğitimimi Niğde'de tamamladım. Çukurova Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünü 2002'de kazandım. Mezun olduktan sonra 1 yıl öğretmenlik yaptım. Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans eğitimine 2007'de başladım.