

ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**DERMATOFİTOZLARIN TANISINDA
MOLEKÜLER YÖNTEMLERİN
KULLANILMASI**

UZMANLIK TEZİ

DR. YASİN TIRYAKI

DANIŞMAN

Yrd. Doç. Dr. Berna GÜLTEKİN

AYDIN – 2011

Bu araştırma Bilimsel Araştırma Projesi kapsamında ADÜ Araştırma Fon

Saymanlığı tarafından TPF-10010 sayı ile desteklenmiştir.

TEŞEKKÜR

Tezimin fikir aşamasından sonuçlanmasına kadarki süreçte bilimsel tecrübesini ve birikimini benden esirgemeyen danışman hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Berna GÜLTEKİN'e sonsuz şükranlarımı sunarım. Uzmanlık eğitimim boyunca bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan Anabilim Dalı Başkanımız çok değerli hocam Sayın Prof. Dr. Neriman AYDIN'a, Mikrobiyoloji alanında yetişmemdeki emeklerinden dolayı Doç. Dr. Mete EYİĞÖR'e, Doç. Dr. Bülent BOZDOĞAN'a, Doç. Dr. Sevin KIRDAR'a, Yrd. Doç. Dr. Murat TELLİ'ye, tez çalışmam süresince desteklerini hissettiğim Adnan Menderes Üniversitesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı çalışanlarına teşekkür ederim.

Çalışmanın örnek toplama aşamasındaki yardımlarından dolayı Aydın Devlet Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarında görev yapan Uzm. Dr. Selda ULUUTKU'ya ve Uzm. Dr. Cavide SARI'ya, Dermatoloji Bölümünde görev yapan Uzm. Dr. Coşkun DENİZ'e ve Uzm. Dr. İhsan KAYNAR'a teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Son olarak tez çalışması sırasında varlıkları ile bana güç veren sevgili aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışmanın insanlığa faydalı olması dileği ile...

Dr. Yasin TİRYAKI

Aydın, 2011

İÇİNDEKİLER

| | Sayfa no |
|--------------|----------|
| TEŞEKKÜR | II |
| TABLO DİZİNİ | VI |
| RESİM DİZİNİ | VII |
| ŞEKİL DİZİNİ | VIII |
| KISALTMALAR | IX |

BÖLÜM I

| | |
|---|----|
| GİRİŞ VE AMAÇ | 1 |
| GENEL BİLGİLER | 3 |
| Tarihçe | 3 |
| Mantarların Yapıları ve Üreme özellikleri | 3 |
| Dermatofitlerin Sınıflandırması | 5 |
| Ekolojik Gruplama | 6 |
| Fiziksel-Kimyasal Etkenlere ve Dış Ortam Koşullarına Karşı Direnç | 7 |
| Risk Faktörleri | 8 |
| Epidemiyoloji | 8 |
| <i>Epidermophyton</i> cinsi | 8 |
| <i>Tricophyton</i> cinsi | 9 |
| <i>Microsporum</i> cinsi | 13 |
| Dermatofitozlarda İmmünoloji ve Patogenez | 14 |
| Klinik | 17 |
| Tinea kapitis | 17 |
| Tinea korporis | 17 |
| Tinea inguinalis | 18 |
| Tinea pedis ve tinea manum | 18 |
| Tinea unguium | 18 |
| Tinea barbae | 18 |
| Dermatofitid | 18 |

| | |
|--|----|
| Laboratuvar Tanı | 19 |
| Örnek alınması | 19 |
| Direkt mikroskopik inceleme | 19 |
| Mantar kültürü | 20 |
| Suşların identifikasyonu ile ilgili testler | 21 |
| <i>In-vitro</i> kıl delme testi | 21 |
| Üre hidrolizi deneyi | 21 |
| Pirinçli besiyerinde üreme | 21 |
| Bromcresol purple-milk solids-glucose medium (BCP-MS-G)'da üreme | 22 |
| Özel besin ve vitamin gereksinimi | 22 |
| Isı tolerans deneyi | 22 |
| Moleküler tanı yöntemleri | 23 |
| Antifungal Duyarlılık Testleri | 25 |
| Dermatofitozlarda Tedavi | 25 |

BÖLÜM II

| | |
|--------------------------------------|----|
| GEREÇ VE YÖNTEM | 26 |
| Kimyasal Ayıraçlar ve Besiyerleri | 26 |
| Kalite Kontrol Suşları | 28 |
| Olguların Seçimi | 28 |
| Örnek Alınması | 28 |
| Direkt Mikroskopik İnceleme | 29 |
| Mantar Kültürü | 29 |
| Laktofenol Pamuk Mavisi İle İnceleme | 29 |
| Üreaz Testi | 29 |
| <i>In-vitro</i> Kıl Kelme Testi | 30 |
| Moleküler Testler | 30 |
| DNA ekstraksiyonu | 30 |
| Klinik örneklerden DNA ekstraksiyonu | 30 |
| Kültürlerden DNA ekstraksiyonu | 30 |

| | |
|-----------------------------------|----|
| Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) | 31 |
| Dizi analizi | 34 |
| İstatistiksel Analiz | 35 |

BÖLÜM III

| | |
|-----------------|----|
| BULGULAR | 36 |
|-----------------|----|

BÖLÜM IV

| | |
|------------------|----|
| TARTIŞMA | 53 |
| SONUÇ | 59 |
| ÖZET | 60 |
| SUMMARY | 62 |
| KAYNAKLAR | 64 |

TABLO DİZİNİ

Tablo I: Dermatofit türlerinin bilinen telemorfik şekilleri

Tablo II: Dermatofitlerin ekolojik özelliklerine göre gruplandırılması

Tablo III: Polimeraz zincir reaksiyonu şartları

Tablo IV: Örneklerin alındıkları bölgelere göre dağılımı

Tablo V: Örneklerin direkt mikroskopi ve kültür sonuçlarının karşılaştırılması

Tablo VI: Örneklerin direkt mikroskopik inceleme sonuçları ile pan-dermatofit nested PZR ve *T. rubrum/T. mentagrophytes*-spesifik nested PZR sonuçlarının karşılaştırılması

Tablo VII: Örneklerin mantar kültürü sonuçları ile pan-dermatofit nested PZR ve *Trichophyton rubrum/T. mentagrophytes*-spesifik nested PZR sonuçlarının karşılaştırılması

Tablo VIII: Kültürde üreyen suşların morfolojik inceleme ve fenotipik identifikasyon sonuçları

Tablo IX: Pan-dermatofit nested PZR ile *T. rubrum/ T. mentagrophytes*-spesifik nested PZR sonuçlarının karşılaştırılması

Tablo X: Deri ve tırnak örneklerinin direkt mikroskopik inceleme, kültür ve PZR sonuçlarının karşılaştırılması

Tablo XI: Örneklerin direkt mikroskopik inceleme, kültür ve PZR sonuçları

RESİM DİZİNİ

- Resim 1:** *Epidermophyton floccosum* koloni yüzeyi (A), koloni tabanı (B) ve mikroskopik görünümü (C)
- Resim 2:** *Trichophyton rubrum* koloni yüzeyi(A), koloni tabanı (B) ve mikroskopik görünümü(C)
- Resim 3:** *Trichophyton mentagrophytes* koloni yüzeyi(A), koloni tabanı (B) ve mikroskopik görünümü(C)
- Resim 4:** *Microsporum canis* koloni yüzeyi(A), koloni tabanı (B) ve mikroskopik görünümü(C)
- Resim 5:** *In-vitro* kıl delme testi
- Resim 6:** KOH ile hazırlanmış preperatta hif yapıları (20 nolu örnek) (x40 büyütme objektif).
- Resim 7:** Mantar kültüründe üremiş olan bazı dermatofit suşları (44, 67, 95, 100, 106, 107, 111 no'lu suşlar).
- Resim 8:** Selofan bant yöntemi ile hazırlanmış preparatın mikroskopik görünümü, 20 no'lu suş (x40 büyütme objektif).
- Resim 9:** Selofan bant yöntemi ile hazırlanmış preparatın mikroskopik görünümü, 88 no'lu suş (x40 büyütme objektif).
- Resim 10:** 6, 12 ve 20 no'lu suşların üreaz testi (12 no'lu suş üreaz pozitif).
- Resim 11:** Dermatofit agarda üreyen 100 no'lu suşun koloni görünümü
- Resim 12:** Klinik örneklerin pan-dermatofit nested PZR sonuçları.
- Resim 13:** Klinik örneklerin *T. rubrum*/*T. mentagrophytes*-spesifik nested PZR sonuçları
- Resim 14:** Klinik örneklerden bazılarının GA3PD PZR sonuçları.
- Resim 15:** 88 nolu suş (*T. mentagrophytes*) dizi analizi elektroferogramı
- Resim 16:** 18 nolu suş (*T. rubrum*) dizi analizi elektroferogramı

ŞEKİL DİZİNİ

- Şekil 1:** Mantar hücre duvarının şematik görünümü
- Şekil 2:** Küf ve mayada hücre yapısı
- Şekil 3:** Hif yapısı
- Şekil 4:** Mikronidyum ve makrokonidyumların şematik görünümü
- Şekil 5:** *Trichophyton rubrum* kompleks'te yer alan türler
- Şekil 6:** *Trichophyton mentagrophytes* kompleks
- Şekil 7:** Derinin anatomik görünümü
- Şekil 8:** Dermatofitler tarafından salgılanan proteolitik enzimlerin infeksiyon sürecindeki rolü
- Şekil 9:** Dermatofitlerin ribozomal DNA (rDNA) bölgesi

KISALTMALAR

| | | |
|----------|---|--|
| ABD | : | Amerika Birleşik Devletleri |
| SDA | : | Sabouraud dekstroz agar |
| PDA | : | Patates dekstroz agar |
| DTM | : | Dermatofit test besiyeri |
| BCP-MS-G | : | Bromcresol purple-milk solids-glucose besiyeri |
| KOH | : | Potasyum hidroksit |
| NaOH | : | Sodyum hidroksit |
| DMSO | : | Dimetilsülfoksit |
| EDTA | : | Etilendiamin tetra asetik asit |
| ITS | : | Internal transcribed spacer |
| ETS | : | External transcribed spacer |
| NTS | : | Nontranscribed spacer |
| rDNA | : | Ribozomal DNA |
| rRNA | : | Ribozomal RNA |
| mt DNA | : | Mitokondrial DNA |
| PZR | : | Polimeraz zincir reaksiyonu |
| RFLP | : | Restriction fragment length polymorphism |
| AP-PZR | : | Arbitrarily primed PZR |
| RAPD | : | Random amplified polymorphic DNA |
| TBE | : | Tris-borik asit- etilendiamintetraasetikasit |
| SLS | : | Sample loading solution |
| RSHMB | : | Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı |
| RSKK | : | Refik Saydam Ulusal Tıp Kültür Koleksiyonu |
| CHS1 | : | Kitin sentaz 1 |

BÖLÜM I

GİRİŞ VE AMAÇ

Dermatofitler, saç, deri ve tırnak gibi keratin içeren dokularda infeksiyon oluşturma yeteneğine sahip özelleşmiş bir grup küf mantarlarıdır (1). Dermatofitlerin insanlarda ve hayvanlarda oluşturdukları infeksiyonlara dermatofitoz adı verilir (2). Dermatofitoz, tüm dünyada yaygın ve sık olarak görülen infeksiyonlar arasında yer almaktadır (3).

Dermatofitler *Epidermophyton*, *Microsporum* ve *Trichophyton* olmak üzere üç anamorfik cinste sınıflandırılır (4). Bu üç cins içinde yaklaşık 40 tür bulunmaktadır (5). Bazı türlerin görülme sıklığı coğrafi bölgelere göre farklılık göstermektedir. Örneğin *Trichophyton rubrum* dünyanın hemen her bölgesinde görülürken, *T. concentricum* yalnızca Pasifik Adaları, Güneydoğu Asya, Orta ve Güney Amerika'da bulunur (6).

Dermatofitlerin oluşturduğu infeksiyona dermatofitoz, oluşan lezyonlara tinea adı verilir. Dermatofitozlar yerleştikleri vücut bölgelerine göre adlandırılırlar (tinea capitis, tinea barbae, tinea corporis, tinea inguinalis, tinea pedis, tinea unguium) (7). Ülkemizde yapılan çeşitli çalışmalarda, en sık görülen dermatofitozun tinea pedis, en sık saptanan dermatofit türünün *T. rubrum* olduğu, bunu *T. mentagrophytes*'in izlediği bildirilmiştir (8-12).

Dermatofitozların laboratuvar tanısında rutin olarak direkt mikroskopik inceleme ve kültür yöntemleri kullanılmaktadır. Direkt mikroskopik incelemenin duyarlılığı kültüre göre daha yüksek olsa da bu yöntemde yalancı negatif sonuç alınabilmesi ve tür tayininin yapılamaması gibi dezavantajlar bulunmaktadır (13). Dermatofitlerin kültürde üreyebilmesi için gerekli inkübasyon süresinin uzun oluşu (1-4 hafta), besiyerlerinin saprofit mantarlar ile kontaminasyonu, örnekte mantar elemanlarının az sayıda bulunması nedeni ile yalancı negatif sonuçların alınması, üreyen mantarların tanınmasında zahmetli ve her zaman kesin tanı sağlayamayan testlere ihtiyaç duyulması dermatofitoz tanısında kültür yönteminin sınırlayıcı faktörleri arasında yer alır (14).

Son yıllarda dermatofitoz tanısında moleküler yöntemlerin kullanıldığı çalışmaların sayısı giderek artmaktadır. Yapılan çalışmalarda Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) tek başına ya da *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP), dizi analizi gibi yöntemlerle beraber kullanılmış, her yöntemin olumlu ve olumsuz özellikleri belirlenmeye

alışılmıştır (15-19). Moleküler yöntemlerin, dermatofitlerin klinik örneklerden direkt olarak saptanmasında ve kültürde üreyen suşların tanısında klasik yöntemlere göre daha kısa sürede ve doğru sonuç verdiği belirtilmektedir (3).

Bu çalışmada dermatofitozların rutin tanısında moleküler yöntemlerin yerinin araştırılması amaçlanmıştır.

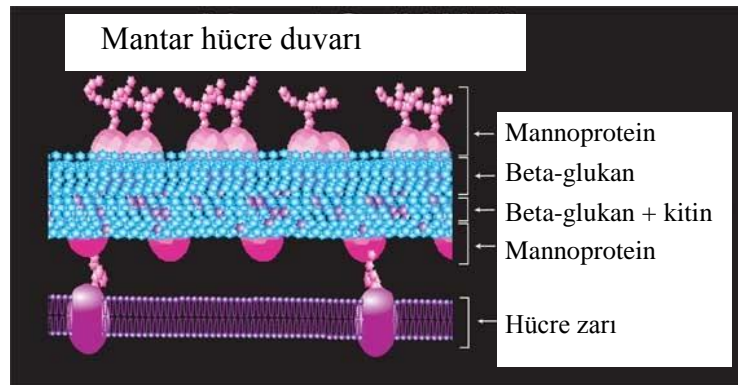
GENEL BİLGİLER

Tarihçe

Mantarları inceleyen bilim dalı olan mikoloji, Yunanca “şapkalı mantar” anlamına gelen *mykes* kelimesinden türetilmiştir (20). Yücel’in (21) bildirdiğine göre mantar infeksiyonlarına ilişkin ilk bilgiler M.Ö. 2000-1000 arasına tarihlenen ve ayak miçetomundan bahseden *Samhita* isimli Hindu kutsal yazıtında bulunmaktadır. Diğer eski belgeler arasında İstanköy’lü hekim Hipokrat’ın (M.Ö. 400-300) kandidozu tartışan metni ile Roma’lı ansiklopedist Aulus Cornelius Celsus’un halen Vatikan kütüphanesinde korunmakta olan sekiz ciltlik eseri *De Re Medicina*’da bahsettiği yangılı *ringworm*, favus ve ağızda kandiyaz sayılabilir. Mantara ilişkin hif yapılarını ilk olarak 1677’de Robert Hooke ve sonra 1680’de Leeuwenhoek incelemiş ve tarif etmişlerdir. Weitzman’ın (2) bildirdiğine göre Robert Remark, 1835’de favuslu bir olguda mantar elemanlarını tarif etmiş; Johann L. Schönlein, 1839’da favusta etkenin mantar olduğunu bildirmiştir. Raimond Sabouraud, 1910’da dermatofitleri *Achorion*, *Epidermophyton*, *Microsporum* ve *Trichophyton* olmak üzere dört ayrı cinse ayırmış, Chester W. Emmons 1934’de, Sabouraud’un sınıflandırmasını modernize etmiş ve *Achorion* cinsini çıkararak dermatofitleri *Epidermophyton*, *Microsporum* ve *Trichophyton* olmak üzere üç cinse ayırmıştır.

Mantarların Yapıları ve Üreme Özellikleri

Mantarlar, bitki ve hayvanlardan farklılık gösteren ayrı bir ökaryotik organizma grubunu oluşturur. Mantar hücreleri kitin, glukan, kitosan, mannan ve glikoprotein çeşitli bileşimlerinden oluşan sert bir hücre duvarı ile kaplıdır (Şekil 1) (4).

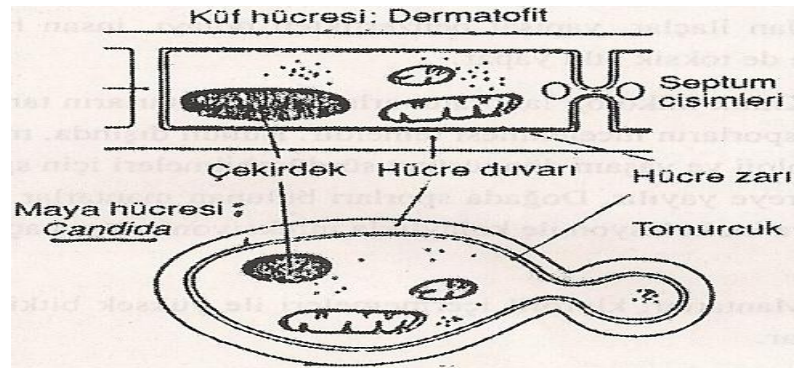


Şekil 1: Mantar hücre duvarının şematik görünümü

Mantarlarda sitoplazmayı çevreleyen bir zar tabakası bulunur. Yapısında fosfolipid, protein, glikoprotein ve lipitler bulunan bu tabaka sitoplazmik zar (hücre zarı) olarak adlandırılır. Hücre zarının sterol yapısı memelilerde kolesterol olmasına rağmen, mantarlarda ergosteroldür. Diğer ökaryotik canlılarda olduğu gibi mantarların sitoplazması içinde zarla çevrili çekirdek ve mitokondri, endoplazmik retikulum, golgi aygıtı, vakuoller, ribozomlar gibi gelişmiş organeller bulunmaktadır (20, 22).

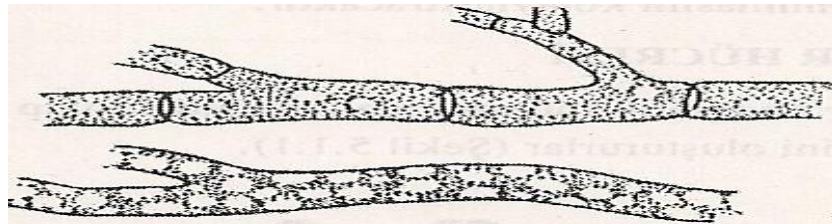
Mantarlar, klorofili bulunmayan heterofilik canlılar olup beslenmeleri için organik karbon içeren besinlere ihtiyaç duyarlar. Besinlerini, dış ortama salgıladıkları enzimlerin etkisiyle açığa çıkan yararlı maddeleri hücre duvarından sitoplazma içine alarak sağlarlar (4).

Mantarlar morfolojik yapılarına göre küf ve maya olmak üzere iki grupta incelenir. Doğal ortamlarda küf, vücut ısısında (37°C) maya şeklinde görülen mantarlara dimorfik (çift evreli) mantarlar denir (4, 20) . Mantarlarda hücre yapısı Şekil 2’de sunulmuştur.



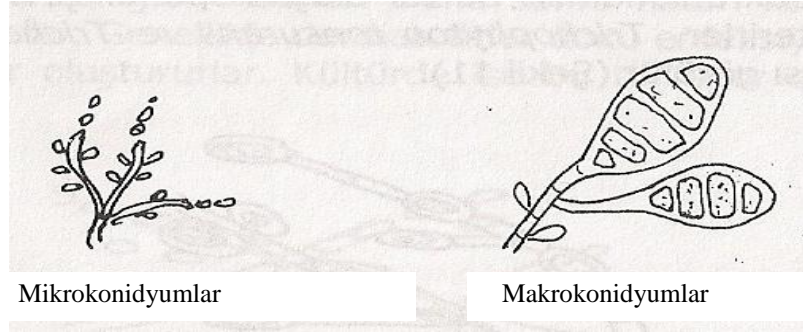
Şekil 2: Küf ve mayada hücre yapısı (23)

Maya mantarları tek hücreli olup küresel ya da oval görünümündedir (20). Küf mantarlarının temel yapı birimi hif adı verilen tübümsü yapılardır. Hiflerin bir araya gelerek oluşturduğu topluluğa miçel adı verilir. Bazı küflerde hifler septumlarla bölünmüştür (Şekil 3) (20, 22).



Şekil 3: Hif yapısı; üstte bölmeli, altta bölmesiz hif (20)

Mantarlar eşeyli ve eşeysiz olmak üzere iki yolla ürerler. Zigospor, askospor ve bazidiyospor eşeyli üreme sonucu oluşan yapılardır. Eşeysiz üreme ile oluşan yapılar artrospor, blastospor, klamidospor, sporanjiospor ve konidyospor adını alır. Dermatofit cinsi mantarlar tarafından oluşturulabilen küçük ve tek hücreli konidyosporlara mikrokonidyum, büyük ve çok hücreli konidyosporlara makrokonidyum adı verilir (Şekil 4) (4).



Şekil 4: Mikrokonidyum ve makrokonidyumların şematik görünümü (22)

Dermatofitlerin Sınıflandırması

Dermatofitlerin çoğu yalnızca eşeysiz çoğalan mantarları içeren Deuteromycota bölümünde, *Hyphomycetes anamorphic class*'ta bulunan üç cins (*Trichophyton*, *Microsporum* ve *Epidermophyton*) içinde sınıflandırılırlar (2). Bazı dermatofitler (özellikle *Trichophyton* ve *Microsporum* zoofilik ve jeofilik türleri) eşeyli üreme yeteneğine sahiptir (Tablo I). Askospor oluşturan bu türler Ascomycota bölümü, Ascomycetes sınıfı, Onygenales takımı, *Arthrodermataceae* ailesi, *Arthroderma* telemorf cinsi içerisinde sınıflandırılırlar (2, 4, 24).

Tablo I: Dermatofit türlerinin bilinen telemorfik şekilleri (24)

| Anamorf şekil | Telemorf şekil |
|---|------------------------------------|
| <i>Trichophyton, Microsporum</i> | <i>Arthroderma</i> |
| <i>Trichophyton mentagrophytes</i> var. <i>mentagrophytes</i> | <i>Arthroderma benhamiae</i> |
| <i>Trichophyton mentagrophytes</i> var. <i>interdigitale</i> | <i>Arthroderma vanbreuseghemii</i> |
| <i>Trichophyton simii</i> | <i>Arthroderma simii</i> |
| <i>Trichophyton georgiae</i> | <i>Arthroderma cijferrii</i> |
| <i>Trichophyton flavescens</i> | <i>Arthroderma flavescens</i> |
| <i>Trichophyton vanbreuseghemii</i> | <i>Arthroderma gertleri</i> |
| <i>Trichophyton gloriae</i> | <i>Arthroderma gloriae</i> |
| <i>Trichophyton terrestre</i> ^a | <i>Arthroderma insingulare</i> |
| <i>Trichophyton terrestre</i> ^a | <i>Arthroderma lenticularum</i> |
| <i>Trichophyton terrestre</i> ^a | <i>Arthroderma quadrifidum</i> |
| <i>Trichophyton ajelloi</i> | <i>Arthroderma uncinatum</i> |
| <i>Microsporum gypseum</i> ^b | <i>Arthroderma gypsea</i> |
| <i>Microsporum gypseum</i> ^b | <i>Arthroderma incurvata</i> |
| <i>Microsporum nanum</i> | <i>Arthroderma obtusa</i> |
| <i>Microsporum canis</i> | <i>Arthroderma otae</i> |
| <i>Microsporum persicolor</i> | <i>Arthroderma persicolor</i> |
| <i>Microsporum vanbreuseghemii</i> | <i>Arthroderma grubyia</i> |
| <i>Microsporum racemosum</i> | <i>Arthroderma racemosa</i> |
| <i>Microsporum fulvum</i> | <i>Arthroderma fulva</i> |
| <i>Microsporum boullardii</i> | <i>Arthroderma corniculata</i> |
| <i>Microsporum cookei</i> | <i>Arthroderma cajetani</i> |
| <i>Microsporum amazonicum</i> | <i>Arthroderma borelli</i> |
| <i>Microsporum gruby</i> | <i>Arthroderma stockdale</i> |

^{a,b} Bu anamorf türlerin birden fazla telemorfu vardır

Ekolojik Gruplama

Dermatofit türleri konak özgülüklerine ve doğal ortamlarına göre; antropofilik, zoofilik ve jeofilik türler olmak üzere üç ekolojik gruba ayrılır (Tablo II) (2, 4, 24). Antropofilik türler, insanlarda görülen dermatofitozların yaklaşık %70'inden, zoofilik türler ise % 30'undan sorumludur. Jeofilik türler insanda nadiren infeksiyon oluşturur (25).

Tablo II: Dermatofitlerin ekolojik özelliklerine göre gruplandırılması (2, 4, 24)

| Antropofilik | Zoofilik | Jeofilik |
|------------------------------------|---|-------------------------------------|
| <i>Epidermophyton floccosum</i> | <i>Microsporum canis</i> | <i>Microsporum gypseum</i> kompleks |
| <i>Microsporum audouinii</i> | <i>Microsporum gallinae</i> | <i>Microsporum praecox</i> |
| <i>Trichophyton concentricum</i> | <i>Microsporum nanum</i> | <i>Microsporum racemosum</i> |
| <i>Trichophyton megninii</i> | <i>Microsporum persicolor</i> | <i>Microsporum vanbreuseghemii</i> |
| <i>Trichophyton mentagrophytes</i> | <i>Trichophyton equinum</i> | <i>Trichophyton vanbreuseghemii</i> |
| <i>Trichophyton rubrum</i> | <i>Trichophyton erinacei</i> | |
| <i>Trichophyton schoenleinii</i> | <i>Trichophyton mentagrophytes</i> kompleks | |
| <i>Trichophyton soudanense</i> | <i>Trichophyton simii</i> | |
| <i>Trichophyton tonsurans</i> | <i>Trichophyton verrucosum</i> | |
| <i>Trichophyton violaceum</i> | | |

Antropofilik türler hemen sadece insanları infekte ederler. Hayvanlarda nadiren infeksiyonlara neden olurlar (2, 24). Bu türler yakın temas sonrasında direkt olarak ya da ortak kullanılan giysiler, tarak, havlu vb. ile dolaylı olarak bulaşabilirler (4).

Zoofilik türler daha çok insan dışındaki memelilerde ve nadiren kuşlarda patojen olup insana bulaşabilir (24). Bu türlerin bulaşı direkt temasla ya da infekte cisimlerle (dolaylı yolla) olmaktadır (26).

Jeofilik türler, toprak ya da toprakla taşınan keratinöz doku artıkları ile bulaşarak insanlarda ve hayvanlarda infeksiyona neden olabilir (2). İnfekte topraktan kaynaklanan ve sekonder olarak insandan insana bulaşım olduğu salgınlar bildirilmiştir (27). Jeofilik türlerin sıklıkla Batı Pasifik ve Orta Amerika'da ve bazı tropikal bölgelerde bulunduğu belirtilmektedir (7).

Fiziksel-Kimyasal Etkenlere ve Dış Ortam Koşullarına Karşı Direnç

Dermatofitler, giysi, tarak ve duş kabinleri gibi çeşitli yüzeylerde uzun süre canlı kalabilirler (6). Dermatofitlerin çoğu, tuzlu suda (% 50 NaCl) en az 52 hafta canlılıklarını sürdürürken (28), insan deri kazıntılarında oda ısısında, 20 aydan daha fazla süre canlı kalabildikleri belirtilmektedir (29).

Dermatofitler; fenol bileşikleri, formaldehit, glutaraldehit, iyodoforlar ve % 1'lik sodyum hipoklorite duyarlıdır (30). Bu etkenler, ultraviyole (31), gama (32) ve mikrodalga ışınları (33), nemli ısı (121°C'de en az 20 dakika) ve kuru ısı (165-170°C'de de 2 saat) ile ölmektedir (34).

Risk Faktörleri

Dermatofitozların ortaya çıkmasında başlıca risk faktörleri; yaş (çocuklarda tinea capitis, erişkinlerde onikomikoz), ailede kronik dermatofitoz öyküsü, yoğun vücut teması gerektiren sportif faaliyetler (güreş ve judo gibi), ayak maserasyonu (maraton koşucuları gibi), halka açık su tesislerinden yararlanma (duşlar ve yüzme alanları), şapka ve ayakkabı değişimi, yabani ya da evcil hayvanlarla (özellikle sokak kedileri) temas, kemirgenlerin yoğun olarak bulunduğu barınaklarda yaşam ve yeterince dezenfekte edilmeyen berber aletlerinin kullanılmasıdır (2, 4).

Epidemiyoloji

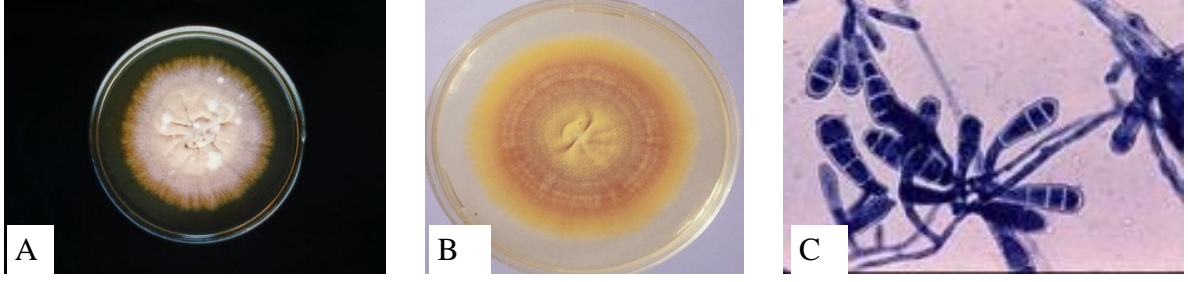
Son 20-30 yılda Orta ve Kuzey Avrupa'da en yaygın olarak görülen dermatofit *T. rubrum*'dur (35-38). Polonya gibi bazı ülkelerde *T. mentagrophytes* görülme sıklığı *T. rubrum*'a göre iki kattan daha fazladır (39). *Trichophyton violaceum* Kuzey-Orta Avrupa'da ve Akdeniz ülkelerinde, *T. soudanense* Orta ve Batı Afrika'daki endemik bölgelerde görülür. *Trichophyton schoenleinii* 20. yüzyılın başlarında Avrupa'da tinea capitisin en sık saptanan etkenlerinden biri iken, daha sonra yerini *M. audouinii* ve *T. tonsurans*'a bırakmıştır. Türkiye'de bu tür özellikle Orta ve Doğu Anadolu bölgesinde veya bu bölgeden göç eden ailelerin çocuklarında görülmektedir (7). Son yıllarda Avrupa ve özellikle Akdeniz ülkelerinde *M. canis* infeksiyon insidansında artışın olduğu bildirilmektedir (6).

***Epidermophyton* cinsi**

Bu cins içinde yer alan tek tür *Epidermophyton floccosum*, saçsız deride ve tırnakta infeksiyonlara neden olur. *Epidermophyton* cinsinin en önemli özelliği mikrokonidyum oluşturmamasıdır (2, 4).

Epidermophyton floccosum

Üremesi orta hızda olup kolonisi yaklaşık 10 günde olgunlaşır. Makroskobik incelemede koloni yüzeyi sarıdan yeşile değişen renklerde (Resim 1A), koloni tabanı portakal renginden kahverengiye değişen tonlarda görülür (Resim 1B). Mikroskobik incelemede septalı hifler boyunca tek tek sıralanmış ya da küme oluşturan tenis raketi biçiminde, ince duvarlı, düzgün yüzeyli, içinde 2-6 hücre bulunduran makrokonidyumları vardır (Resim 1C)) (22).



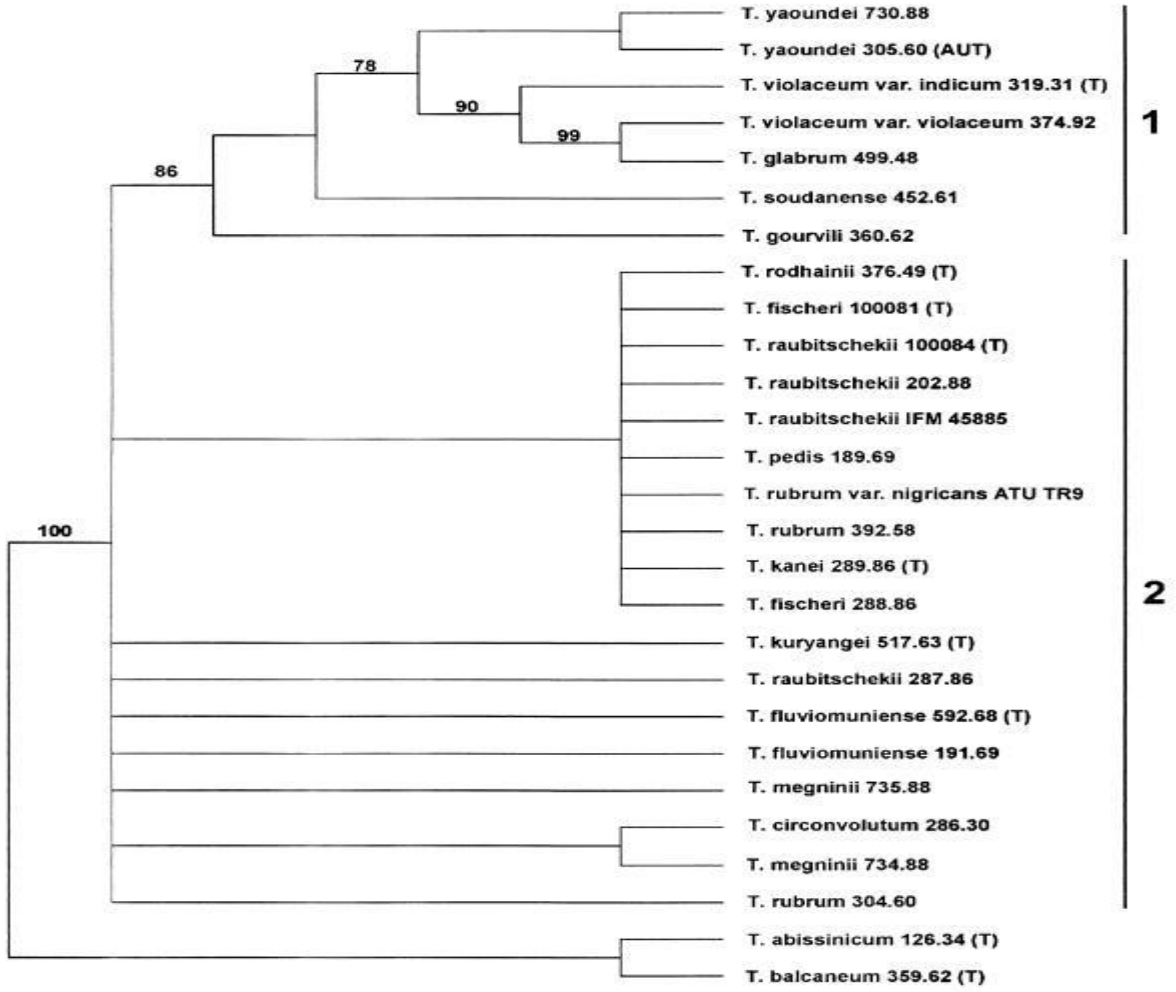
Resim 1: *Epidermophyton floccosum* koloni yüzeyi (A), koloni tabanı (B), mikroskopik görünümü (C)

***Trichophyton* cinsi**

Bu cins içinde yer alan türler saç, saçsız deri ve tırnakta enfeksiyona neden olurlar. *Trichophyton* türleri makrokonidyum ve mikrokonidyum oluştururlar. Makrokonidyumları genellikle ince duvarlı, 1-12 bölmeli ve 8-86x4-14 µm büyüklüğünde; çomak, iğsi ya da silindirik şekilde, tek tek ya da küme halindedir. Mikrokonidyumları 2-3x2-4 µm büyüklüğünde, armut şeklinde ve makrokonidyumlardan daha fazla sayıdadır. Hiflerin yan kısımlarında ya da uçlarında tek tek veya üzüm salkımı şeklinde dizilirler (2).

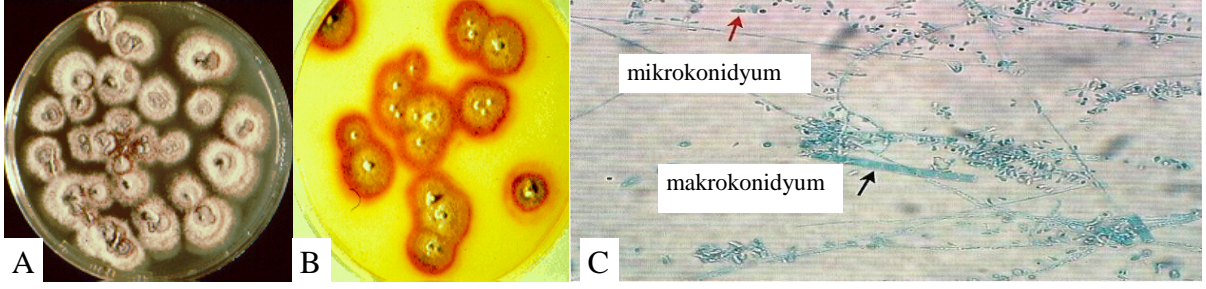
***Trichophyton rubrum* kompleks**

Trichophyton rubrum kompleks içinde bulunan türler, dermatofitozda en sık karşılaşılan etkenlerdir. Bu kompleks, DNA dizi analizine göre iki ana gruba ayrılmaktadır (Şekil 5) (40).



Şekil 5: *Trichophyton rubrum* kompleks'te yer alan türler (40)

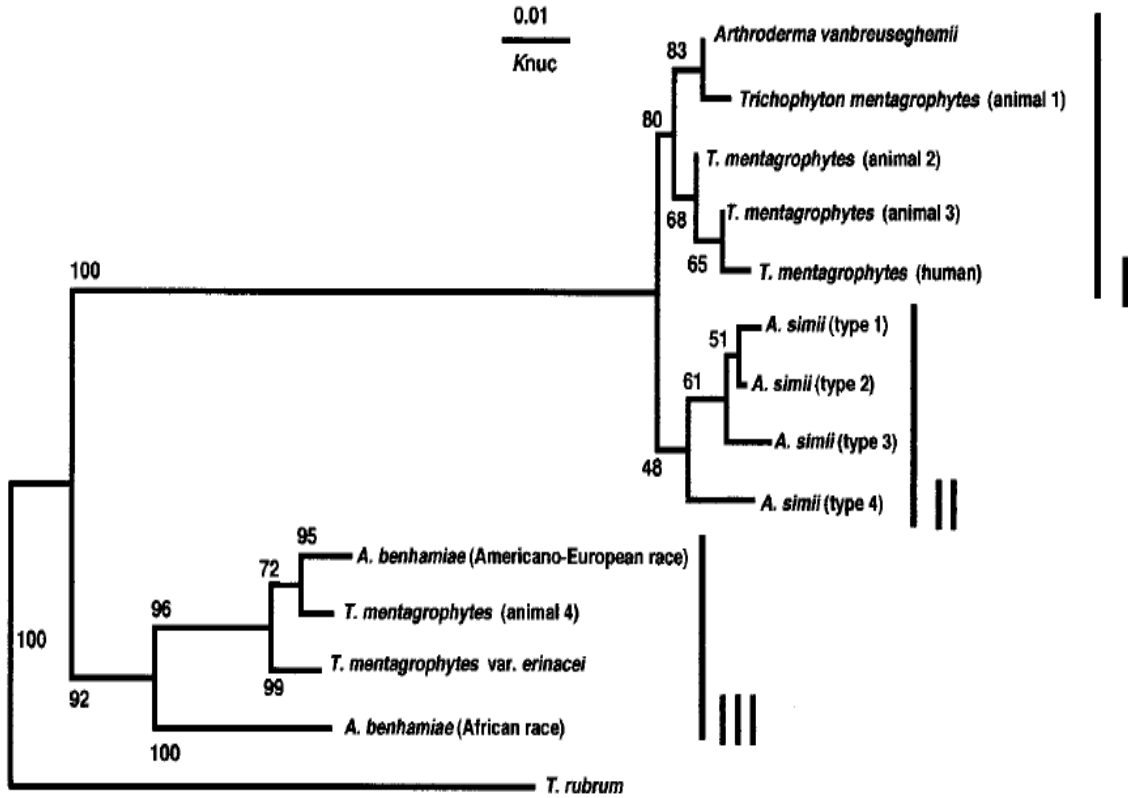
Trichophyton rubrum un oluşturduğu koloniler ortalama 4-7 günde olgunlaşır. Koloni yüzeyi beyaz renkte, tüylü veya pamuğumsu yapıda olup (Resim 2A), tabana doğru kırmızı veya mor renkli pigment oluşumu görülür (Resim 2B). Bazı suşlar pigment oluşturmayabilir. Pigment oluşumu patates dekstroz agar (PDA) ve mısır unlu dekstroz agarda, Sabouraud dekstroz agar (SDA)'a göre daha iyi görülmektedir (4, 41). Mikroskopik olarak bölmeli hifler üzerinde gözyaşı şeklinde dizilmiş olan mikrokonidyumlar bazen makrokonidyumların üzerinde de bulunabilir. Genel olarak makrokonidyumlar az sayıda bulunur (Resim 2-C) (4).



Resim 2: *Trichophyton rubrum* koloni yüzeyi(A), koloni tabanı (B) ve mikroskopik görünümü(C) (42)

Trichophyton mentagrophytes kompleks

Trichophyton mentagrophytes kompleks türleri dermatofitozun önemli etkenleri arasındadır. Bu kompleksin üyeleri DNA dizi analizi ile üç homolojik gruba ayrılmaktadır (Şekil 6) (43).

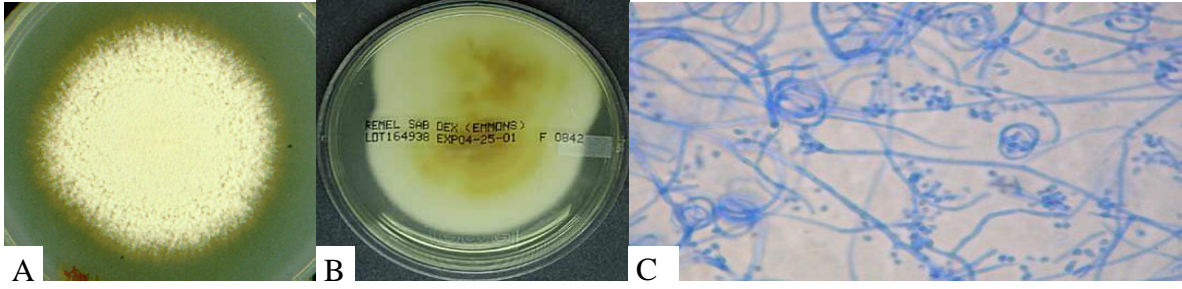


Şekil 6: *Trichophyton mentagrophytes* kompleks (43)

Trichophyton mentagrophytes kompleks, eşeyli üreme özelliği gösteren (telemorf) iki tür içermektedir. Bunlar *Arthroderma vanbreuseghemii* (anamorfu *Trichophyton*

mentagrophytes var. *interdigitale*) ve *A. benhamiae* (anamorfu *Trichophyton mentagrophytes* var. *mentagrophytes*)'dir (24).

Trichophyton mentagrophytes kompleks suşlarının kolonileri 7-10 günde olgunlaşır. Koloni yüzeyi pudramsı ya da pamuğumsu yapıda olup, beyaz ya da kremden deve tüyüne değişen renktedir (Resim 3-A). Koloni tabanı soluk renkli ya da kırmızı-kahverengidir (Resim 3-B). Bazı suşların koloni tabanında koyu kırmızı pigment görülebilir (4). Mikroskobik olarak mikrokonidyumlar zoofilik türlerde üzüm salkımı şeklinde olup büyük kümeler oluştururken, antropofilik türlerde daha az sayıdadır ve küçük kümeler oluştururlar. Makrokonidyumları ince bir sapla hife bağlanmış, lobut veya puro biçimindedir. Sarmal, nodüler ve geyik boynuzu şeklinde hifler bulunmaktadır (Resim 3-C) (22).



Resim 3: *Trichophyton mentagrophytes* koloni yüzeyi (A), koloni tabanı (B) ve mikroskobik görünümü (C) (44)

Trichophyton violaceum

Trichophyton violaceum kolonileri 14-21 günde olgunlaşır, az tüylü ya da tüysüz yapıda, mumsu, buruşuk, koyu morumsu veya kırmızı renklidir. Koloni tabanı morun değişik tonlarındadır. Mikroskobik olarak dallı budaklı hifler ve bu hifler üzerinde klamidosporeler görülür. Çoğu kez mikrokonidyum ve makrokonidyum görülmez (45).

Trichophyton tonsurans

Trichophyton tonsurans kolonileri genellikle 10-12 günde olgunlaşır. Besiyerine yayılan kahverengi pigment oluşturabilir. Mikroskobik olarak bölmeli hifler üzerinde çok sayıda gözyaşı damlası veya balon şeklinde mikrokonidyumlar, sarmal hifler, klamidosporeler ve artrosporeler görülebilir. Makrokonidyumlar sık görülmez (4).

Trichophyton schoenleinii

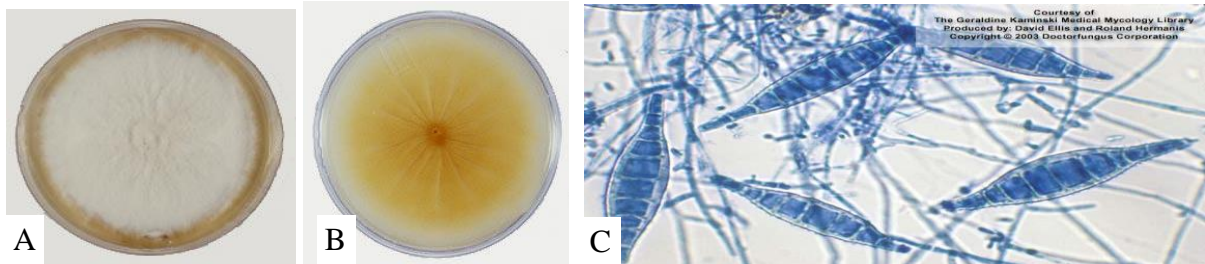
Trichophyton schoenleinii kolonileri ortalama 15 günde olgunlaşır. Beyazımsı renkte, balmumu görünümünde, çıplak veya kısa tüylü, kıvrımlı ve buruşuk görünümde koloni oluşturur. Hifler çoğu zaman besiyeri içine doğru üreyerek besiyerini parçalarlar. Koloni tabanı renksiz veya sarıdan portakal rengine değişen tonlarda görülebilir Mikroskobik olarak düzensiz, girintili çıkıntılı ve geyik boynuzunu andıran hifler görülür. Mikrokonidyum ve makrokonidyum görülmez. Hifler üzerinde çivi başı veya favus şamdanları adı verilen şişkinlikler vardır (22).

Microsporum cinsi

Microsporum türleri genellikle saç ve deride, nadir olarak da tırnakta infeksiyon oluşturur (2, 46). Mikrokonidyumları armut veya lobut biçiminde olup genellikle hif kenarında dizilmişlerdir. Makrokonidyumları, içlerinde 1-15 arasında hücre bulunan, kalın duvarlı, uçları sivri (mekik görünümünde) yapılardır. (22).

Microsporum canis

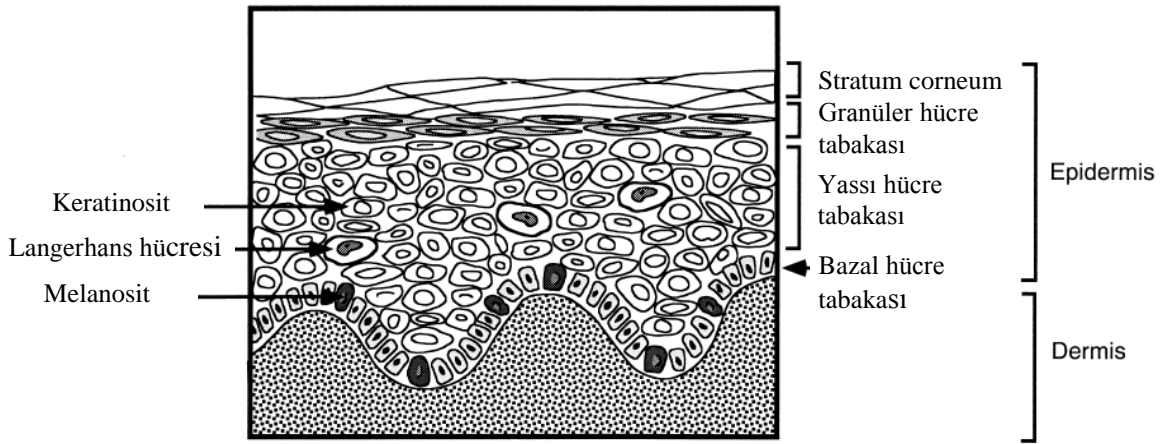
Tüm dünyada yaygın olarak görülen bu mantar etobur hayvanlarda (en önemlisi kediler) infeksiyon yapar ve temasla insanlara bulaşır. (6). Kolonisi 6-10 günde olgunlaşır. Koloni yüzeyi soluk renkli veya sarı, kaba tüylü ve ışınal olukludur (Resim 4-A). Koloni tabanı sarı renktedir (Resim 4-B). Mikroskobik incelemede bölmeli hifler üzerinde az sayıda, armut biçiminde mikrokonidyumlar ve çok sayıda iğ biçiminde kalın duvarlı, pürtüklü ve çok hücreli makrokonidyumlar görülür (Resim 4-C) (4).



Resim 4: *Microsporum canis* koloni yüzeyi (A), koloni tabanı (B) ve mikroskobik görünümü (C) (42)

Dermatofitozlarda İmmünoloji ve Patogenez

Dermatofitler epiderminin *stratum corneum* tabakasını infekte ederler (Şekil 7). Etkenin saçı ve tırnağı infekte edebilme kapasitesi türden türe farklılık gösterir. Bu doku özgülüğünün, konaklardaki keratinin yapısının değişkenliğinden (47), türlerin özel besin gereksinimlerinden ve enzim üretimindeki farklılıklardan kaynaklandığı düşünülmektedir (24). Dermatofitlerin deri altına yayılımı ve sistemik infeksiyonlara yol açması nadir görülen durumlardır. Özellikle immün sistemi bozulmuş hastalarda invazif infeksiyonların bildirildiği olgu sunumları bulunmaktadır (48-52).



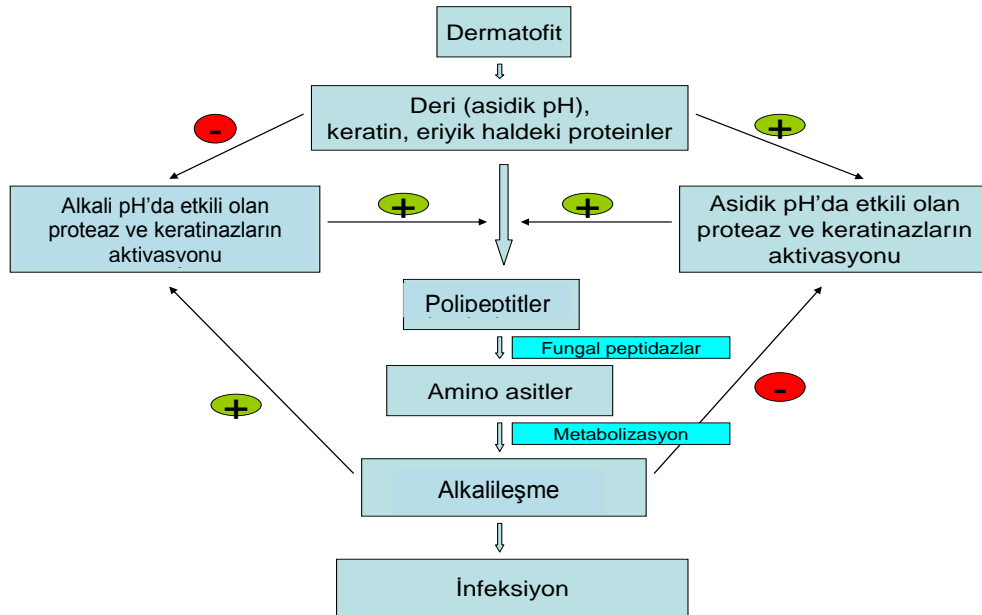
Şekil 7: Derinin anatomik görünümü (53)

Dermatofit infeksiyonunun ilk aşaması konidyumların stratum corneum ya da keratin içeren dokulara teması ve yapışmasıdır. Sonraki aşamalar mantarın germinasyonu (filizlenmesi), çoğalması ve aktif lezyonun ortaya çıkmasıdır (54). Dermatofitler, mikrokonidyumlarının yüzeyinde eksprese edilen ve özellikle mannoz ve galaktoza bağlanan karbonhidrata özgül adezinler aracılığı ile epitel hücrelerine yapışır (55, 56). Bir çalışmada, 12 saatlik inkübasyon sonrasında sporlar ile stratum corneum arasında kuvvetli bir yapışmanın ortaya çıktığı, 24 saat sonra germinasyonun başladığı, üç gün sonra ise hif oluşumu ve miçelyumun dış keratinosit tabakaya penetre olduğu gösterilmiştir (57).

Dermatofitoz kliniğinin şiddeti mantarın virülansına, yerleştiği vücut bölgesine, lokal veya çevresel faktörlere, konağın verdiği yanıtı bağlı olarak farklılık gösterir (2).

Dermatofitler keratinaz, proteinaz, serin proteaz, peptidaz, amino peptidaz, elastaz, alkalın fosfataz, lipaz, kollajenaz, esteraz gibi birçok enzim salgılamaktadır (24, 58).

Bu enzimler arasında en önemlisi, mantar elemanlarının hücrelere kolonizasyonunu, penetrasyonunu, invazyonunu sağlayan ve keratini parçalayan keratinazdır (59, 60). Suşlar sentezledikleri enzimlerle, buldukları ortamın fiziksel ve kimyasal özelliklerini değiştirerek dokudaki yaşamlarını sürdürürler. Konak proteinlerini parçalayıp besin kaynağı olarak kullanırlar. Stratum corneuma penetre olan hiflerin mekanik etkisi bu yıkıcı süreçte en önemli mekanizmadır (59). İnfeksiyonun erken döneminde derideki keratin ve bazı proteinler, asidik pH'da etkili olan proteinaz tarafından parçalanarak polipeptitler ortaya çıkar. Polipeptitlerin fungal peptidazlar tarafından hidrolize edilmesi ile mantarın karbon, besin ve sülfür kaynağı olarak kullanacağı amino asitler ortaya çıkar. Bazı amino asitlerin metabolizasyonu sonucu ortam alkaliye döner. Böylece alkali pH'da optimal aktivite gösteren proteazlar ve keratinazlar aktive olarak infeksiyon devam eder (Şekil 8) (58).



Şekil 8: Dermatofitler tarafından salgılanan proteolitik enzimlerin infeksiyon sürecindeki rolü (58).

Mantar hücre duvarında bulunan mannan, konakta oluşan inflamatuvar cevabı baskılar. *Trichophyton rubrum* mannan antijeninin keratinosit proliferasyonunu önleyerek epitelyal yenilenmeyi azalttığı ve kronik infeksiyonlara neden olduğu gösterilmiştir (61). *Microsporum canis* şiddetli inflamatuvar yanıt oluştururken, *T. rubrum* daha az şiddette inflamasyona yol açar. Her iki mantarın yapısındaki mannan da lenfoproliferasyonu doza bağımlı olarak inhibe eder. *Microsporum canis* ile kıyaslandığında *T. rubrum*'un oluşturduğu mannanın miktarı daha fazla ve etkisi daha güçlü olduğu belirtilmektedir (2).

Keratinositler, epidermiste en yoğun miktarda bulunan hücrelerdir. Mikroorganizmalara karşı fiziksel bariyer oluştururlar ve immün cevaba aracılık ederler. Keratinositlerin salgıladığı, immün cevabı düzenleyen bazı sitokinler arasında büyüme faktörleri [“basic fibroblast growth factor” (bFGF), “platelet-derived growth factor” (PDGF AA ve B), “transforming growth factor alpha” (TGF- α), “transforming growth factor beta” (TGF- β), “tumor necrosis factor alfa” (TNF- α)], interlökinler (İnterlökin 1, 3, 6-8) ve koloni stimulan faktörler [“granulocyte colony-stimulating factor” (G-CSF), “macrophage colony-stimulating factor” (M-CSF), “granulocyte macrophage colony-stimulating factor” (GM-CSF)] bulunmaktadır (53).

Dermatofit infeksiyonları konağın bazı immünolojik savunma mekanizmalarını harekete geçirir. Ortaya çıkan klinik tablodan immün yanıt sorumludur. Mantar infeksiyonları hem erken tip hem de hücresel gecikmiş tip aşırı duyarlılık reaksiyonlarına neden olur (62). Dermatofitozda aşırı duyarlılık reaksiyonları sonucu lenfositler, plazma hücreleri, nötrofiller ve eozinofiller dermis içine infiltre olur. Mantar hiflerinin dermis içine penetrasyonu sonucu perivasküler ve perifoliküler inflamasyon ortaya çıkar (2).

Serumdaki bazı moleküller (beta globulin, ferritin gibi), immünolojik faaliyetler (kompleman aktivasyonu, kemotaksis gibi), yağ bezleri tarafından salgılanan yağ asitleri (ayak tabanında yağ bezlerinin olmaması ayakta kronik mantar infeksiyonlarının gelişimini kolaylaştırır), infekte olan epidermiste kendi kendini yenilemesi dermatofitozların oluşumunu, oluşan infeksiyonların kronikleşmesini ve bu infeksiyonların sistemik infeksiyonlara dönüşümünü engeller (22, 24). Zoofilik ve jeofilik türler antropofilik türlere göre daha şiddetli immünolojik reaksiyonlara neden olarak, hızlı ilerleyen, ağrılı ve kaşıntılı lezyonlara yol açabilir. Antropofilik türlerin oluşturduğu infeksiyonlarda yangısal reaksiyonun daha düşük seviyeli olması sonucu, bu türlerle oluşan infeksiyonların kronikleşme eğilimi zoofilik ve jeofilik türlerle oluşan infeksiyonlardan daha fazladır (53, 58).

İnfeksiyonun sınırlandırılmasında sıvısal bağışıklığın az da olsa rolü vardır. Spesifik antikorlar akut infeksiyonun ilk ayında görülmeye başlar ve infeksiyon bittikten en fazla 6-12 ay sonra kaybolur. Puberte döneminden itibaren hormonal değişime bağlı olarak yağ bezlerinden doymamış yağ asidi salınımının artması sonucu dermatofitoz görülme sıklığı azalır. Doymamış yağ asitlerinin fungistatik ve/veya fungisidal etkilerinin olduğu bilinmektedir (24).

Klinik

Dermatofitlerin oluşturduğu infeksiyona dermatofitoz, oluşan lezyonlara tinea adı verilir. Dermatofitozlar yerleştikleri vücut bölgelerine göre adlandırılırlar (tinea capitis, tinea barbae, tinea corporis, tinea inguinalis, tinea pedis, tinea unguium) (7). Dermatofitozda inkübasyon zamanı, tutulan konağa ve dermatofitin türüne göre birkaç günden birkaç haftaya kadar değişmektedir (1). Dermatofitozların yanlış tanı alması sonucu topikal ya da sistemik kortikosteroidlerin kullanılması ile tinea incognito tablosu ortaya çıkar. Lezyonlar diğer dermatolojik hastalıkları taklit eder (63).

Tinea capitis

Baş bölgesinde saç ve saçlı deride oluşan infeksiyonlar tinea capitis olarak adlandırılır. Bu infeksiyon çocuklarda en yaygın görülen dermatofitozdur (1). *Trichophyton* ve *Microsporum* türleri tinea capitis etkeni olabilirler (2). Tinea capitis prevalansının en yüksek olduğu yerler; Afrika, Asya, Güney ve Doğu Avrupa ülkeleridir (1, 7).

Dermatofitler kılı değişik şekillerde infekte ederler. Bu infeksiyon şekilleri endotriks, ektotriks ve favik infeksiyonlar olarak adlandırılır. Endotriks infeksiyonda dermatofitler kıl folikülü içerisinde çoğalır ve saçın deri yüzeyinde kırılıp dökülmesine yol açarlar. Ektotriks infeksiyonda, dermatofitler kıl foliküllerinde çoğaldıktan sonra kıl kökü dışına çıkarak kılı bir kılıf gibi sararlar. Bu durumda saçlar matlaşır ve saçlı derinin birkaç milimetre üzerinde olacak şekilde kırılıp dökülür. Favik infeksiyonda ise endotriks infeksiyon söz konusu olup saç kılı içerisinde hava kabarcığı gibi boşlukların olduğu görülür (2, 7). Tinea capitis; tinea capitis superficialis, tinea capitis profunda ve tinea capitis favosa (Keryon) olmak üzere üç değişik klinik formda görülür (23).

Tinea corporis

Saçlı deri, sakal, el, ayak ve inguinal bölge dışındaki dermatofit infeksiyonlarına verilen addır. Dermatofit cinslerinin hepsi bu tabloya neden olabilir. Lezyon tek ya da fazla sayıda, merkezi soluk, sınırları belirgin, halka şeklinde ve hafif kabarıktır (1).

Tinea inguinalis

İnguinal bölgede görülen dermatofitozudur. Yaz aylarında ve sıcak iklimlerde ortamın nemli olmasına bağlı olarak daha sık karşılaşılır. En sık etkenler *T. rubrum* ve *E. floccosum* 'dur. Erkeklerde kadınlara oranla daha sık görülür (2).

Tinea pedis ve tinea manum

Ayakta görülen dermatofitoz tablosuna tinea pedis, elde görülene tinea manum, el ve ayağın birlikte etkilendiği tabloya ise tinea pedis et manum adı verilir. Atlet ayağı olarak da adlandırılan tinea pedis toplumda en sık karşılaşılan dermatofitozudur. Yaz aylarında ve sıcak iklimlerde görülme sıklığı artar. Toplu yaşanan yerlerdeki bireylerde (yatılı okul, kışla vb), kadınlara göre erkeklerde ve çocukluk dönemine göre erişkinlerde daha sıktır. En sık izole edilen etkenler *T. rubrum*, *T. mentagrophytes* ve *E. floccosum* 'dur (7, 22).

Tinea unguium

Dermatofit, maya ve küf mantarlarının tırnakta oluşturdukları infeksiyonlara onikomikoz adı verilir. Yalnızca dermatofitlerin tırnakta oluşturdukları infeksiyonları tarif ederken ise tinea unguium terimi kullanılır (1, 2). Tinea unguium en sık 60 yaşın üzerindeki erişkinlerde görülmektedir (64). En sık ayak tırnaklarında, daha az olarak el ve ayak tırnakları ile birlikte, en az el tırnaklarında görülür. Bu infeksiyonda tırnakta renk değişikliği, kalınlaşma ve şekil bozukluğu meydana gelmektedir. Tinea unguium'da en sık görülen etkenler *T. rubrum* ve *T. mentagrophytes* 'tir (2, 65).

Tinea barbae

Sakal bölgesinin dermatofitozudur. Hafif ve yüzeysel infeksiyondan ciddi inflamatuvar püstüler folikülit şekline kadar değişebilir (2). Genellikle *T. verrucosum*, *T. mentagrophytes* var. *mentagrophytes* ve *T. mentagrophytes* var. *erinacei* gibi zoofilik dermatofitler tarafından oluşturulur (2, 22). Lezyon bölgesinden kıl çekildiğinde hastanın ağrı hissetmemesi tanıya yardımcı bir ipucudur. Bakteriyel infeksiyonlarda bu işlem ağrılıdır (1).

Dermatofitid

Dermatofitozu olan bazı kişilerde Etkene ve metabolizma artıklarına karşı ileri derecede aşırı duyarlılık reaksiyonu oluşur. En sık ellerde oluşan ve id reaksiyonları olarak adlandırılan bu durum, mantar iyileşince bir süre daha devam eder ve ardından kendiliğinden

kaybolur (22). İnfeksiyon bölgelerinden farklı bir yerde meydana gelen id reaksiyonları genellikle veziküler tipte görülmesine rağmen papüler, ekzematöz, ürtikeryal veya eritema multiforme şeklinde de görülebilir. Veziküler lezyonlar genellikle inflamatuvar dermatofit infeksiyonu ile ilişkili olup hastaların çoğu dermatofit antijenlerine karşı gecikmiş tipte aşırı duyarlılık reaksiyonu gösterirler. Ürtikeryal lezyonlu hastaların çoğunda ise erken tipte aşırı duyarlılık reaksiyonu görülür (53).

Laboratuvar Tanı

Dermatofit infeksiyonlarının laboratuvar tanısı genellikle direkt mikroskopik inceleme, kültür ve Wood lambası ile infekte saç tellerinin incelenmesi ile yapılır (7).

Örnek alınması

Dermatofitoz tanısında örneklerin doğru alınması büyük önem taşır. Örnek deneyimli personel tarafından alınmalı, direkt mikroskopik inceleme ve kültür için yeterli miktarda olmalıdır. Kontaminasyonu en alt seviyede tutabilmek için örnek alınmadan önce lezyon bölgesi %70'lik alkol ile silinir. Açık yara bulunan bölgeler steril su ile temizlenmelidir (4). Örnekler steril ve kuru bir kap (petri kabı vb) içinde toplanarak laboratuvara ulaştırılır. Deri infeksiyonlarında örnek, lezyonun sağlam deri ile birleştiği aktif kenardan steril bistüri ile kazınarak alınır (14, 23). Saçlı deride lezyon bölgesi Wood lambası ışığında incelenerek, floresans veren saçlar alınabilir (*Microsporum audouinii*, *M. canis* ve *M. ferrugineum* gibi türlerin infeksiyonu parlak yeşil renkte, favus etkeni *T. schoenleinii* ise donuk yeşil renkte floresans verir). İnfekte saç telleri bir penset ile çekilerek kıl follikülü ile birlikte çıkarılır (4, 23). Tırnak örnekleri alınırken tırnağın üst kısmı ölü mantar elemanlarını içerdiği için kazınarak atılır, tırnağın orta ve alt tabakaları alınır. Örnekler hemen incelenemeyecek ise buzdolabında +4°C'de 3-5 gün saklanabilir (23).

Direkt mikroskopik inceleme

Örneklerin direkt mikroskopik incelenmesinde; dokunun erimesi ve mantar elemanlarının görülebilmesi için en sık %15-20 konsantrasyonda potasyum hidroksit (KOH) çözeltisi kullanılır. Bunun yanında %10 KOH, %10 sodyum hidroksit (NaOH), %20 KOH+%36 dimetil sülfoksit (DMSO), %5 gliserollü %25 KOH ya da %25 sodyum hidroksit (NaOH) gibi çeşitli karışımlar da kullanılabilir (2). Mikroskopik incelemede mantara ait hifler

ve sporlar aranır. Tırnak örnekleri için daha yoğun konsantrasyonda KOH veya NaOH (%20-25) kullanmak ve daha uzun süre beklemek gerekebilir (22, 23). Saç teli içeren preparatlarda endotriks, ektotriks ve favik infeksiyonlar tanınabilir (4, 23).

Mantar elemanları kalkoflor beyazı veya Kongo kırmızısı gibi glukana bağlanan floresans verici maddeler kullanılarak floresan mikroskopu ile görülebilir (2, 4, 14). Histolojik incelemeler için periodic acid-Schiff (PAS) boyası ve metanamin gümüş boyası kullanılabilir (14).

Mantar kültürü

Dermatofitlerin üretilmesinde en sık kullanılan besiyeri SDA'dır. Bu besiyerine kloramfenikol ve gentamisin eklenerek bakterilerin, sikloheksimid eklenerek saprofit mantarların oluşturabileceği kontaminasyon önlenir (14, 23). Kloramfenikol ve sikloheksimid eklenmiş Sabouraud pepton dekstroz agar (Emmon's modifikasyonu) yaygın olarak kullanılmaktadır (2). Patates dekstroz agar (PDA) bazı dermatofitlerin pigment oluşumunu ve konidyum gelişimini artırarak mikroskopik tanıyı kolaylaştırmaktadır (22, 23). Kullanılabilecek diğer bir primer izolasyon besiyeri "Dermatofit Test Medium" (DTM)'dir. Bu seçici besiyeri yoğun olarak kontamine olmuş örneklerde dermatofitlerin varlığını taramak için kullanılır. Bu besiyerinde dermatofitlerin üremesi pH'da artışa neden olup fenol kırmızısı indikatörünün rengini sarıdan kırmızıya çevirir (2, 4, 14). *Trichophyton terrestre*, *Chrysosporium* türleri ve diğer dermatofit dışı mantarlar DTM'de üreyebilir ve besiyerinin rengini kırmızıya çevirebilir. Bazı *Microsporum* suşlarının bu besiyerinde yalancı negatif sonuçlar verebildiği belirtilmektedir (2, 14).

Mantar kültürü için öze ile, örneğin bir kısmı besiyerinin yüzeyinde bir kısmı da içinde kalacak şekilde birkaç noktadan ekim yapılır. Bu şekilde mantarın besiyerinin derin kısmından besin, yüzeyinden oksijen sağlaması hedeflenir. Ekim yapılan besiyerleri genelde 20-25°C'de dört hafta süre ile inkübasyona bırakılır (14). *Trichophyton verrucosum* gibi bazı türler en iyi 37°C'de ürediği için çift besiyerine ekim yapılarak biri oda ısısında diğeri 37°C'de inkübasyona bırakılabilir (7, 14, 23). Etüv içine su dolu kap konularak nemli ortam sağlanır.

Kültürde üreyen mantarların tanısında, makroskopik ve mikroskopik özellikleri önem taşır. Makroskopik inceleme ile kolonilerin yüzey rengi, taban rengi, büyüklüğü, yüzey görünümü (granüllü, pamuğumsu, tüysüz, kadife görünümlü gibi), yüzey şekli (kırımlı,

buruşuk, düzenli ya da düzensiz kenarlı oluşu) ve varsa besiyerine dağılan pigmenti incelenir. Mikroskopik incelemede laktofenol pamuk mavisi ile hazırlanan selofan bant preparatında makrokonidyum ve mikrokonidyumların görünümü, hif ve spor yapıları incelenir (14, 22, 23).

Suşların identifikasyonu ile ilgili testler

In-vitro kıl delme testi

Bu test için çocuklardan alınmış açık renkli saç telleri ve koyun kılı kullanılabilir (66). *Trichophyton mentagrophytes*, *M. canis* ve *M. gypseum* saç telinde dikey, koni şeklinde delinmeler oluştururken, *T. rubrum*, *M. audouinii* ve *M. praecox* oluşturmaz (Resim 5) (4, 14, 23).



Resim 5: *In-vitro* kıl delme testi (42).

Üre hidrolizi deneyi

Bu amaçla Christensen üre agar veya sıvı üre besiyeri kullanılır. Besiyerine ekim yapıldıktan sonra 27°C’de inkübasyona bırakılır. Üreaz üreten suşlarda 2-6 gün sonra üreinin parçalanması sonucu pH alkaliye döner ve fenol kırmızısı içeren besiyerinin rengi saman sarısından koyu pembeye doğru değişir (4, 14). Bu test *T. rubrum*’un tipik şeklinin (üreaz negatif), üreaz pozitif Afrika-Asya veya granüler şeklinden ve üreaz aktivitesi bulunan *T. mentagrophytes* ve *T. megninii*’den ayırt edilmesinde kullanılır (4, 14, 22).

Pirinçli besiyerinde üreme

Bir erlenmayer içine 1 kısım pirinç 3 kısım su konur ve otoklavda steril edilir. Daha sonra pirinç taneleri üzerine ekim yapılır. 25-30 °C’de iki hafta inkübasyona bırakılır. Bu test *M. equinum* ve *M. audouinii*’yi *M. canis*’ten ayırt etmek için kullanılır. Bu besiyerinde *M. canis* iyi ürer ve ortama yayılan sarı pigment oluşturur (14). *Microsporium equinum* ve *M.*

audouinii pirinç taneleri üzerinde zayıf bir üreme ve sporlanma yaparak pirinç taneciklerini kahverengiye dönüştürür (4, 23).

Bromcresol purple-milk solids-glucose medium (BCP-MS-G)'da üreme

Besiyerinde üremenin şekline (yoğun ya da sınırlı) ve pH indikatöründe alkaliliği gösteren renk değişikliğine bakılarak değerlendirme yapılır. Test edilecek suşun ekimi yapıldıktan sonra besiyeri 25 °C'de yedi gün inkübasyona bırakılır (67). Özellikle *T. rubrum*'u *T. mentagrophytes* kompleks'ten, *T. mentagrophytes*'i *M. persicolor*'dan ayırt etmek için kullanılır. *Trichophyton rubrum* BCP-MS-G'de sınırlı bir üreme gösterip alkali bir reaksiyon oluşturmazken, *T. mentagrophytes* komplek üyeleri yayılarak yoğun bir üreme gösterir ve alkali reaksiyon oluştururlar. *Microsporum persicolor* besiyerine yayılarak yoğun üreme göstermesine rağmen alkali reaksiyon oluşturmaz. *Trichophyton mentagrophytes* besiyerinin orijinal rengi olan gök mavisini mor renge dönüştürür (4, 14).

Özel besin ve vitamin gereksinimi

Bazı dermatofit türleri besiyerlerinde inozitol, tiyamin, nikotinic asit ve histidin gibi özel besinlere ihtiyaç duymaktadır. *Trichophyton* türlerinin ayırımında ve tanısında kullanılmak üzere özel besin gereksinimlerine göre hazırlanmış *Trichophyton* agar besiyerleri hazırlanmıştır (68). Bu besiyerleri ticari olarak mevcuttur (*Trichophyton* agar 1-7, Difco). Besin gereksinimleri, kontrol besiyeri ile spesifik vitamin veya amino asitlerle zenginleştirilmiş besiyerlerindeki üreme karşılaştırılarak belirlenebilir. *Trichophyton verrucosum* ve *T. concentricum*'un üremesi için tiyamin ve inozitol gerekmektedir. Vitamin gereksinimi kısmi olduğunda kontrol besiyerinde üremede bir azalma görülür (14).

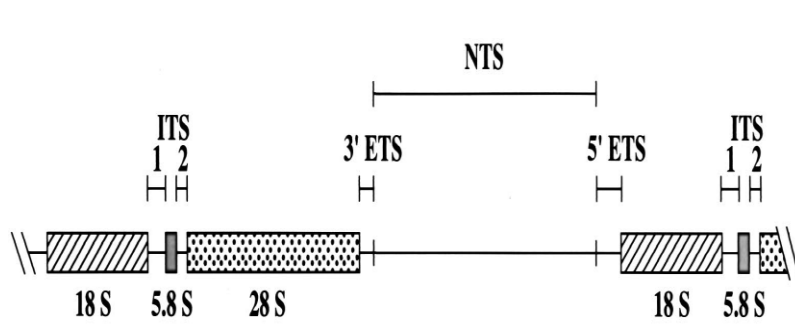
Isı toleransı testi

Isı toleransı testi, *T. mentagrophytes* kompleksine ait suşların *T. terrestre*'den ve *M. persicolor*'dan, *T. verrucosum*'un *T. schöenleinii*'den ve *T. soudanense*'nin *M. ferrugineum*'dan ayırt edilmesinde faydalıdır. Mantar kolonisinden alınan örnekler SDA besiyerlerine ekilip 25-30°C ve 37°C'de inkübasyona bırakılır. Her iki ısı derecesindeki koloni özellikleri incelenir. *Trichophyton mentagrophytes* kompleksine ait suşlar 37°C'de iyi ürerken *T. terrestre* üremez, *M. persicolor* çok hafif ürer ya da hiç üremez. *Trichophyton verrucosum*

ve *T. soudanense* 'nin üremesi artarken *T. schönleinii* ve *M. ferrugineum* 'un üremesinde bir değişiklik olmaz (4, 22).

Moleküler tanı yöntemleri

Dermatofitlerin identifikasyonunda en yaygın kullanılan DNA bölgeleri; ribozomal DNA (rDNA) üzerinde ribozomal RNA'nın (rRNA) küçük alt ünitesini (18S), büyük alt ünitesini (28S) ve 5,8S rRNA'yı kodlayan gen bölgeleri, 18S rDNA ile 5,8S rDNA arasında kalan ITS1 (*Internal transcribed spacer*) bölgesi ve 5,8S rDNA ile 28S rDNA arasında kalan ITS2 bölgeleridir (Şekil 9) (15, 16, 69-72). ITS1 ve ITS2 bölgeleri ve aralarında kalan 5.8S rDNA bölgesi mantar DNA'sının aşırı değişken bölgeleri iken (73), 18S ve 28S rDNA bölgeleri korunmuş bölgelerdir (16).



Şekil 9: Dermatofitlerin ribozomal DNA (rDNA) bölgesi (71).

ITS: *Internal transcribed spacer*, ETS: *External transcribed spacer*, NTS :*Nontranscribed spacer*

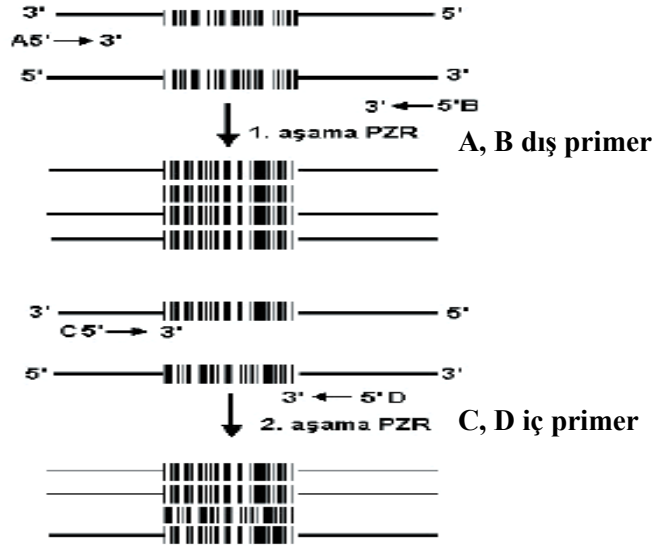
Dermatofitlerin tanımlanmasında kullanılan moleküler yöntemler arasında; mitokondrial DNA “restriction fragment length polymorphism” (RFLP) analizi (74), rDNA’da bulunan 18S rDNA ve ITS bölgelerinin PZR (16) ve dizi analizi (75), “multipleks” PZR (17), “LightCycler” PZR (76) ve “nested” PZR (18, 77) sayılabilir.

Suşlar arasındaki epidemiyolojik ilişkinin belirlenmesinde “Random amplification of polymorphic DNA” (RAPD) (78) ve “Arbitrarily Primed PZR” (AP-PZR) (79) yöntemleri kullanılmaktadır.

Nested PZR

Nested PZR yönteminde, ardarda iki PZR yapılır. İlk PZR’de iki adet dış primer kullanılarak hedef molekül üzerinde uzunca bir bölgenin amplifikasyonu yapılır (15-30 siklus). Ardından bu amplifikasyon tübünden alınan örnekteki DNA’nın daha kısa bir bölümü

iç primerlerle çoğaltılır (15-30 döngü). İç primerler, dış primerlerin bağlanma yerinin iç kısmında kalan, kendilerine özgül yerlere tutunmaktadır (Şekil 10) (80).



Şekil 10: Nested PZR yöntemi (80)

Multipleks PZR

Polimeraz zincir reaksiyonunun bir versiyonu olan multipleks PZR’de, amplifikasyon tüpü içerisine klinik örnekte bulunabilecek farklı mikroorganizmalar veya aynı mikroorganizma geni üzerindeki farklı hedef bölgeleri için özgül olan primerler kullanılarak, çok sayıda hedef aynı anda çoğaltılabilmektedir (81).

Restriction fragment length polymorphism (RFLP)

“Restriction fragment length polymorphism” (RFLP) yönteminde DNA, uygun restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesilmekte ve ardından oluşan parçalar agaroz jel elektroforezinde ayrılmaktadır. Her suşa ait farklı büyüklük ve sayıdaki DNA parçaları, o suş için tiplene profiline oluşturmaktadır. RFLP yöntemi hızlı, basit ve ucuz bir yöntem olmasına rağmen fungal genomun kompleks olmasından dolayı çok sayıda bant oluşmaktadır. Bu durum bantların ayrışmasını zorlaştırmaktadır. Bundan dolayı bu yöntemle orta derecede ilişkili izolatlar arasındaki klonal ilişkiyi değerlendirmede zorluklar olduğu belirtilmektedir (82, 83).

Random amplified polymorphic DNA (RAPD)

Polimeraz zincir reaksiyonu temelli tipleme yöntemleri; 6-20 bazlık PZR primerlerinin bağlandığı bölgelerdeki değişimleri hedef almaktadır. Bu yöntemler hızlı, kolay ve nisbeten ucuz yöntemlerdir. “Random amplified polymorphic DNA” (RAPD) veya “arbitrarily primed” PZR (AP-PZR) yöntemleri, yaklaşık 10 baz uzunlukta, rastgele seçilmiş bir primer kullanılmaktadır. Tek primer, suşlar arasında oldukça fazla sayıda bant profili oluşturmakla birlikte, çoğu durumda suşlar arasındaki ayrımı sağlayabilecek 1-3 tane şidetli bant oluşmaktadır (82).

Antifungal Duyarlılık Testleri

Günümüzde, farklı mantar gruplarının antifungal ilaçlara in vitro duyarlılığını belirlemek amacı ile CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) tarafından standardize edilmiş olan antifungal duyarlılık testi yöntemleri mevcuttur (84). Mayalar için M27-A3 (85) ve küf mantarları için M38-A2 (85) dökümanlarında belirtilmiş olan mikrodilüsyon yöntemleridir. Bunlardan küf-mikrodilüsyon yöntemi (M38-A2) son olarak 2008 yılında güncellenmiş olup dermatofit grubu küf mantarları için de standart test parametreleri içermektedir (86). Dermatofitlerin antifungal duyarlılık testleri ile ilgili yapılan sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır (87, 88).

Dermatofitozlarda Tedavi

Antifungal ilaçlar genellikle fungistatik etkili oldukları için dermatofit infeksiyonlarında -vücut bölgesine göre değişmekle birlikte- uzun süreli (özellikle tinea unguiumda), sabırlı ve düzenli tedavi uygulanması şarttır. Çoğu zaman topikal tedavi yeterli iken bazen sistemik antifungal ilaçların da kullanılması gerekmektedir. Mikonazol, klotrimazol, ekonazol, oksikonazol ve tiokonazol gibi azol türevleri topikal tedavide yaygın kullanılan ilaçlardır. Sistemik tedavide griseofulvin, ketokonazol, itrakonazol, flukonazol ve terbinafin gibi antifungal ilaçlar kullanılır (89).

BÖLÜM II

GEREÇ VE YÖNTEM

Kimyasal Ayıraçlar ve Besiyerleri

%20'lik Potasyum hidroksit (KOH) çözeltisi

20 gr KOH (Carlo Erba) 100 ml distile suya yavaşça eklenerek, kristaller tamamen eriyene kadar karıştırılmıştır.

10x TBE tamponu

50 gr Tris base (Sigma-Aldrich, ABD), 27,5 gr borik asit (Merck, Almanya), 20 ml 0,5 M Etilendiamintetraasetikasit (EDTA) (AmpliChem, Almanya) (pH:8,0)'nın 1 litre distile suda eritilmesiyle stok 10x TBE tamponu (Tris-Borik Asit-EDTA) hazırlanmıştır. Hazırlanan 10x TBE solüsyonunun distile su ile 1/20 oranında sulandırılması ile 0,5x TBE tampon kullanma solüsyonu hazırlanmıştır.

Sabouraud dekstroz agar (SDA) (BBL, Becton Dickinson, Fransa)

| | |
|----------|-------|
| Pepton | 10 gr |
| Dekstroz | 40 gr |
| Agar | 15 gr |

Bir litre distile su ile 65 g Sabouraud dekstroz agar hazır besiyeri içeriği karıştırılıp burgulu kapaklı cam tüplere yedişer ml dağıtılmış ve otoklavda 121⁰C'de 15 dakika steril edildikten sonra 30 derecelik açıyla eğik şekilde yatırılıp soğumaya bırakılmıştır.

Patates dekstroz agar (PDA) (BBL, Becton Dickinson, Fransa)

| | |
|-------------|-------|
| Patates özü | 4 gr |
| Dekstroz | 20 gr |
| Agar | 15 gr |

Bir litre distile su ile 39 gr patates dektroz agar hazır besiyeri içeriği karıştırılıp burgulu kapaklı cam tüplere yedişer ml dağıtılmış ve otoklavda 121⁰C'de 15 dakika sterilizasyondan sonra 30 derecelik açıyla eğik şekilde yatırılıp soğumaya bırakılmıştır.

Üre agar

| | |
|----------------------------|----------|
| Pepton | 1 gr |
| Glikoz | 1 gr |
| Sodyum klorür | 5 gr |
| Disodyum fosfat | 2.1 gr |
| Potasyum dihidrojen fosfat | 0.8 gr |
| Fenol kırmızısı | 0.012 gr |
| Agar | 12 gr |

Yüz mililitre distile su ile 2.1 gram hazır besiyeri içeriği karıştırıldıktan sonra, otoklavda 121⁰C'de 15 dakika steril edilmiştir. Besiyeri sıcaklığı yaklaşık 50⁰C'ye indiğinde üzerine 5 ml steril üre solüsyonu (LAB M, International Diagnostics Group plc, İngiltere) eklendikten sonra steril cam tüplere yedişer ml dağıtılmış ve otoklavda 121⁰C'de 15 dakika sterilizasyondan sonra 30 derecelik açıyla eğik bir şekilde yatırılıp soğumaya bırakılmıştır.

Dermatophyte agar (BBL, Becton Dickinson, Fransa)

| | |
|---------------------------------------|--------|
| Soya fasülyesi küspesi papaik dijesti | 10 gr |
| Glikoz | 10 gr |
| Fenol kırmızısı | 0.2 gr |
| Sikloheksimid | 0.5 gr |
| Gentamisin | 0.1 gr |
| Tetrasiklin-HCL | 0.1 gr |
| Agar | 20 gr |

Yukarıdaki içerik hazır besiyeri (petride) olarak temin edilmiştir.

Kalite Kontrol Suşları

Çalışmada kontrol amacı ile kullanılan suşlar, Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı Ulusal Tıp Kültür Koleksiyonu (RSKK) Laboratuvarından sağlanmıştır.

Aspergillus fumigatus RSKK 04005

Epidermophyton floccosum RSKK 03018

Trichophyton verrucosum RSKK 296

Trichophyton tonsurans RSKK 299

Trichophyton rubrum RSKK 486

Olguların Seçimi

Aydın Devlet hastanesi Dermatoloji Polikliniklerinden 01. 03. 2010- 30. 06. 2010 tarihleri arasında dermatofitoz ön tanısı ile Mikrobiyoloji laboratuvarına gönderilen 110 olgudan toplam 123 örnek (63 deri kazıntısı, 60 tırnak kazıntısı) çalışmaya alınmıştır. Lezyonun özelliği nedeni ile çalışmamız için yeterli miktarda örneğin alınamaması durumunda, ayrıca lokal ya da sistemik antifungal ilaç kullandığı öğrenilen olgular çalışma dışı bırakılmıştır.

Direkt mikroskopik inceleme, mantar kültürü, morfolojik tanımlama testleri ve moleküler testler Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarında yapılmıştır. Çalışma için yerel Etik Kurul onayı ve İl yerel yönetiminden izin alınmıştır

Örneklerin Alınması

Örnek alınacak bölge %70'lik etil alkol ile silinmiştir. Steril bistüri kullanılarak deri lezyonlarında lezyonun bittiği ve sağlam dokunun başladığı aktif kenardan, tırnak lezyonlarında yapının bozulduğu, renk değişikliği ve kalınlaşma saptanan yerlerden, saçlı deri örneklerinde saç telini içerecek şekilde kazıntı örneği alınmıştır (2). Örneklerin tümü aynı araştırmacı tarafından alınmıştır. Oda ısısında laboratuvara ulaştırılan örnekler üç kısma ayrılmış, ilk bölümden direkt mikroskopik inceleme, ikinci ve üçüncü bölümlerden mantar kültürü ve DNA izolasyon işlemleri yapılmıştır. Bu üç işlem aynı gün içinde gerçekleştirilmiştir.

Direkt Mikroskopik İnceleme

Temiz bir lam üzerine birkaç damla %20'lik KOH çözeltisi damlatılmış, üzerine bir miktar kazıntı örneği eklenerek karıştırılmış, üzerine lamel kapatılıp oda ısısında 15-20 dakika bekletilmiştir. Preparat mikroskopta x40 objektif ile incelenerek hif ve spor yapıları aranmıştır (23).

Mantar Kültürü

Kazıntı örneğinden bir miktar, steril öze ile alınmış, SDA ve PDA besiyerlerine batırılarak ekim yapılmış ve besiyerleri, 28⁰C'de iki aya kadar inkübasyona bırakılmıştır. Besiyerleri haftada üç kez mantar üremesi açısından kontrol edilmiştir. Besiyerinde üreyen suşlardan petrideki SDA, PDA ve dermatofit agar besiyerlerine pasaj yapılmış ve 28⁰C'de inkübasyona bırakılmıştır. Sabouraud dekstroz agar (SDA) ve PDA besiyerlerinde suşların üreme hızı, koloni morfolojisi, koloni yüzeyinin ve tabanının rengi incelenmiştir. Suşların dermatofit agar besiyerinde üreyip üremediği ve üreme sonrasında besiyerinde renk değişikliğinin olup olmadığı gözlenerek kaydedilmiştir (4).

Laktofenol Pamuk Mavisi Selofan Bant Yöntemi ile İnceleme

Besiyerinde üreyen suşların konidyospor ve hif yapısı selofan bant yöntemi ile incelenmiştir. Bunun için temiz bir lam üzerine birkaç damla laktofenol pamuk mavisi (Merck, Almanya) damlatılmış, selofan bandın yapışkan yüzü koloni üzerine hafifçe bastırılıp çekildikten sonra boya ile temas edecek şekilde lam üzerine yapıştırılmıştır. Hazırlanan preparat mikroskopta x10 ve x40 objektifler ile incelenmiştir (22).

Üreaz Testi

Kültürde üreyen kolonilerden kıvrık uçlu öze ile Christensen üre agar besiyerine pasaj yapılarak yedi gün boyunca oda ısısında inkübasyona bırakılmıştır. Besiyeri renginin koyu pembeye dönüşmesi durumunda test pozitif, renkte herhangi bir değişme olmaması durumunda negatif olarak değerlendirilmiştir (14).

***In-vitro* Kıl Delme Testi**

Bu deney için 1-2 cm boyunda kesilmiş olan bir miktar koyun kılı cam petri kutusuna konularak otoklavda 121⁰C’de 15 dakika steril edilmiş ve steril petri kutuları içine dağıtılmıştır. Her petriye 25 ml steril distile su ve %10’lık maya özütünden (Difco) 0.1 ml eklenmiş ve bunların üzerine test edilecek suşlar ekilerek 25-26⁰C’de 21 gün boyunca izlenerek inkübasyona bırakılmıştır. Üreme görüldükten sonra inkübasyonun bitimine kadar test edilen mantarın kılı delip delmediği 3-4 gün ara ile ışık mikroskopunda (x40 büyütme) kontrol edilmiştir. Bu amaçla bir lam üzerinde laktofenol pamuk mavisi içine birkaç koyun kılı konularak üzerine lamel kapatılıp hafifçe ısıtılarak preparat hazırlanmıştır (14).

Moleküler Testler

DNA ekstraksiyonu

Klinik örneklerden DNA ekstraksiyonu

Klinik örneklerden direkt DNA ekstraksiyonu, Brillowska-Dabrowska ve ark. (17)’nin bildirdiği yöntemle yapılmıştır.

1- 60 mM sodyum bikarbonat (NaHCO₃), 250 mM potasyum klorür (KCL) ve 50 mM Tris karışımından oluşan ekstraksiyon tamponu hazırlanmıştır (pH= 9,5).

2- Steril mikrosantrifüj tübü içine 100 µl ekstraksiyon tamponu ve üzerine kazıntı örneğinden yaklaşık 10 mg eklenmiştir.

3- Kuru ısı bloğunda (Techne, İngiltere) 95⁰C’de 10 dakika inkübasyona bırakılmıştır.

4- Tübe 100 µl % 2’lik sığır serum albumini (Difco) eklenmiş ve 5 saniye vorteks ile karıştırılmıştır.

5- Hazırlanan DNA ekstraksiyon ürünü çalışılana dek -20⁰C’de saklanmıştır.

Kültürlerden DNA ekstraksiyonu

Dermatofit kolonilerinden DNA ekstraksiyonu, “PureLink Genomic DNA Mini Kit” (Invitrogen, ABD) ile, kit protokolüne uygun olarak yapılmıştır.

1- Mikrosantrifüj tübü içine 180 µl dijesyon tamponu ve üreyen kolonilerden bir öze dolusu miçel konmuştur.

2- Karışım üzerine 20 µl proteinaz K eklenip karıştırılmıştır.

3- Karışım, kuru ısı bloğunda 55⁰C’de 1-4 saat inkübasyona bırakılmıştır.

- 4- Santrifüjde (Hettich Mikro 120 Zentrifugen, Almanya) 14000 devir/dk da 3 dakika çevrildikten sonra üst kısım yeni bir mikrosantrifüj tübüne aktarılmıştır.
- 5- Tübe 20 µl RNAaz A eklenip karıştırılmış ve oda ısısında 2 dakika inkübasyona bırakılmıştır.
- 6- Tübe 180 µl eritme/bağlama tamponu eklenmiş ve karıştırılmıştır.
- 7- Tübe 200 µl %96'lık etil alkol eklenmiş ve karıştırılmıştır.
- 8- Karışım toplama tüplerinin içindeki filtreli tüplere aktarılmıştır.
- 9- Santrifüjde 10000 devir/dk da 1 dakika çevrilmiştir.
- 10- Toplama tübü değiştirilmiş ve karışıma 500 µl yıkama tamponu 1 eklenip 10000 g de 1 dakika santrifüj edilmiştir.
- 11- Karışım yeni bir toplama tübüne aktarılmış ve 500 µl yıkama tamponu 2 eklenip 10000 g'de maksimum hızda 3 dakika santrifüj edilmiştir.
- 12- Toplama tübü atılmış ve filtreli tüp steril bir mikrosantrifüj tüpü içine yerleştirilmiştir.
- 13- Üzerine 100 µl elüsyon tamponu eklenip oda ısında 1 dakika inkübasyona bırakılmıştır.
- 14- Maksimum hızda 1,5 dakika santrifüj edilmiş, elde edilen ekstraksiyon ürünü çalışılana dek -20⁰C'de saklanmıştır.

Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR)

Çalışmada kullanılan PZR şartları Tablo III'te sunulmuştur.

Tablo III: Polimeraz zincir reaksiyonu şartları

| | PZR | Primer adı | Primer dizisi | Hedef gen bölgesi | PZR ürünü büyüklüğü (Baz çifti:bç) | PZR karışımı [HelixAmp Taq DNA polimerase kit (NanoHelix, South Korea) kullanılmıştır] | Isı-döngü cihazı (Mikrosantrifüj Mastercycler Gradient, Germany) programı | Kaynak |
|----------------------------------|---------------------------|--------------------------|---|--------------------------|---|---|--|-------------------|
| Pan-Dermatofit nested PZR | İlk tur PZR (CHS1 PZR) | CHS1 1S CHS1 1R | 5'-CATCGAGTACATGTGCTCGC- 3' 5'-CTCGAGGTCAAAGCACGCC- 3' | <i>CHS1</i> geni | 435 | 5 µl 10x Taq buffer, 4 µl 5x TuneUP solüsyonu, 1 µl dNTP mix (10 mM), 1 µl her bir primerden (10 pmol), 1.25 U Taq polimeraz, 5 µl ekstrakte DNA, Toplam hacim 50 µl olana kadar steril distile su | 94 ⁰ C'de 3 dk ön denatürasyonun ardından 30 döngü olacak şekilde, 94 ⁰ C'de 1 dk denatürasyon, 60 ⁰ C'de 75 sn yapışma, 72 ⁰ C'de 2 dk uzama ve 72 ⁰ C'de 7 dk son uzama | Garg ve ark. 2009 |
| | Pan-dermatofit nested PZR | JF 2 JR 2 | 5'- GCAAAGAAGCCTGGAAGAAG- 3' 5'- CTCGAGGTCAAAGCACGCC- 3' | <i>CHS1</i> geni | 288 | 5 µl 10x Taq buffer, 4 µl 5x TuneUP solüsyonu, 1 µl dNTP mix (10 mM), 1 µl her bir primerden (10 pmol), 1.25 U Taq polimeraz, 5 1/6 oranında sulandırılmış ilk PZR(ITS 1 PZR) ürünü, Toplam hacim 50 µl olana kadar steril distile su | 94 ⁰ C'de 3 dk ön denatürasyonun ardından 40 döngü olacak şekilde, 94 ⁰ C'de 1 dk denatürasyon, 63 ⁰ C'de 75 sn yapışma, 72 ⁰ C'de 2 dk uzama ve 72 ⁰ C'de 7 dk son uzama | Garg ve ark. 2009 |

CHS1: *Kitin sentaz 1* geni

Tablo III'ün devamı

| | PZR | Primer adı | Primer dizisi | Hedef gen bölgesi | PZR ürünü büyüklüğü (Baz çifti:bç) | PZR karışımı [HelixAmp Taq DNA polimerase kit (NanoHelix, South Korea) kullanılmıştır] | Isı-döngü cihazı (Mastercycler Gradient, Germany) programı | Kaynak |
|---|---|--|---|-------------------|--|---|---|---------------------|
| <i>Trichophyton rubrum</i> / <i>T. mentagrophytes</i> - spesifik nested PZR | İlk tur PZR (ITS 1 PZR) | 18S F1 58S R1 | 5'-AGGTTTCCGTAGGTGAACCT-3' 5'-TTCGCTGCGTTCTTCATCGA-3' | ITS 1 bölgesi | 300 | 5 µl 10x Taq buffer, 4 µl 5x TuneUP solüsyonu, 1 µl dNTP mix (10 mM), 1 µl her bir primerden (10 pmol), 1.25 U Taq polimeraz, 5 µl ekstrakte DNA, Toplam hacim 50 µl olana kadar steril distile su | 94°C'de 4 dk ön denatürasyonun ardından 30 döngü olacak şekilde, 94°C'de 1 dk denatürasyon, 55°C'de 2 dk yapışma, 72°C'de 90 sn uzama ve 72°C'de 10 dk son uzama | Uchida ve ark. 2009 |
| | <i>Trichophyton rubrum</i> -spesifik nested PZR | Rub F1 Rub R1 | 5'- CCATTCTTGTCTACCTACC- 3' 5'- CTCAGACTGACAGCTCTTCA -3 | ITS 1 bölgesi | 150 | 5 µl 10x Taq buffer, 4 µl 5x TuneUP solüsyonu, 1 µl dNTP mix (10 mM), 1 µl her bir primerden (10 pmol), 1.25 U Taq polimeraz, 5 µl 1/100 oranında sulandırılmış ilk PZR (ITS 1 PZR) ürünü, Toplam hacim 50 µl olana kadar steril distile su | 94°C'de 4 dk ön denatürasyonun ardından 30 döngü olacak şekilde, 94°C'de 1 dk denatürasyon, 60°C'de 15 sn yapışma, 72°C'de 15 sn uzama ve 72°C'de 10 dk son uzama | Uchida ve ark. 2009 |
| | <i>Trichophyton mentagrophytes</i> -spesifik nested PZR | Van F1 Van R1 | 5'- ACGATAGGGCCAAACGTCCG -3' 5'- TCCAGCGTTGAGCCACTAAAG -3' | ITS 1 bölgesi | 150 | 5 µl 10x Taq buffer, 4 µl 5x TuneUP solüsyonu, 1 µl dNTP mix (10 mM), 1 µl her bir primerden (10 pmol), 1.25 U Taq polimeraz, 5 1/100 oranında sulandırılmış ilk PZR (ITS 1 PZR) ürünü, Toplam hacim 50 µl olana kadar steril distile su | 94°C'de 4 dk ön denatürasyonun ardından 30 döngü olacak şekilde, 94°C'de 1 dk denatürasyon, 60°C'de 15 sn yapışma, 72°C'de 15 sn uzama ve 72°C'de 10 dk son uzama | Uchida ve ark. 2009 |
| Gliser Aldehit 3 Fosfat Dehidrogenaz (GA3PD) PZR (Kontrol PZR) | GA3PDs GA3PDr | 5'-TGGTATCGTGGAAGGACTCATGAC-3' 5'-ATGCCAGTGAGCTTCCCGTTCAGC-3' | GA3PD gen bölgesi | 300 | 5 µl 10x Taq buffer, 4 µl 5x TuneUP solüsyonu, 1 µl dNTP mix (10 mM), 1 µl her bir primerden (10 pmol), 1.25 U Taq polimeraz, 5 µl ekstrakte DNA, Toplam hacim 50 µl olana kadar steril distile su | 94°C'de 4 dk ön denatürasyonun ardından 30 döngü olacak şekilde, 94°C'de 1dk denatürasyon, 60°C'de 1 dk yapışma, 72°C'de 30 sn uzama | Johnson ve ark. 1994 | |

ITS1: *Internal transcribed spacer 1* bölgesi

Agaroz jel elektroforezi

1- Üç gram agar (Basica Le, Prona, İspanya) 150 ml 0.5x TBE tamponuna ilave edilerek % 2'lik agaroz jel hazırlanmıştır. DNA'ların görüntülenebilmesi amacı ile 0.5x TBE içinde agaroz eritildikten sonra içine 15 µl SYBR Safe (İnvitrogen, ABD) eklenmiştir.

2- On mikrolitre PZR ürünü alınıp 2 µl yükleme boyası "loading dye" (İnvitrogen, USA) ile karıştırılmış ve jel üzerindeki kuyucuklarına dağıtılmıştır.

3- İçerisinde 0.5x TBE tamponu bulunan tankta (Thermo, ABD) 80 voltta 1 saat elektroforez uygulanmıştır.

4- Ortaya çıkan DNA bantları jel görüntüleme cihazı (Vilber Lourmat, Fransa) ile görüntülenmiştir.

Dizi analizi

T. rubrum/*T. mentagrophytes*-spesifik nested PZR ile *T. rubrum* olarak tanımlanan suşlardan birine (117 no'lu suş) ve *T. mentagrophytes* olarak tanımlanan suşlardan birine (88 no'lu suş) Laboratuvarımızda dizi analizi uygulanmıştır.

Pürifikasyon

Amplikonlar pureLink PZR pürifikasyon kiti (İnvitrogen, ABD) kullanılarak üretici firma önerilerine göre saflaştırılmıştır.

1. Amplikonların tamamı yeni mikrosantrifüj tüplerine dağıtılıp üzerine dört kat olacak şekilde bağlama tamponu eklenmiş ve karışım kit içerisinde bulunan filtreli tüplere aktarılmıştır.

2. Filtreli tüpler 10000 g'de bir dakika santrifüj edildikten sonra toplama tüpleri boşaltılıp filtreli tüplerin üzerine 650 µl yıkama tamponu (W1) eklenmiştir.

3. Santrifüjde 10000 g'de bir dakika çevrilmiş, toplama tüpü boşaltıldıktan sonra tekrar 14000 g'de iki dakika daha çevrilmiştir.

4. Filtreli tüpler elüsyon tüplerine konulup 50 µl elüsyon tamponu eklenmiş ve oda ısısında bir dakika inkübasyona bırakılmıştır.

5. Santrifüjde 14000 g'de iki dakika çevrilmiş ve elde edilen pürifiye DNA dizi analizi için yapılan PZR'da kullanılmıştır.

Dizi analizi öncesi PZR ve presipitasyon, dizi analizi kiti (Beckman Coulter, CA, ABD) kullanılarak üretici firma önerilerine göre yapılmıştır.

Dizi analizi PZR'ı

Dizi analizi PZR'ı için 20 µl son hacimde, 11 µl premiks, 2 µl dizi analizi primeri ve 3 µl pürifiye DNA ile karışım hazırlanmış, ısı döngü cihazında amplifikasyon (30 döngü olacak şekilde, 60⁰C'de 20 saniye denatürasyon, 50⁰C'de 20 saniye yapışma, 60⁰C'de 4 dakika uzama) uygulanmıştır.

Presipitasyon

1. Mikrosantrifüj tübü içinde karışım hazırlanmış [örnek başına; 2 µl 3 mM sodyum-asetat (pH:5,2), 2 µl 100 mM EDTA (pH 8), 1 µl glikojen] örnek tüplerine beşer mikrolitre dağıtılmıştır.

2. Üzerine PZR ürünlerinin tamamı konularak iyice karıştırılmış ve 60 µl % 95'lik soğuk etanol eklenip santrifüjde 14000 g'de +4⁰C'de 15 dakika çevrilmiştir.

3. Üst kısım atılıp dipte pellet bırakılmış ve üzerine 200 µl % 70'lik soğuk etanol eklenip 14000 g'de +4⁰C'de 4 dakika santrifüj edilmiştir.

4. Üst kısım alınıp dipte kalan pellet oda ısısında 30 dakika kurutulmuştur.

Pellet, 40 µl "sample loading solution" (SLS) ile karıştırılarak CEQ 8000 genetic analysis system (Becman Coulter, CA, ABD) ile üretici firma önerilerine göre dizi analizi yapılmıştır. Elde edilen dizilere göre tanımlama nükleotid BLAST programı (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) ile gen bankasındaki nükleotid dizilerinin karşılaştırılması ile yapılmıştır (yaklaşık 288 baz çifti (bç) büyüklüğündeki gen bölgesi dizileri karşılaştırılmış ve % 99-% 100 oranında homoloji saptanmıştır).

Pan-dermatofit PZR'da pozitif sonuç veren fakat *T. rubrum*/*T. mentagrophytes*-spesifik nested PZR ile negatif sonuç veren üç örneğe (18, 53 ve 114 nolu örnek) , *T. rubrum* olarak tanımlanan iki suşa (72, 106 no'lu suşlar) ve *T. mentagrophytes* olarak tanımlanan bir suşa (80 no'lu suş) da ticari bir firma (Macrogen, Korea) tarafından dizi analizi uygulanmıştır.

İstatistiksel Analiz

Verilerin istatistiksel analizi için SPSS 14.0 paket programı kullanılmıştır. Oranlar arasındaki farkın anlamlılığını belirlemede ki-kare testi, yöntemler arasındaki uyumu belirlemede kappa testi kullanılmıştır.

BÖLÜM III

BULGULAR

Aydın Devlet Hastanesi Dermatoloji Polikliniğinde 01. 03. 2010- 30. 06. 2010 tarihleri arasında muayene olmuş ve dermatofitoz ön tanısı ile aynı hastanenin Mikrobiyoloji Laboratuvarına gönderilmiş 110 hastanın (69'u kadın, 41'i erkek) toplam 123 örneği (63 deri kazıntısı, 60 tırnak kazıntısı örneği) çalışmaya alınmıştır. Örnek alınmasından sonraki tüm işlemler Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarında yapılmıştır.

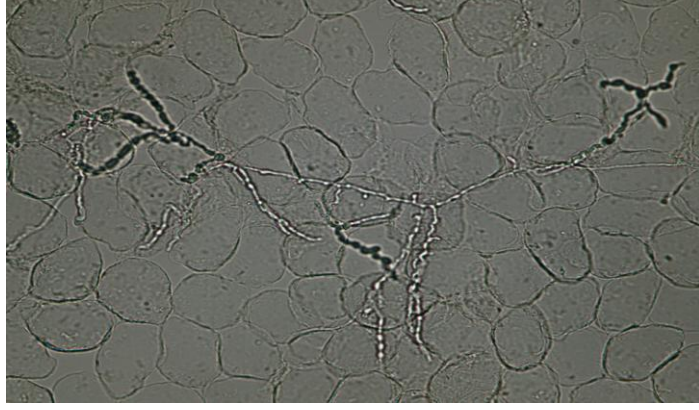
Çalışma kapsamına alınan 123 örneğin 76 (% 61,8)'sı kadın hastalardan, 47 (% 38,2)'si erkek hastalardan alınmıştır. Hastaların yaşları 4-82 (ortalama 44,85±16,39) arasında değişmektedir.

Örnekler en fazla ayaktaki lezyonlardan alınmıştır (Tablo IV).

Tablo IV: Örneklerin alındıkları bölgelere göre dağılımı

| ÖRNEĞİN ALINDIĞI BÖLGE | SAYI (%) |
|------------------------|-------------|
| Ayak tırnağı | 52 (% 42,3) |
| Ayak derisi | 31 (% 25,2) |
| Gövde derisi | 20 (% 16,2) |
| El tırnağı | 8 (% 6,5) |
| El derisi | 7 (% 5,7) |
| Saçlı deri | 3 (% 2,4) |
| İnguinal bölge derisi | 2 (% 1,7) |
| Toplam | 123 |

Örneklerin direkt mikroskopik olarak incelenmesi sonucunda 62 (% 50,4)'sinde hif ve/veya spor yapıları görülmüş (Resim 6), 30 (% 24,4)'unda mantar kültüründe üreme olmuştur (Resim 7).

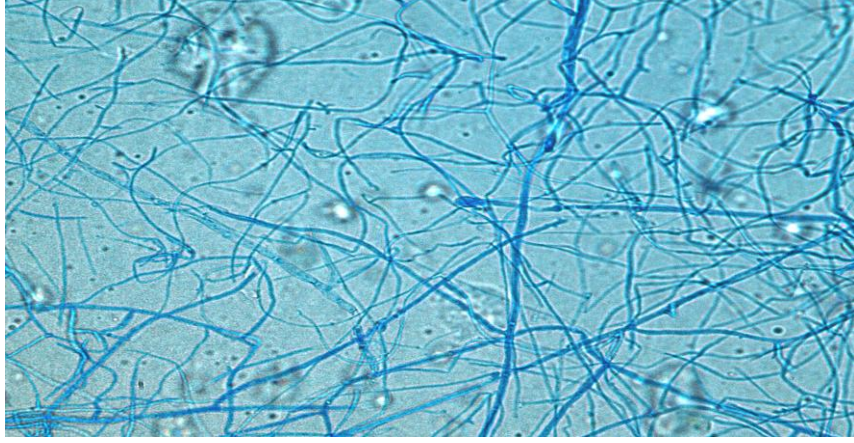


Resim 6: KOH ile hazırlanmış preparatta hif yapıları (20 nolu örnek) (x40 büyütme objektif).

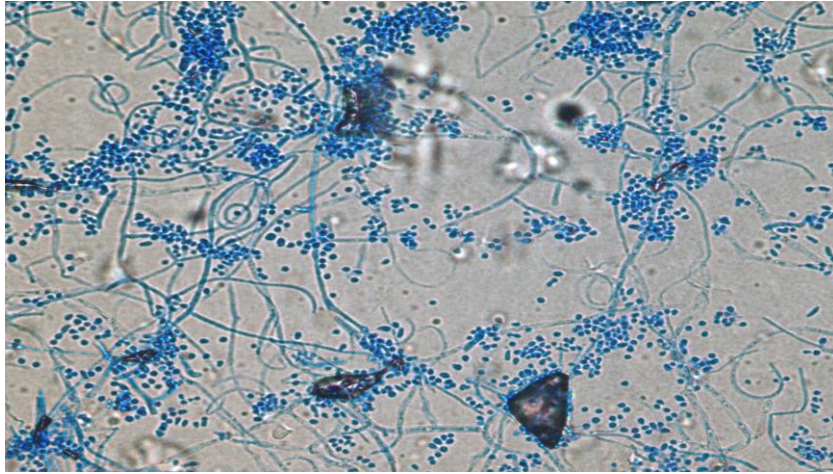


Resim 7: Mantar kültüründe üremiş olan bazı dermatofit suşları (44, 67, 95, 100, 106, 107, 111 no'lu suşlar).

Suşların laktofenollü pamuk mavisi ile incelenmesi sonucunda 28'inin *T. rubrum* (Resim 8), ikisinin *T. mentagrophytes* olduğu düşünülmüştür (Resim 9).



Resim 8: Selofan bant yöntemi ile hazırlanmış preparatın mikroskopik görünümü, 20 no'lu no'lu suş (x40 büyütme objektif).



Resim 9: Selofan bant yöntemi ile hazırlanmış preparatın mikroskopik görünümü, 88 no'lu suş (x40 büyütme objektif).

Direkt mikroskopisi negatif bulunan örneklerin tümünde kültürde üreme saptanmazken, direkt mikroskopik incelemesinde mantar elemanları görülen örneklerin 32'sinin kültüründe üreme saptanmamıştır (Tablo V).

Tablo V: Örneklerin direkt mikroskopi ve kültür sonuçlarının karşılaştırılması

| | | Kültür | | Toplam |
|-------------------|---------|---------|---------|--------|
| | | Negatif | Pozitif | |
| Direkt mikroskopi | negatif | 61 | 0 | 61 |
| | pozitif | 32 | 30 | 62 |
| Toplam | | 93 | 30 | 123 |

Direkt mikroskopik inceleme ile klinik örneklerden direkt yapılan pan-dermatofit nested PZR ve *T. rubrum/ T. mentagrophytes*-spesifik nested PZR sonuçlarının karşılaştırılması Tablo VI'da sunulmuştur.

Tablo VI: Örneklerin direkt mikroskopik inceleme sonuçları ile pan-dermatofit nested PZR ve *T. rubrum/T. mentagrophytes*-spesifik nested PZR sonuçlarının karşılaştırılması

| | | Pan-dermatofit nested PZR | | <i>T. rubrum/ T. mentagrophytes</i> -spesifik nested PZR | | Toplam |
|-------------------|---------|---------------------------|---------|--|---------|--------|
| | | Negatif | Pozitif | Negatif | Pozitif | |
| Direkt mikroskopi | Negatif | 52 | 9 | 53 | 8 | 61 |
| | Pozitif | 4 | 58 | 5 | 57 | 62 |
| Toplam | | 56 | 67 | 58 | 65 | 123 |

Mantar kültüründe alınan sonuçlar ile klinik örneklerden direkt yapılan pan-dermatofit nested PZR ve *Trichophyton rubrum/ T. mentagrophytes*-spesifik nested PZR sonuçlarının karşılaştırılması Tablo VII'da sunulmuştur. Kültüründe *T. rubrum* üreyen iki örnekten direkt yapılan Pan dermatofit PZR sonucu negatif bulunmuştur. Bu örneklerden biri aynı zamanda direkt *T. rubrum/ T. mentagrophytes*-spesifik nested PZR ile de negatif sonuç vermiştir. Bununla birlikte bu iki örnekte direkt mikroskopik inceleme ile mantar elemanları görülmüştür.

Tablo VII: Örneklerin mantar kültürü sonuçları ile pan-dermatofit nested PZR ve *Trichophyton rubrum*/*T. mentagrophytes*-spesifik nested PZR sonuçlarının karşılaştırılması

| | | Pan-dermatofit nested PZR | | <i>T. rubrum</i> / <i>T. mentagrophytes</i> -spesifik nested PZR | | Toplam |
|--------|---------|---------------------------|---------|--|---------|--------|
| | | Negatif | Pozitif | Negatif | Pozitif | |
| Kültür | Negatif | 54 | 39 | 57 | 36 | 93 |
| | Pozitif | 2 | 28 | 1 | 29 | 30 |
| Toplam | | 56 | 67 | 58 | 65 | 123 |

Mantar kültüründe üreme ilk olarak 8-17. (ort 12,33±2,23) günlerde saptanmıştır. Kolonilerin olgunlaşması ortalama bir hafta sürmüştür. Kültürde üreyen 30 suşun makroskopik, mikroskopik ve fizyolojik özelliklerine göre 28'i *T. rubrum*, ikisi *T. mentagrophytes* olarak tanınmıştır (Tablo VIII).

Tablo VIII: Kültürde üreyen suşların morfolojik inceleme ve fenotipik identifikasyon sonuçları

| Örnek no | Koloni yüzey görünümü ve rengi | Koloni tabanı rengi | Üreaz testi | Kıl delme testi | Fenotipik identifikasyon |
|----------|--------------------------------|---------------------|-------------|-----------------|----------------------------|
| 6 | Pamuğumsu, beyaz | Kırmızı | Negatif | Negatif | <i>Trichophyton rubrum</i> |
| 12 | Pamuğumsu, beyaz | Kırmızı | Pozitif | Negatif | <i>Trichophyton rubrum</i> |
| 20 | Pamuğumsu, beyaz | Kırmızı | Negatif | Negatif | <i>Trichophyton rubrum</i> |
| 25 | Pamuğumsu, beyaz | Kırmızı | Negatif | Negatif | <i>Trichophyton rubrum</i> |
| 30 | Pamuğumsu, beyaz | Kırmızı | Negatif | Negatif | <i>Trichophyton rubrum</i> |
| 37 | Pamuğumsu, beyaz | Kırmızı | Negatif | Negatif | <i>Trichophyton rubrum</i> |
| 40 | Pamuğumsu, beyaz | Kırmızı | Negatif | Negatif | <i>Trichophyton rubrum</i> |
| 41 | Pamuğumsu, beyaz | Kırmızı | Negatif | Negatif | <i>Trichophyton rubrum</i> |
| 44 | Pamuğumsu, beyaz | Kırmızı | Negatif | Negatif | <i>Trichophyton rubrum</i> |
| 45 | Pamuğumsu, beyaz | Kırmızı | Negatif | Negatif | <i>Trichophyton rubrum</i> |
| 51 | Pamuğumsu, beyaz | Kırmızı | Negatif | Negatif | <i>Trichophyton rubrum</i> |
| 52 | Pamuğumsu, beyaz | Kırmızı | Negatif | Negatif | <i>Trichophyton rubrum</i> |
| 57 | Pamuğumsu, beyaz | Kırmızı | Negatif | Negatif | <i>Trichophyton rubrum</i> |
| 67 | Pamuğumsu, beyaz | Kırmızı | Negatif | Negatif | <i>Trichophyton rubrum</i> |
| 69 | Pamuğumsu, beyaz | Kırmızı | Negatif | Negatif | <i>Trichophyton rubrum</i> |

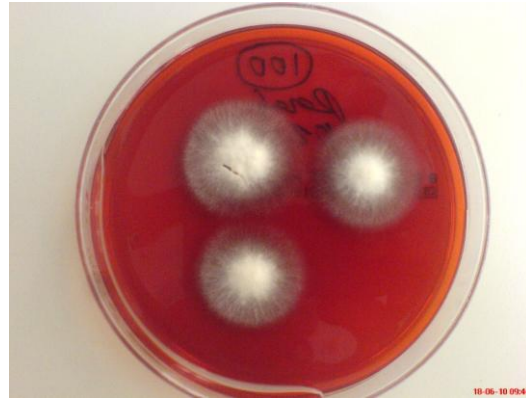
Tablo VIII'in devamı

| Örnek no | Koloni yüzey görünümü ve rengi | Koloni dip pigmentasyonu | Üreaz testi | Kıl delme deneyi | Fenotipik identifikasyon sonucu |
|-----------------|---------------------------------------|---------------------------------|--------------------|-------------------------|--|
| 71 | Pamuğumsu, beyaz | Kırmızı | Negatif | Negatif | <i>Trichophyton rubrum</i> |
| 79 | Pamuğumsu, beyaz | Kırmızı | Negatif | Negatif | <i>Trichophyton rubrum</i> |
| 80 | Pamuğumsu, beyaz | Kırmızı-kahverengi | Pozitif | Negatif | <i>Trichophyton mentagrophytes</i> |
| 81 | Pamuğumsu, beyaz | Kırmızı | Negatif | Negatif | <i>Trichophyton rubrum</i> |
| 88 | Pudramsı, beyaz | Kırmızı-kahverengi | Pozitif | Negatif | <i>Trichophyton mentagrophytes</i> |
| 89 | Pamuğumsu, beyaz | Kırmızı | Negatif | Negatif | <i>Trichophyton rubrum</i> |
| 95 | Pamuğumsu, beyaz | Kırmızı | Negatif | Negatif | <i>Trichophyton rubrum</i> |
| 100 | Pamuğumsu, beyaz | Kırmızı | Negatif | Negatif | <i>Trichophyton rubrum</i> |
| 106 | Pamuğumsu, beyaz | Kırmızı | Negatif | Negatif | <i>Trichophyton rubrum</i> |
| 107 | Pamuğumsu, beyaz | Kırmızı | Negatif | Negatif | <i>Trichophyton rubrum</i> |
| 111 | Pamuğumsu, beyaz | Kırmızı | Negatif | Negatif | <i>Trichophyton rubrum</i> |
| 117 | Pamuğumsu, beyaz | Kırmızı | Negatif | Negatif | <i>Trichophyton rubrum</i> |
| 118 | Pamuğumsu, beyaz | Kırmızı | Negatif | Negatif | <i>Trichophyton rubrum</i> |
| 119 | Pamuğumsu, beyaz | Kırmızı | Negatif | Negatif | <i>Trichophyton rubrum</i> |
| 121 | Pamuğumsu, beyaz | Kırmızı | Negatif | Negatif | <i>Trichophyton rubrum</i> |

Üreaz testi suşların 27'sinde negatif, üçünde (12, 80 ve 88 no'lu örnekler) pozitif bulunmuştur. Üreaz pozitif suşlardan biri *T.rubrum* (12 no'lu suş)'dur (Resim 10). Kıl delme testi suşların hepsinde negatif bulunmuştur. *Trichophyton mentagrophytes* suşları (80 ve 88 no'lu örnekler) üreaz pozitif olmasına rağmen kıl delme deneyi negatif bulunmuştur. Suşların hepsi Dermatofit agarda üremiş ve bu besiyerinin rengini kırmızıya çevirmiştir (Resim 11). Kültürde üreyen suşların hepsinde PDA'da kırmızı ya da kırmızı-kahverengi pigment oluşumu gözlenmiştir.



Resim 10: 6, 12 ve 20 no'lu suşların üreaz testi (12 no'lu suş üreaz pozitif).

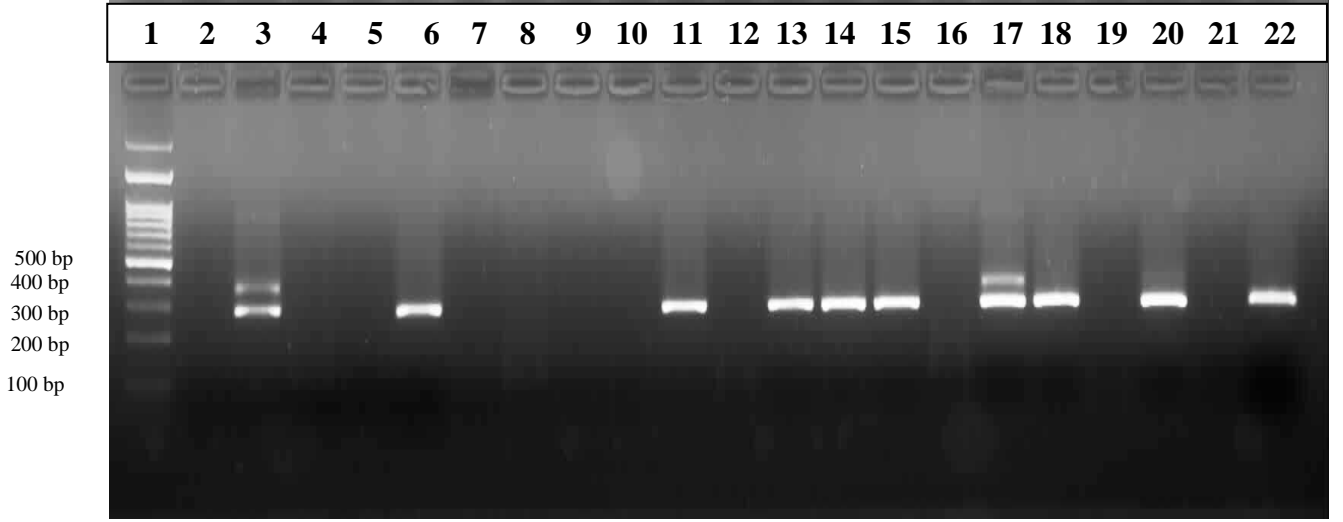


Resim 11: Dermatofit agarda üreyen 100 no'lu suşun koloni görünümü

Mantar kültüründe üreyen suşlar, Pan-dermatofit nested PZR ve *Trichophyton rubrum*/*T. mentagrophytes*-spesifik nested PZR ile pozitif bulunmuştur. *Trichophyton rubrum*/*T. mentagrophytes*-spesifik nested PZR'da suşların 28'i *T. rubrum*, ikisi *T.*

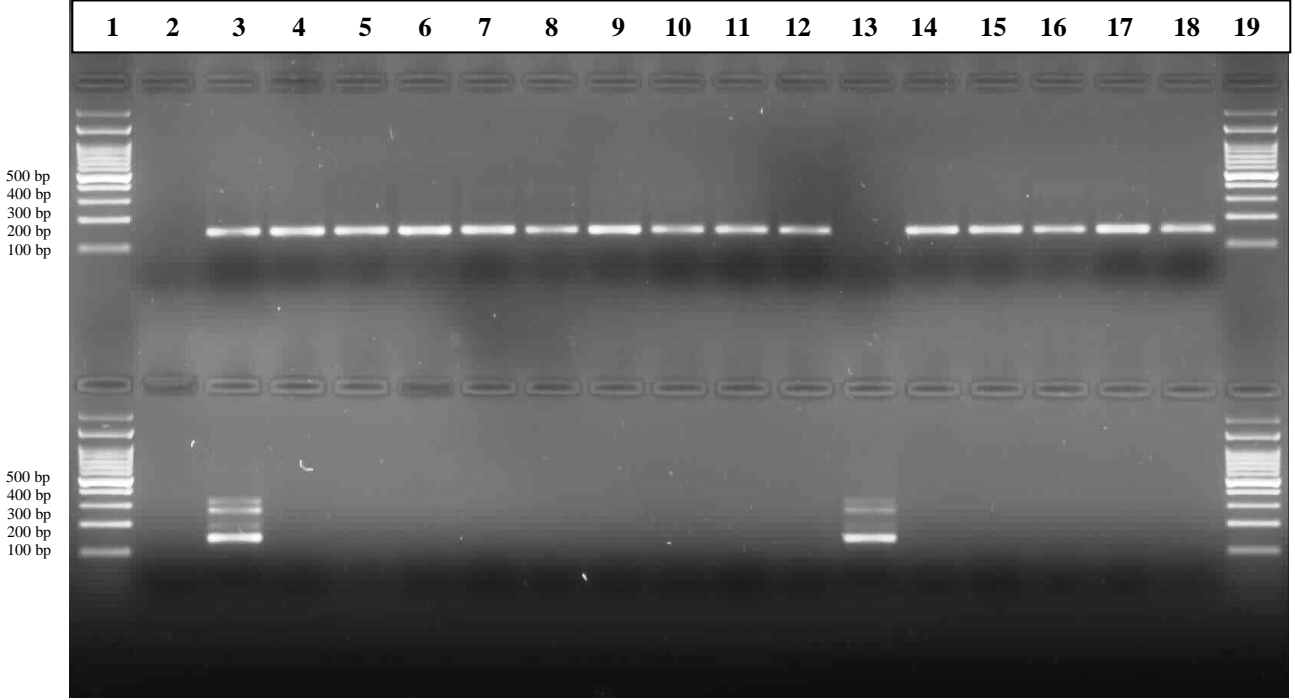
mentagrophytes için spesifik band oluşturmuş, böylece klasik yöntemlerle alınan identifikasyon sonuçları ile aynı sonuçlar alınmıştır.

Çalışmaya alınan 123 örneğin PZR ile incelenmesinde; pan-dermatofit nested PZR; örneklerin 67 (% 55,5)'sinde pozitif bulunmuştur (Resim 12).



Resim 12: Klinik örneklerin pan-dermatofit nested PZR sonuçları. 1, 100 bp DNA ladder; 2, negatif kontrol; 3, pozitif kontrol (288 bp); 4, 5, 7-10, 12, 16, 19, 21, nested PZR negatif örnekler; 6, 11, 13-15, 17, 18, 20, 22, nested PZR pozitif örnekler.

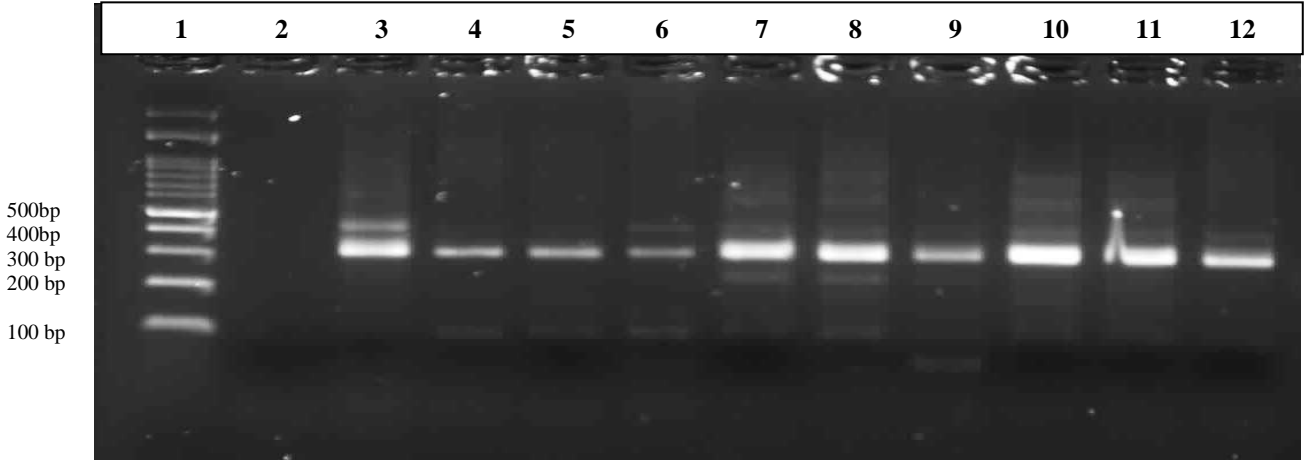
Trichophyton rubrum/*T. mentagrophytes*-spesifik nested PZR; örneklerin 65 (%52,8)'inde pozitif (60'ı *T. rubrum*, 5'i *T. mentagrophytes*) bulunmuştur (Resim 13).



Resim 13: Klinik örneklerin *T. rubrum*/*T. mentagrophytes*-spesifik nested PZR sonuçları (üst sıra, *T. rubrum*-spesifik nested PZR sonuçları; alt sıra *T. mentagrophytes*-spesifik nested PZR sonuçları). 1, 19, 100 bp DNA ladder; 2, negatif kontrol; 3, pozitif kontrollere (üstte *T. rubrum*, altta *T. mentagrophytes*) (150 bp); 13, *T. rubrum*-spesifik nested PZR negatif, *T. mentagrophytes*-spesifik nested PZR pozitif örnek; 4-12, 14-18, *T. rubrum*-spesifik nested PZR pozitif, *T. mentagrophytes*-spesifik nested PZR negatif örnekler.

Kültür ve nested PZR yöntemlerinin beraber değerlendirilmesinde yöntemlerin en az biri ile alınan sonuçlara göre örneklerin 69 (% 56,1)'unda dermatofit saptanmıştır. Bu örneklerin alındığı 60 olgunun (yedi hastadan ikişer, bir hastadan üç örnek alınmıştır) 30 (% 50)'u erkek, 30 (% 50)'u kadındır. Olguların yaşı ortalama yaşı 47,01±16,96 olarak hesaplanmıştır. Dermatofitlerin 64 (% 92.8)'ü *T. rubrum*, beşi (% 7.2) *T. mentagrophytes*'dir. Aynı hastaların farklı bölgelerinden alınan pozitif örneklerin tümünde *T. rubrum* saptanmıştır.

Örneklerden elde edilen ekstraksiyon ürünlerinde DNA varlığını tesbit etmek için yapılan ve Gliseraldehit 3 fosfat dehidrogenaz (GA3PD) enzimini kodlayan gen bölgesini hedefleyen PZR, tüm örneklerde pozitif bulunmuştur (Resim 14).



Resim 14: Klinik örneklerden bazılarının GA3PD PZR sonuçları. 1, 100 bp DNA ladder; 2, negatif kontrol; 3-12, pozitif örnekler.

Trichophyton rubrum/T. mentagrophytes-spesifik nested PZR'la *T. rubrum* olarak pozitif bulunan bir örnek (71 nolu örnek), Pan-dermatofit nested PZR'la negatif bulunmuştur. Buna karşın, Pan-dermatofit nested PZR'la pozitif bulunan üç örnek (18, 53, 114 nolu örnekler), *Trichophyton rubrum/Trichophyton mentagrophytes*-spesifik nested PZR'la negatif bulunmuştur (Tablo IX).

Tablo IX: Pan-dermatofit nested PZR ile *T. rubrum/ T. mentagrophytes*-spesifik nested PZR sonuçlarının karşılaştırılması

| | | <i>T. rubrum/ T. mentagrophytes</i> -spesifik nested PZR | | Toplam |
|---------------------------|---------|--|---------|--------|
| | | Negatif | Pozitif | |
| Pan-dermatofit nested PZR | Negatif | 55 | 1 | 56 |
| | Pozitif | 3 | 64 | 67 |
| Toplam | | 58 | 65 | 123 |

Deri ve tırnak örneklerin direkt mikroskopi, kültür ve PZR sonuçlarının karşılaştırılması Tablo X’da sunulmuştur.

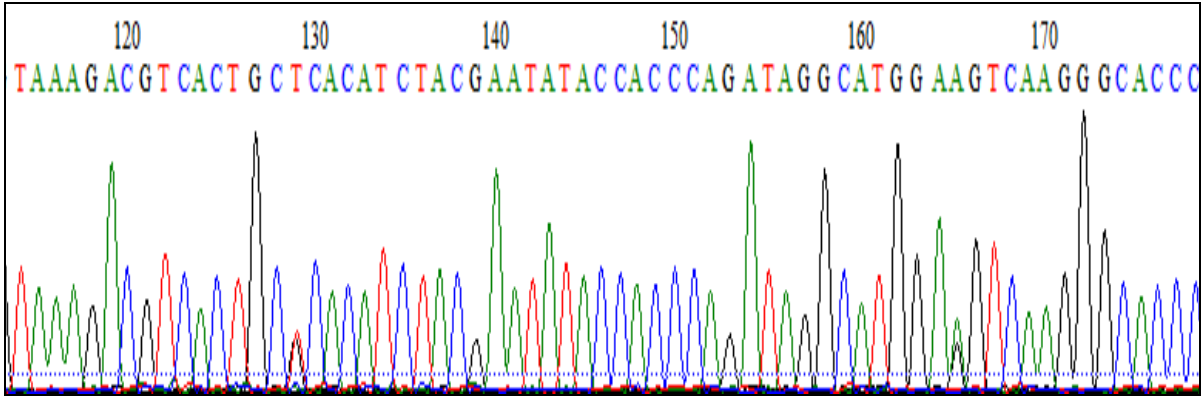
Tablo X: Deri ve tırnak örneklerinin direkt mikroskopik inceleme, kültür ve PZR sonuçlarının karşılaştırılması

| | | | Pan-dermatofit nested PZR <i>T.rubrum/T. mentagrophytes</i> -spesifik nested PZR | | | | |
|-------------------|------------------------------------|---------------|---|---------------------------|-------|--|-------|
| Örnek Türü (sayı) | Direkt mikroskopik inceleme (sayı) | Kültür (sayı) | PZR | Pan-dermatofit nested PZR | | <i>T.rubrum/T. mentagrophytes</i> -spesifik nested PZR | |
| | | | | Sayı | % | Sayı | % |
| Deri (63) | Negatif (38) | Negatif (45) | Negatif | 32 | 84,2 | 32 | 84,2 |
| | | | Pozitif | 6 | 15,8 | 6 | 15,8 |
| | Pozitif (25) | Negatif (45) | Pozitif | 7 | 100,0 | 7 | 100,0 |
| | | | Negatif | 2 | 11,1 | 1 | 5,6 |
| | | | Pozitif | 16 | 88,9 | 17 | 94,4 |
| | | | Pozitif | 16 | 88,9 | 17 | 94,4 |
| Tırnak (60) | Negatif (23) | Negatif (48) | Negatif | 20 | 87,0 | 21 | 91,3 |
| | | | Pozitif | 3 | 13,0 | 2 | 8,7 |
| | Pozitif (37) | Negatif (48) | Negatif | 2 | 8,0 | 4 | 16,0 |
| | | | Pozitif | 23 | 92,0 | 21 | 84,0 |
| | | | Pozitif | 12 | 100,0 | 12 | 100,0 |
| | | | Pozitif | 12 | 100,0 | 12 | 100,0 |

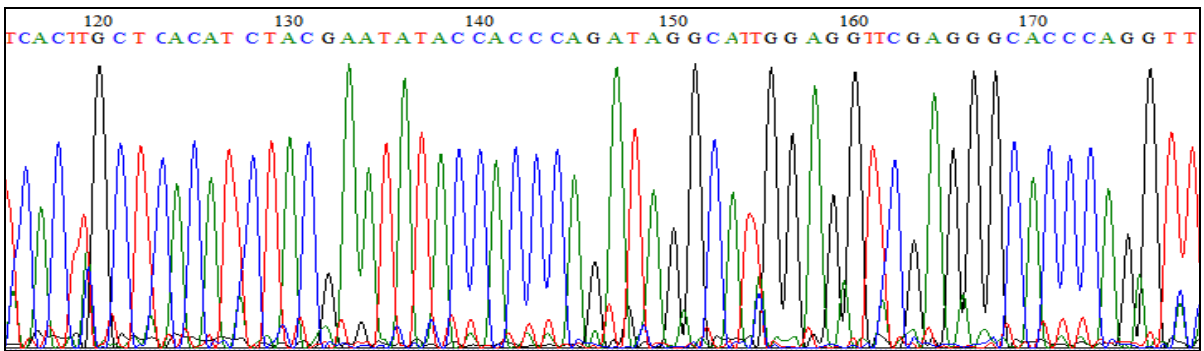
Direkt mikroskopik incelemede tırnak örneklerinde pozitiflik oranı deri örneklerine göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p=0.015$). Kültür ve PZR yöntemleri ile incelemelerde bu iki örnek türü arasında anlamlı bir farka rastlanmamıştır ($p>0.05$). Direkt mikroskopi ve kültür yöntemleri arasında orta düzeyde (kappa değeri=0,48), direkt mikroskopi ile pan-dermatofit nested PZR arasında iyi düzeyde (kappa değeri=0,78), direkt mikroskopi ile *Trichophyton rubrum/ T. mentagrophytes*-spesifik nested PZR arasında iyi düzeyde (kappa değeri=0,78), kültür ile pan-dermatofit nested PZR arasında ortanın altı düzeyde (kappa değeri=0,36), kültür ile *Trichophyton rubrum/ T. mentagrophytes*-spesifik nested PZR arasında orta düzeyde (kappa değeri=0,41) ve pan-dermatofit nested PZR ile

Trichophyton rubrum/ *T. mentagrophytes*-spesifik nested PZR'lar arasında mükemmel düzeyde uyum bulunmuştur (kappa değeri= 0,93).

Fenotipik testler ve PZR ile *T. rubrum* ve *T. mentagrophytes* olarak tanımlanan iki suş (sırasıyla 117 ve 88 nolu suşlar) dizi analizi ile doğrulanmıştır (Resim 15). Pan-dermatofit nested PZR'la pozitif bulunan fakat *T. rubrum*/*T. mentagrophytes*-spesifik nested PZR ile negatif olarak bulunan üç örnekten (18, 53 ve 114 no'lu örnek) elde edilen DNA'lara dizi uygulanmış ve *T. rubrum* olarak tanımlanmıştır (Resim 16). *Trichophyton rubrum* olarak tanımlanan iki suşa (72, 106 no'lu suşlar) ve *T. mentagrophytes* olarak tanımlanan bir suşa da (80 no'lu suş) dizi analizi uygulanmış ve identifikasyon sonuçları doğrulanmıştır.



Resim 15: 88 nolu suş (*T. mentagrophytes*) dizi analizi elektroferogramı



Resim 16: 18 nolu suş (*T. rubrum*) dizi analizi elektroferogramı

Örneklerin direkt mikroskopik inceleme, kültür ve PZR sonuçları Tablo XI'de sunulmuştur.

Tablo XI: Örneklerin direkt mikroskopik inceleme, kültür ve PZR sonuçları.

| Örnek no | Örnek türü | Direkt mikroskopik inceleme | Kültür- fenotipik identifikasyon | Pan-Dermatofit nested PZR | <i>T. rubrum</i> / <i>T. mentagrophytes</i> -spesifik nested PZR | Kültür ve/veya PZR ların en az biri ile dermatofit varlığı |
|----------|-----------------|-----------------------------|----------------------------------|---------------------------|--|--|
| 1 | AD ^a | Negatif | Negatif | Pozitif | <i>T. rubrum</i> | Pozitif |
| 2 | ET ^a | Negatif | Negatif | Pozitif | <i>T. rubrum</i> | Pozitif |
| 3 | AT ^b | Negatif | Negatif | Negatif | Negatif | Negatif |
| 4 | AD ^b | Negatif | Negatif | Negatif | Negatif | Negatif |
| 5 | ED ^c | Pozitif | Negatif | Pozitif | <i>T. rubrum</i> | Pozitif |
| 6 | GD ^c | Pozitif | <i>T. rubrum</i> | Pozitif | <i>T. rubrum</i> | Pozitif |
| 7 | AT | Pozitif | Negatif | Pozitif | <i>T. rubrum</i> | Pozitif |
| 8 | AT | Pozitif | Negatif | Pozitif | <i>T. rubrum</i> | Pozitif |
| 9 | AT | Pozitif | Negatif | Pozitif | <i>T. rubrum</i> | Pozitif |
| 10 | GD | Pozitif | Negatif | Pozitif | <i>T. rubrum</i> | Pozitif |
| 11 | AT | Negatif | Negatif | Negatif | Negatif | Negatif |
| 12 | GD | Pozitif | <i>T. rubrum</i> | Pozitif | <i>T. rubrum</i> | Pozitif |
| 13 | GD | Negatif | Negatif | Negatif | Negatif | Negatif |
| 14 | GD | Negatif | Negatif | Negatif | Negatif | Negatif |
| 15 | SD | Negatif | Negatif | Pozitif | <i>T. rubrum</i> | Pozitif |
| 16 | GD | Negatif | Negatif | Negatif | Negatif | Negatif |
| 17 | ED | Negatif | Negatif | Negatif | Negatif | Negatif |
| 18 | AT | Negatif | Negatif | Pozitif | Negatif | Pozitif |
| 19 | AT | Negatif | Negatif | Negatif | Negatif | Negatif |
| 20 | ED | Pozitif | <i>T. rubrum</i> | Pozitif | <i>T. rubrum</i> | Pozitif |
| 21 | GD | Negatif | Negatif | Negatif | Negatif | Negatif |
| 22 | GD | Negatif | Negatif | Negatif | Negatif | Negatif |
| 23 | GD ^d | Negatif | Negatif | Negatif | Negatif | Negatif |
| 24 | GD ^d | Negatif | Negatif | Negatif | Negatif | Negatif |
| 25 | AT | Pozitif | <i>T. rubrum</i> | Pozitif | <i>T. rubrum</i> | Pozitif |
| 26 | AT | Negatif | Negatif | Negatif | Negatif | Negatif |
| 27 | ET | Negatif | Negatif | Negatif | Negatif | Negatif |
| 28 | ET | Negatif | Negatif | Negatif | Negatif | Negatif |
| 29 | GD | Negatif | Negatif | Negatif | Negatif | Negatif |
| 30 | AT | Pozitif | <i>T. rubrum</i> | Pozitif | <i>T. rubrum</i> | Pozitif |
| 31 | SD | Negatif | Negatif | Negatif | Negatif | Negatif |

.....Tablo XI'in devamı

| Örnek no | Örnek türü | Direkt mikroskopik inceleme | Kültür | Pan-dermatofit nested PZR | <i>T. rubrum/ T. mentagrophytes</i> -spesifik nested PZR | Kültür ve/veya PZR ların en az biri ile dermatofit varlığı |
|----------|-----------------|-----------------------------|------------------|---------------------------|--|--|
| 32 | AD | Negatif | Negatif | Negatif | Negatif | Negatif |
| 33 | AT ^c | Pozitif | Negatif | Pozitif | <i>T. rubrum</i> | Pozitif |
| 34 | ET ^c | Pozitif | Negatif | Pozitif | <i>T. rubrum</i> | Pozitif |
| 35 | ED | Negatif | Negatif | Negatif | Negatif | Negatif |
| 36 | AD | Pozitif | Negatif | Pozitif | <i>T. rubrum</i> | Pozitif |
| 37 | GD ^f | Pozitif | <i>T. rubrum</i> | Pozitif | <i>T. rubrum</i> | Pozitif |
| 38 | AT ^f | Pozitif | Negatif | Pozitif | <i>T. rubrum</i> | Pozitif |
| 39 | GD | Negatif | Negatif | Negatif | Negatif | Negatif |
| 40 | AT ^g | Pozitif | <i>T. rubrum</i> | Pozitif | <i>T. rubrum</i> | Pozitif |
| 41 | AD ^g | Pozitif | <i>T. rubrum</i> | Pozitif | <i>T. rubrum</i> | Pozitif |
| 42 | AT | Pozitif | Negatif | Pozitif | <i>T. mentagrophytes</i> | Pozitif |
| 43 | GD | Negatif | Negatif | Pozitif | <i>T. mentagrophytes</i> | Pozitif |
| 44 | AT | Pozitif | <i>T. rubrum</i> | Pozitif | <i>T. rubrum</i> | Pozitif |
| 45 | AT | Pozitif | <i>T. rubrum</i> | Pozitif | <i>T. rubrum</i> | Pozitif |
| 46 | İB | Negatif | Negatif | Negatif | Negatif | Negatif |
| 47 | ED | Negatif | Negatif | Negatif | Negatif | Negatif |
| 48 | AT | Negatif | Negatif | Negatif | Negatif | Negatif |
| 49 | AT | Negatif | Negatif | Negatif | Negatif | Negatif |
| 50 | AT | Pozitif | Negatif | Pozitif | <i>T. rubrum</i> | Pozitif |
| 51 | AT | Pozitif | <i>T. rubrum</i> | Pozitif | <i>T. rubrum</i> | Pozitif |
| 52 | AD ^h | Pozitif | <i>T. rubrum</i> | Pozitif | <i>T. rubrum</i> | Pozitif |
| 53 | AT ^h | Pozitif | Negatif | Pozitif | Negatif | Pozitif |
| 54 | AT | Negatif | Negatif | Negatif | Negatif | Negatif |
| 55 | AD | Negatif | Negatif | Negatif | Negatif | Negatif |
| 56 | İB | Negatif | Negatif | Negatif | Negatif | Negatif |
| 57 | AD | Pozitif | <i>T. rubrum</i> | Pozitif | <i>T. rubrum</i> | Pozitif |
| 58 | AD | Negatif | Negatif | Negatif | Negatif | Negatif |
| 59 | AT | Pozitif | Negatif | Pozitif | <i>T. rubrum</i> | Pozitif |
| 60 | AT | Pozitif | Negatif | Pozitif | <i>T. rubrum</i> | Pozitif |
| 61 | AT | Pozitif | Negatif | Negatif | Negatif | Negatif |
| 62 | AD | Negatif | Negatif | Negatif | Negatif | Negatif |
| 63 | AD | Negatif | Negatif | Negatif | Negatif | Negatif |

Tablo XI'in devamı

| Örnek no | Örnek türü | Direkt mikroskopik inceleme | Kültür | Pan-dermatofit nested PZR | <i>T. rubrum</i> / <i>T. mentagrophytes</i> -spesifik nested PZR | Kültür ve/veya PZR ların en az biri ile dermatofit varlığı |
|----------|-----------------|-----------------------------|--------------------------|---------------------------|--|--|
| 64 | AD | Negatif | Negatif | Negatif | Negatif | Negatif |
| 65 | GD | Negatif | Negatif | Pozitif | <i>T. rubrum</i> | Pozitif |
| 66 | AT | Pozitif | Negatif | Pozitif | <i>T. rubrum</i> | Pozitif |
| 67 | AD ¹ | Pozitif | <i>T. rubrum</i> | Pozitif | <i>T. rubrum</i> | Pozitif |
| 68 | AT ¹ | Pozitif | Negatif | Pozitif | <i>T. rubrum</i> | Pozitif |
| 69 | AT | Pozitif | <i>T. rubrum</i> | Pozitif | <i>T. rubrum</i> | Pozitif |
| 70 | AD | Negatif | Negatif | Negatif | Negatif | Negatif |
| 71 | AD | Pozitif | <i>T. rubrum</i> | Negatif | <i>T. rubrum</i> | Pozitif |
| 72 | AT | Pozitif | Negatif | Pozitif | <i>T. rubrum</i> | Pozitif |
| 73 | AT | Negatif | Negatif | Negatif | Negatif | Negatif |
| 74 | AT | Negatif | Negatif | Pozitif | <i>T. rubrum</i> | Pozitif |
| 75 | AT | Negatif | Negatif | Negatif | Negatif | Negatif |
| 76 | AT | Pozitif | Negatif | Pozitif | <i>T. rubrum</i> | Pozitif |
| 77 | AT ¹ | Pozitif | Negatif | Pozitif | <i>T. rubrum</i> | Pozitif |
| 78 | AD ¹ | Negatif | Negatif | Negatif | Negatif | Negatif |
| 79 | AD | Pozitif | <i>T. rubrum</i> | Pozitif | <i>T. rubrum</i> | Pozitif |
| 80 | AD | Pozitif | <i>T. mentagrophytes</i> | Pozitif | <i>T. mentagrophytes</i> | Pozitif |
| 81 | AT | Pozitif | <i>T. rubrum</i> | Pozitif | <i>T. rubrum</i> | Pozitif |
| 82 | AT | Negatif | Negatif | Negatif | Negatif | Negatif |
| 83 | GD | Negatif | Negatif | Negatif | Negatif | Negatif |
| 84 | AD | Pozitif | Negatif | Pozitif | <i>T. rubrum</i> | Pozitif |
| 85 | AD | Pozitif | Negatif | Pozitif | <i>T. rubrum</i> | Pozitif |
| 86 | AD | Pozitif | Negatif | Pozitif | <i>T. rubrum</i> | Pozitif |
| 87 | ET | Pozitif | Negatif | Pozitif | <i>T. rubrum</i> | Pozitif |
| 88 | AD | Pozitif | <i>T. mentagrophytes</i> | Pozitif | <i>T. mentagrophytes</i> | Pozitif |
| 89 | AD | Pozitif | <i>T. rubrum</i> | Pozitif | <i>T. rubrum</i> | Pozitif |
| 90 | AT | Pozitif | Negatif | Pozitif | <i>T. rubrum</i> | Pozitif |
| 91 | AT | Pozitif | Negatif | Pozitif | <i>T. rubrum</i> | Pozitif |
| 92 | ET | Negatif | Negatif | Negatif | Negatif | Negatif |
| 93 | AD | Negatif | Negatif | Pozitif | <i>T. rubrum</i> | Pozitif |
| 94 | ED | Negatif | Negatif | Negatif | Negatif | Negatif |
| 95 | AT | Pozitif | <i>T. rubrum</i> | Pozitif | <i>T. rubrum</i> | Pozitif |

Tablo XI'in devamı

| Örnek no | Örnek türü | Direkt mikroskopik inceleme | Kültür | Pan-Dermatofit nested PZR | <i>T. rubrum/ T. mentagrophytes</i> -spesifik nested PZR | Kültür ve/veya PZR ların en az biri ile dermatofit varlığı |
|----------|-----------------|-----------------------------|-------------------------|---------------------------|--|--|
| 96 | GD | Negatif | Negatif | Negatif | Negatif | Negatif |
| 97 | AT ^j | Negatif | Negatif | Negatif | Negatif | Negatif |
| 98 | AD ^j | Negatif | Negatif | Negatif | Negatif | Negatif |
| 99 | AD | Negatif | Negatif | Pozitif | <i>T. rubrum</i> | Pozitif |
| 100 | AD | Pozitif | <i>T. rubrum</i> | Pozitif | <i>T. rubrum</i> | Pozitif |
| 101 | AT | Negatif | Negatif | Negatif | Negatif | Negatif |
| 102 | GD | Negatif | Negatif | Negatif | Negatif | Negatif |
| 103 | AT | Negatif | Negatif | Negatif | Negatif | Negatif |
| 104 | ET | Negatif | Negatif | Negatif | Negatif | Negatif |
| 105 | SD | Pozitif | Negatif | Pozitif | <i>T. mentagrophytes</i> | Pozitif |
| 106 | AD | Pozitif | <i>T. rubrum</i> | Pozitif | <i>T. rubrum</i> | Pozitif |
| 107 | AD | Pozitif | <i>T. rubrum</i> | Negatif | Negatif | Pozitif |
| 108 | AT | Negatif | Negatif | Negatif | Negatif | Negatif |
| 109 | AT | Negatif | Negatif | Negatif | Negatif | Negatif |
| 110 | GD | Negatif | Negatif | Negatif | Negatif | Negatif |
| 111 | AT | Pozitif | <i>T. rubrum</i> | Pozitif | <i>T. rubrum</i> | Pozitif |
| 112 | GD | Negatif | Negatif | Negatif | Negatif | Negatif |
| 113 | AD | Negatif | Negatif | Negatif | Negatif | Negatif |
| 114 | AT | Pozitif | Negatif | Pozitif | Negatif | Pozitif |
| 115 | AT | Pozitif | Negatif | Pozitif | <i>T. rubrum</i> | Pozitif |
| 116 | AT ^k | Pozitif | Negatif | Pozitif | <i>T. rubrum</i> | Pozitif |
| 117 | AD ^k | Pozitif | <i>T. rubrum</i> | Pozitif | <i>T. rubrum</i> | Pozitif |
| 118 | ED ^k | Pozitif | <i>T. rubrum</i> | Pozitif | <i>T. rubrum</i> | Pozitif |
| 119 | AT | Pozitif | <i>T. rubrum</i> | Pozitif | <i>T. rubrum</i> | Pozitif |
| 120 | AT | Pozitif | Negatif | Pozitif | <i>T. rubrum</i> | Pozitif |
| 121 | AT | Pozitif | <i>T. rubrum</i> | Pozitif | <i>T. rubrum</i> | Pozitif |
| 122 | AT | Pozitif | Negatif | Negatif | Negatif | Negatif |
| 123 | ET | Negatif | Negatif | Negatif | Negatif | Negatif |

AD: Ayak deri kazıntısı, AT: Ayak tırnak kazıntısı, ED: El deri kazıntısı, ET: El tırnak kazıntısı, GD: Gövde deri kazıntısı, SD: Saçlı deri kazıntısı, İB: İnguinal bölge deri kazıntısı, ^{a, b, c, d, e, f, g, h, i, j, k}: Aynı hastaların farklı bölgelerinden alınan örnekler

BÖLÜM IV

TARTIŞMA

Dermatofitler tüm dünyada yaygın ve sık görülen infeksiyon etkenleridir (90). Dermatofitozların laboratuvar tanısı klasik olarak klinik örneklerin direkt mikroskopik incelemesi ve mantar kültürü ile yapılmaktadır. Tanıda bu yöntemlerin yetersiz kalabildiği durumlarla karşılaşılmakta, bu nedenle kısa sürede, kesin tanı sağlayan yeni yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır (18).

Dermatofitlerin tanısında koloni özelliklerinin incelenmesi ve mikroskopik morfoloji önem taşır (91). Morfolojik özelliklere dayalı tanı yöntemleri besiyeri, sıcaklık değişiklikleri gibi ortam koşullarından etkilenir. Hastaya uygulanan antifungal tedavi suşlarda morfolojik değişikliklere yol açabilir. Meydana gelen atipik koloniler nedeniyle fenotipik özelliklere dayalı tanı zorlaşır (70, 79, 91). Moleküler biyoloji temelli tanı yöntemlerinin gelişmesi ile dermatofitozların tanısı ve etkenin identifikasyonu ile ilgili sorunların çözüldüğü ve epidemiyolojik bilgilerin arttığı bildirilmektedir (3). Moleküler yöntemler patojen mikroorganizmalarda genetik farklılıkların belirlenmesi temeline dayanmaktadır. Genotipik özellikler fenotipik özelliklere göre dış ortam koşullarından daha az etkilendikleri için daha duyarlıdır ve kesin sonuçlar vermektedir (79). Moleküler biyolojik testlerin bir diğer avantajı, birden fazla etkenin neden olduğu infeksiyonlarda etkenleri ayırt edebilmesidir (92). Bu testlerle, aynı tür içindeki suşların genetik olarak ilişkili olup olmadıkları da araştırılabilmektedir. Böylece izole edilen etken mantarın kaynağı belirlenebilmekte ve hastane ya da toplum kaynaklı infeksiyonların ayrımı yapılabilmektedir (83).

Dermatofitlerin mitokondriyal DNA (mtDNA) ve ribozomal DNA (rDNA)'ları hedef alınarak yapılan çalışmalarla dermatofit türleri arasındaki filogenetik ilişki belirlenebilmiştir (3). Yapılan bir çalışmada dermatofitlerin kromozomal DNA'sının G+C oranı %48.7-%50.3 arasında olduğu bildirilmiştir (93).

Çalışmamızda dermatofitoz ön tanısı alan 110 hastadan alınan 123 klinik örnek incelenmiştir. Örneklerin 62 (% 50,4)'sinde direkt mikroskopik incelemede mantar elemanları görülmüş, 30 (% 24,4)'unda mantar kültüründe dermatofit üremiştir. Direkt mikroskopisi pozitif olan örneklerin 30 (% 48,4)'unda kültürde üreme gözlenirken, direkt mikroskopisi negatif bulunan örneklerin kültüründe üreme saptanmamıştır. Dermatofitoz ön tanısı ile incelenen örneklerde direkt mikroskopi ve mantar kültürünün pozitiflik oranlarını sırası ile

Özekinci ve ark (11) % 19,7 ve % 13,9; Koçoğlu ve ark (94) % 35,4 ve 26,2; Meriç ve ark (95) % 13,1 ve % 13,6; Arca ve ark (96) % 77 ve % 23; Kardjeva ve ark (97) % 93 ve % 22; Garg ve ark (98) % 63,4 ve % 25; bulmuşlardır. Çalışmalarda direkt mikroskopik inceleme sonuçlarının farklı oranlarda bulunması hasta seçimi, örneklerin uygun yerden alınmaması, uygulanan KOH solüsyonunun farklı konsantrasyonda olması veya hazırlanan preparatların bekletme sürelerindeki farklılıklardan kaynaklanabilir (19). Çalışmamızda olduğu gibi genel olarak mantarların direkt mikroskobide saptanma oranları, kültürde üreme oranlarına göre daha yüksek bulunmaktadır (96-98). Bu durum örnekte mantar yapılarının az sayıda bulunması ya da örnek alınan bölgedeki hiflerin canlılığını yitirmiş olması gibi faktörlerle kültürde üremenin saptanamaması ile açıklanabilmektedir (12, 18).

Dermatofitlerin uygun şekilde tedavi edilebilmesi için etkenin hızlı ve doğru tanısı önem taşımaktadır. Direkt mikroskopik inceleme klinik örneklerde mantar elemanlarının saptanması için hızlı bir yöntem olmasına rağmen türe spesifik değildir ve % 85 oranında duyarlılık göstermektedir (47). *In-vitro* kültür yönteminin ise duyarlılığı düşük olup uzun süreli inkübasyon (4 haftaya kadar) gerektirmektedir. Dermatofitler, antifungal tedavi altındaki hastalarda tipik koloni morfolojisi göstermeyebilir (99). Kültürde üreyen dermatofitlerin tanısı için çoğu zaman uzun süre gerektiren, zahmetli ve her zaman kesin sonuçların alınamadığı testlerin yapılması gerekmektedir. Bu testler arasında *T. rubrum*'u ve *T. mentagrophytes*'i ayırmada en sık üreaz ve kıl delme testi kullanılmaktadır. Çalışmamızda *T. mentagrophytes* suşları yanında *T. rubrum* suşlarından biri de üreaz pozitif bulunmuş, bunun yanı sıra beklenenin aksine *T. mentagrophytes* suşlarının kıl delme testi negatif bulunmuştur. Graser ve ark (100), moleküler yöntemlerle tanımladıkları 233 *T. rubrum* suşunun 19'unun üreyi hidrolize ettiğini bildirmişlerdir. Benzer şekilde üreaz testinde (40, 101, 102) ve kıl delme testinde (103, 104) alınan sonuçların bu iki türü ayırmada yeterli olamayabileceği bildirilmiştir.

Çalışmamızda; mantar kültüründe üreyen 30 suşun 28'i *T. rubrum*, ikisi *T. mentagrophytes* olarak tanımlanmıştır. Ülkemizde yapılan çalışmalarda benzer şekilde, en sık izole edilen etkenin *T. rubrum* olduğu, bunu *T. mentagrophytes*'in izlediği bulunmuştur (8, 10- 12). Bu çalışmalarda *T. rubrum* ve *T. mentagrophytes* bulunma oranları sırasıyla % 64,5- % 20,4; % 65,2-%18,8; % 69,2-% 8; % 68,4-% 18,4 olarak bildirilmiştir. Bazı çalışmalarda düşük oranlarda *E. floccosum*, *T. tonsurans*, *T. violaceum* ve *M. canis* gibi türlerin saptandığı bildirilmiştir (10-12). Önceki yıllarda Aydın'da yapılan bir çalışmada saptanan dermatofitler

T. rubrum (94 suş), *T. mentagrophytes* (dört suş) ve *E. floccosum* (bir suş) olarak bulunmuştur (9). Bazı çalışmalarda kutanöz mantar infeksiyonlarında *Candida* türleri ve küf mantarlarının da etken olabileceği belirtilmiştir (65, 105, 106). Özellikle saprofit küf mantarlarının izolasyonu durumunda etken denilebilmesi için tekrarlayan kültürlerde de aynı mantarın üretilmesi gerekmektedir. Çalışmamızda kültürlerde dermatofit dışında mantar üremesi olmamıştır.

Çalışmamızda dermatofitler en sık (% 53,3) ayak derisinden alınan örneklerden izole edilmiştir. Ülkemizde yapılan çalışmalarda benzer şekilde, en sık görülen dermatofitoz tablosunun tinea pedis olduğu bildirilmiştir (8-12).

Son yıllarda dermatofitoz tanısında moleküler yöntemlerin kullanıldığı çalışmalar giderek artmaktadır. Moleküler yöntemler; kültürde üreyen suşların tür tanısında olduğu gibi, dermatofitlerin klinik örneklerden direkt olarak saptanmasında da kullanılabilen, klasik yöntemlere göre kısa sürede ve genellikle kesin sonuçlar vermektedir (3). Çalışmamızda kültürde üreyen 30 suş pan-dermatofit nested PZR ile dermatofit olarak, *T. rubrum*/*T. mentagrophytes*-spesifik nested PZR ile tür düzeyinde, aynı gün içinde ve ek teste gerek kalmadan tanınmıştır. Yapılan bazı çalışmalarda kültürde üremiş ancak identifikasyonu yapılamamış olan bazı suşların PZR ile doğru olarak tanımlandığı bildirilmiştir (75, 77).

Moleküler yöntemlerin ilk aşaması olan DNA izolasyonu için çeşitli çalışmalarda farklı yöntemler kullanılmıştır (16, 19, 72, 76). Sıkça kullanılan fenol-kloroform-izoamil alkol yöntemi düşük maliyetli olmasına rağmen zahmetli olması ve toksik maddelerin kullanımını gerektirmesi gibi dezavantajlara sahiptir (19, 69, 98). Bazı çalışmalarda (72, 76) kullanılan ticari kitler ise uygulama kolaylığına rağmen maliyeti yükseltmektedir. Bu çalışmada kültürde üreyen suşlardan DNA izolasyonu ticari kit ile yapılmış, ancak ön çalışmalarda direkt kazıntı örneklerinden DNA izolasyonunda bu yöntemin yetersiz olduğu düşünülmüştür. Direkt kazıntı örneklerinden DNA izolasyonu için Brillowska-Dabrowska ve ark (17) tarafından geliştirilen kolay ve hızlı (yaklaşık 10 dakika) olan yöntem kullanılmıştır. Bu yöntemin tüm laboratuvarlarda kolayca uygulanabilir olması, maliyetinin düşük oluşu ve normalde DNA izolasyonu zor olan keratinize dokulardan DNA izolasyonunu sağlaması gibi avantajları bulunmaktadır. Çalışmamızda kontrol PZR (GA3PDH PZR) ile tüm klinik örneklerden DNA'nın izole edildiği gösterilmiştir.

Dermatofitozların tanısında kullanılan moleküler yöntemler arasında PZR (16, 96), PZR-RFLP (69) ve PZR-dizi analizi (107) bulunmaktadır. Turin ve ark (16) kültürde

üretileen dermatofitlerden ve kazıntı örneklerinden yapılan 18S rDNA'yı hedefleyen PZR ile dermatofit türlerinin ayırlamadığını, ITS bölgesini hedefleyen PZR ile bu ayırımı yapılabildiğini; 20 örneğin 12'sinde kültürde üreme saptandığını (11 dermatofit, 1 *Candida* spp.), 10'unda PZR ile pozitif sonuç alındığını bildirmiştir. Arca ve ark (96), onikomikoz şüphesi olan 52 hastadan alınan örneklerin 40 (% 77,7)'ını direkt mikroskopi ile pozitif, 12 (% 23)'sini kültür ile pozitif ve 20 (% 38)'sini mantarların ITS bölgesini hedefleyen (ITS1-ITS4 primerleri) PZR ile pozitif bulmuşlardır. Bu çalışmalarda görüldüğü gibi mantarları tanımlamada 18S rDNA ya da ITS bölgesini çoğaltan genel primerlerin seçildiği PZR ile örneklerde dermatofitlerin saptanma oranları klasik yöntemlere göre daha düşük bulunmuştur.

Kano ve ark (107) infekte hayvanlardan alınan yedi klinik örnekte (deri ve kıl örnekleri) dermatofitlerde bulunan kitin sentaz 1 (*CHS1*) gen bölgesini hedefleyen PZR ürününe dizi analizi uygulayarak beş *M. canis*, bir *M. gypseum* ve bir *T. mentagrophytes* bulduklarını bildirmişlerdir. Dizi analizi yöntemi ile kesin sonuçlar alınabilse de özellikle alt yapısı yeterli olmayan laboratuvarlarda rutin tanıda bu yöntemin uygulanabilirliği düşüktür.

Çalışmamızda direkt klinik örneklerde ve kültürden izole edilen suşlarda iki araştırmacının (77, 98) tarif ettiği şekilde nested PZR uygulanmıştır. Garg ve ark (18, 98) ve Uchida ve ark (77), yapmış oldukları çalışmalarda nested PZR'nin dermatofitlerin saptanmasında ilk tur PZR'den daha başarılı olduğunu bildirmişlerdir. Garg ve ark (98) onikomikoz şüpheli 152 tırnak örneğinin 96 (% 63,4)'sını direkt mikroskopi ile pozitif, 121 (% 79,6)'ini pan-dermatofit nested PZR ile pozitif, 38 (% 25)'ini kültür ile pozitif (dermatofit üremiştir) bulmuşlardır. Gark ve ark (18) aynı yöntemi kullandıkları diğer çalışmalarında dermatofitoz şüpheli 105 deri örneğinin 67 (% 63,8)'si direkt mikroskopi ile pozitif, 87 (% 82,8)'si pan-dermatofit nested PZR ile pozitif, 25 (% 23,8)'inde kültürde dermatofit üremesi saptanmıştır. 50 saç örneğinin 29 (% 58)'u direkt mikroskopi ile pozitif, 43 (% 86)'ü pan-dermatofit nested PZR ile pozitif, 15 (% 30)'inde kültürde dermatofit üremesi saptanmıştır. Garg ve ark (18, 98) bu çalışmalarından elde ettiği sonuçlara göre dermatofitozların tanısında pan-dermatofit nested PZR'nin altın standart olarak değerlendirilebileceğini önermişlerdir.

Uchida ve ark (77), direkt mikroskobisinde mantar elemanları görülen 206 örneği (126 deri, 80 tırnak örneği) dahil ettikleri çalışmalarında, kültür temelli morfolojik yöntemler ile *T. rubrum*/*T. mentagrophytes*-spesifik nested PZR sonuçlarını karşılaştırmışlardır. Kültür temelli morfolojik yöntemler ile deri ve tırnak örneklerinin sırasıyla 84 (% 67)'ü ve 26 (%

33)'sı pozitif bulunurken, PZR incelemelerinde sırasıyla 120 (% 95)'si ve 79 (% 99)'u pozitif bulunmuştur.

Bu çalışmada dermatofitlerin *CHS1* genini hedefleyen pan-dermatofit nested PZR ve ITS1 bölgesini hedefleyen *T. rubrum/T. mentagrophytes*-spesifik nested PZR hızlı ve kültüre göre yüksek oranda pozitif sonuç vermiştir. Toplam 123 klinik örneğin 62 (% 50,4)'sinde direkt mikroskopi pozitif bulunmuş, 30'unda (%24,4) kültürde üreme olmuştur. Pan-dermatofit nested PZR örneklerin 67 (% 54,5)'sinde, *Trichophyton rubrum/ Trichophyton mentagrophytes* nested PZR 65 (% 52,9) 'inde pozitif sonuç vermiştir. Direkt mikroskobisi pozitif bulunan 62 örneğin 30'unda (% 48,3) kültürde üreme olmuş, buna karşın pan-dermatofit nested PZR ve *Trichophyton rubrum/ Trichophyton mentagrophytes*-spesifik nested PZR sırasıyla 58 (% 93,5)'inde ve 57'sinde (% 91,9) pozitif sonuç vermiştir. Direkt mikroskobisi pozitif olan örneklerin dördünde (% 6,5) pan-dermatofit nested PZR, beşinde (% 8,1) *T. rubrum/T. mentagrophytes*-spesifik nested PZR negatif sonuç vermiştir. Buna karşın direkt mikroskobisi negatif olan dokuz (% 14,8) örnekte pan-dermatofit “nested PZR”, sekiz (% 13,1) örnekte *T. rubrum/T. mentagrophytes*-spesifik nested PZR pozitif bulunmuştur. Kültürde üremesi olan bir örnekte PZR negatif bulunurken, kültürde üremesi olmayan örneklerin 39 (% 41,2)'unda PZR pozitif bulunmuştur. Tüm örnekler için uygulanan *CHS1* ilk tur PZR ve ITS 1 ilk tur PZR'lar örneklerin sırasıyla % 18,7 ve % 30,1'inde pozitif bulunmuştur.

Direkt mikroskobisi pozitif olan deri örneklerinin % 72'sinde kültürde üreme saptanırken, pan-dermatofit nested PZR ve *T. rubrum/T.mentagrophytes*-spesifik nested PZR sırasıyla % 92 ve % 96'sında pozitif bulunmuştur. Direkt mikroskobisi pozitif olan tırnak örneklerinin % 32,4'ünde kültürde üreme saptanırken, pan-dermatofit nested PZR ve *T. rubrum/T.mentagrophytes*-spesifik nested PZR sırasıyla % 94,6 ve % 89,2'sinde pozitif bulunmuştur. *Trichophyton rubrum/T. mentagrophytes*-spesifik “nested” PZR'la *T. rubrum* olarak pozitif bulunan bir örnek, pan-dermatofit nested PZR'la negatif bulunmuştur. Buna karşın, pan-dermatofit nested PZR'la pozitif bulunan üç örnek, *T. rubrum/T. mentagrophytes*-spesifik nested PZR'la negatif bulunmuştur. Pan-dermatofit nested PZR ile *T. rubrum/T. mentagrophytes*-spesifik nested PZR arasında uyum kappa testi ile mükemmel bulunmuştur. Az sayıda örnekte, direkt mikroskopi pozitif saptanmasına karşın PZR yöntemleri negatif bulunmuştur. Pan-dermatofit nested PZR ile dermatofit türü belirlenememekte, tür tayini için dizi analizi gibi başka bir yöntem ihtiyacı duyulmaktadır. *T. rubrum/T. mentagrophytes*-

spesifik nested PZR aynı anda en sık görülen iki dermatofiti ek teste gerek kalmadan saptamakta ancak bu iki tür dışındakileri saptayamamaktadır.

Mantar kültüründe üreme saptanan iki örnekte pan-dermatofit PZR pozitif bulunmuş olup bu örneklerin biri *T. rubrum*/*T. mentagrophytes*-spesifik nested PZR ile *T. rubrum* olarak tanımlanırken diğer örnek negatif bulunmuştur.

Çalışmamızda; kültür ve/veya nested PZR'lar ile örneklerin 64 (% 92,8)'ünde *T. rubrum*, 5 (% 7,2)'inde *T. mentagrophytes* saptanmış olup hiçbirinden dermatofit dışı küf ya da maya izole edilmemiştir.

Çalışmamızda kullanılan moleküler testler ile dermatofitoz etkenleri hızlı bir şekilde tür düzeyinde tanımlanabilmiştir. Alt yapısı uygun olan laboratuvarlarda dermatofitozların rutin tanısında moleküler yöntemlerin uygun bir tanı aracı olabileceği sonucuna varılmıştır.

SONUÇ

Çalışmaya alınan 123 örneğin 62 (% 50,4)'sinde direkt mikroskopik incelemede mantar elemanı görülmüş, 30 (% 24,4)'unun mantar kültüründe dermatofit üremiştir. Örneklerin 67 (% 54,5)'sinde pan-dermatofit nested PZR, 65 (% 52,9)'inde *T. rubrum*/*T. mentagrophytes* nested PZR pozitif bulunmuştur. Kültürde üreyen suşların identifikasyonunda klasik yöntemler ile *T. rubrum*/*T. mentagrophytes* nested PZR aynı sonuç vermiş (28 *T. rubrum*, ikisinde *T. mentagrophytes*), suşların tamamı pan-dermatofit nested PZR ile pozitif bulunmuştur.

Çalışmamızda pan-dermatofit nested PZR ve *T. rubrum*/*T. mentagrophytes*-spesifik nested PZR kültüre göre hızlı ve yüksek oranda pozitif bulunmuştur. PZR ve direkt mikroskopi ile alınan pozitif sonuçlar birbirine yakındır. Pan-dermatofit nested PZR ile örnekte dermatofitin var olduğu, *T. rubrum*/*T. mentagrophytes* nested PZR ile örnekte bu iki türün direkt olarak saptanabilmesi mümkün olmuştur.

Direkt mikroskopisi pozitif olan örneklerin dördünde pan-dermatofit nested PZR, beşinde *T. rubrum*/*T. mentagrophytes*-spesifik nested PZR ile negatif sonuç alınmıştır. Buna karşın direkt mikroskopisi negatif olan dokuz örnekte pan-dermatofit nested PZR, sekiz örnekte *T. rubrum*/*T. mentagrophytes*-spesifik nested PZR pozitif sonuç vermiştir. Kültürde üremesi olan bir örnekte her iki PZR negatif bulunurken, kültürde üremesi olmayan 39 örnekte her iki PZR'dan en az biri pozitif sonuç vermiştir.

Çalışmamızda kullanılan moleküler testler ile dermatofitoz etkenleri hızlı bir şekilde tür düzeyinde tanımlanabilmiştir. Alt yapısı uygun olan laboratuvarlarda dermatofitozların rutin tanısında moleküler yöntemlerin uygun bir tanı aracı olabileceği sonucuna varılmıştır.

ÖZET

DERMATOFİTOZLARIN TANISINDA MOLEKÜLER YÖNTEMLERİN KULLANILMASI

Dermatofitler tüm dünyada yaygın ve sık olarak görülen infeksiyon hastalıklarına (dermatofitoz) neden olan mantarlardır. Bu infeksiyonların tanısında, kullanılan klasik yöntemlerden; direkt mikroskobide yalancı negatiflikler görülmekte ve türe spesifik tanı yapılamamaktadır. Mantar kültürü ise özgül bir yöntem olmasına rağmen üreme için uzun inkübasyon süresi gerektirmekte ve izolatların doğru olarak identifiye edilebilmesi için çoğu zaman ek testlere ihtiyaç duyulmaktadır. Bu çalışmada dermatofitozların tanısında moleküler yöntemlerin yerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Aydın Devlet Hastanesi Dermatoloji Polikliniğinden 01. 03. 2010- 30. 06. 2010 tarihleri arasında dermatofitoz şüphesi ile aynı hastanenin Mikrobiyoloji Laboratuvarına yönlendirilen 110 hastadan alınan 123 örnek (63 deri kazıntısı, 60 tırnak örneği) çalışmaya dahil edilmiştir. Örneklerin mikrobiyolojik ve moleküler incelemeleri Adnan Menderes Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarında yapılmıştır. Örnekler % 20'lik potasyum hidroksit solüsyonu ile direkt mikroskobik olarak incelenmiş, mantar kültürü için Sabouraud dekstroz agar ve patates dekstroz agar besiyerlerine ekilmiştir. Kültürde üreyen suşlara ve kazıntı örneklerine direkt olarak dermatofitlerin kitin sentaz 1 (*CHS1*) gen bölgesini hedefleyen primerlerle pan-dermatofit nested PZR, bunun yanı sıra *Tricophyton rubrum* ve *Tricophyton mentagrophytes*'e özgü primerlerle nested PZR uygulanmıştır. PZR yöntemleri arasında uyumsuzluk saptanan örneklerde dizi analizi ile tanıya gidilmiştir.

Örneklerin 62 (% 50,4)'sinde direkt mikroskobik incelemede mantar elemanları görülmüş, 30 (% 24,4)'unun kültüründe dermatofit üremiştir. Kültürde üreyen suşların klasik yöntemler ve *T. rubrum*/*T. mentagrophytes* nested PZR ile identifikasyon sonuçları aynı bulunmuştur. Örneklerin 67 (% 54,5)'sinde pan-dermatofit nested PZR, 65 (% 52,9)'inde *T. rubrum*/*T. mentagrophytes* nested PZR pozitif sonuç vermiştir.

Çalışmamızda kullanılan moleküler tanı yöntemleri ile dermatofitoz etkenleri hızlı bir şekilde tür düzeyinde tanımlanabilmiştir. Alt yapısı uygun olan laboratuvarlarda

dermatofitozların rutin tanısında moleküler yöntemlerin uygun bir tanı aracı olabileceği sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Dermatofitoz, nested PZR

Yazışma adresi: Dr.Yasin TİRYAKİ

Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakóltesi

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, AYDIN

Tel: (+90) (256) 4441256/3382

E-posta: y_tiryaki74@hotmail.com

SUMMARY
THE USAGE OF MOLECULAR METHODS IN THE DIAGNOSIS OF
DERMATOPHYTOSIS

Dermatophytes are fungi which are widespread throughout the world, and are responsible for the common disease of dermatophytosis, or ringworm. In the diagnosis of these infections by classical methods, direct microscopy can give false negatives, and species-specific diagnosis is not possible. Although fungal culture is a specific method, a long incubation period is needed for propagation, and there is often a need for supplementary tests to identify the isolates correctly. The purpose of this study was to examine the use of molecular methods in the diagnosis of dermatophytosis, and to discover whether they have any advantage over classical methods.

Included in the study were 123 samples (63 skin and 60 nail) taken from 110 patients who attended Aydın State Hospital Dermatology Polyclinic between 1.3.2010 and 30.6.2010 with suspected dermatophytosis and who had been sent to the Microbiology Laboratory of the same hospital. Microbiological and molecular examination of the samples was performed in the Microbiology Laboratory of the Adnan Menderes University Research and Application Hospital. Samples were directly examined microscopically with a 20% solution of potassium hydroxide, or were placed on Sabouraud dextrose agar and potato dextrose agar broths for fungal culture. Pan-dermatophyte nested PCR with primers targeting the chitin synthase 1 (CHS1) gene region, and also nested PCR with primers specific to *Tricophyton rubrum* and *Tricophyton mentagrophytes* were carried out on the strains produced in the cultures and directly on the collected samples. In samples where inconsistencies were found between PCR methods, this was resolved using identification by sequence analysis.

Fungal components were seen in 62 (50.4%) of the samples, and dermatophytes were produced in 30 (24.4%) of the cultures. Identification results were found to be the same for the strains produced in the culture by classical methods as the identified by nested PCR. Pan-dermatophyte nested PCR gave positive results in 67 (54.5%) samples, and *T. rubrum*/*T. mentagrophytes* nested PCR in 65 (52.9%) samples.

The agents of dermatophytosis has been fastly identified in species, with molecular diagnostic methods used in our study. It has been suggested that in the routine

diagnosis of dermatophytosis, molecular methods may be appropriate diagnostic tool in laboratories.

Keywords: Dermatophytosis, nested PCR

Correspondence Author: Dr.Yasin TIRYAKI

Adnan Menderes University Faculty of Medicine,
Department of Medical Microbiology, Aydin, Turkey.

Phone:_(+90)_(256)_4441256/3382

E-mail: y_tiryaki74@hotmail.com

12. Gürcan Ş, Tikveşli M, Eskiocak M, Kılıç H, Otkun M. Dermatofitozlarda etkenlerin ve risk faktörlerinin araştırılması: hastane bazlı bir çalışma. Mikrobiyol Bul 2008;42(1):95-102.
13. Panasiti V, Borroni RG, Devirgiliis V, Rossi M, Fabbrizio L, Masciangelo R, Bottoni U, Calvieri S. Comparison of diagnostic methods in the diagnosis of dermatomycoses and onychomycoses. Mycoses 2006;49:26–9.
14. Robert R, Pihet M. Conventional methods for the diagnosis of dermatophytosis. Mycopathologia 2008;166:295–306.
15. Makimura K, Tamura Y, Mochizuki T, Hasegawa A, Tajiri Y, Hanazawa R, Uchida K, Saito H, Yamaguchi H. Phylogenetic classification and species identification of dermatophyte strains based on DNA sequences of nuclear ribosomal internal transcribed spacer 1 regions. J Clin Microbiol 1999;37(4):920-4.
16. 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 Inves 2000;30:511–8.
17. Brillowska-Dabrowska A, Saunte DM, Arendrup MC. Five-hour diagnosis of dermatophyte nail infections with specific detection of *Trichophyton rubrum*. J Clin Microbiol 2007;45(4):1200–4.
18. Garg J, Tilak R, Garg A, Prakash P, Gulati A K, Nath G. Rapid detection of dermatophytes from skin and hair. BMC Research Notes 2009;2:60-5.
19. Berk E, Kuştimur S, Kalkancı A, Öztaş OM. Onikomikozlu olguların direkt tırnak kazıntı örneklerinden DNA izolasyonu ve gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu ile *Trichophyton rubrum* tanımlanması. Mikrobiyol Bul 2011;45(1):150-8.
20. İnci R. Mantarların yapıları, üreme özellikleri ve sınıflanması. In: Ustaçelebi Ş (Ed). Temel ve Klinik Mikrobiyoloji, Ankara: Güneş Kitabevi, 1999:1015-21.
21. Yücel A. Tıp mikolojisinin dünü ve bugünü. Cerrahpaşa Tıp Derg 1999;30:191-8.
22. Poyraz Ö. Genel ve Özel Tıbbi Mikoloji. Cumhuriyet Üniversitesi yayınları No: 101 (2006):64-94.
23. Saniç A. Dermatofitler. In: Ustaçelebi Ş (Ed). Temel ve Klinik Mikrobiyoloji, Ankara: Güneş Kitabevi, 1999: 1031-44.

24. Simpanya MF. Dermatophytes: Their taxonomy, ecology and pathogenicity. In: Kushwaha RKS, Guarro J (eds). *Biology of dermatophytes and other keratinophilic fungi*, Bilbao: Revista Iberoamericana de Micologia; 2000:1-12.
25. White TC, Oliver BG, Gräser Y, Henn MR. Generating and testing molecular hypotheses in the dermatophytes. *Eukaryot Cell* 2008;7(8):1238-45.
26. Shah PC, Krajden S, Kane J, Summerbell RC. *Tinea corporis* caused by *Microsporum canis*: report of a nosocomial outbreak. *Eur J Epidemiol.* 1988;29:417-8.
27. Alsop J, Prior AP. Ringworm infection in a cucumber greenhouse. *Br med J* 1961;1:1081-3.
28. Anderson JH. In vitro survival of human pathogenic fungi in seawater. *Sabouraudia* 1979;17(1):1-12.
29. Dvorak J, Hubalek Z, Otcenasek M. Survival of dermatophytes in human skin scales. *Arch Dermatol* 1968;98(5):540-2.
30. Collins CH, Kennedy DA. (1999). *Laboratory acquired infections. Laboratory acquired infections: History, incidence, causes and prevention* (4th ed., pp. 1-37). Woburn, MA: BH.
31. Menetrez MY, Foarde KK, Dean TR. The effectiveness of UV irradiation on vegetative bacteria and fungi surface contamination. *Chemical Engineering Journal* 2010;157(2-3):443-50.
32. da Silva M, Moraes AML, Nishikawa MM, Gatti MJA, Vallim de Alencar M A, Brandão LE, Nóbrega A. Inactivation of fungi from deteriorated paper materials by radiation. *International Biodeterioration & Biodegradation* 2006;57(3):163-7.
33. Wu Y, Yao M. Inactivation of bacteria and fungus aerosols using microwave irradiation. *Journal of Aerosol Science* 2010;41(7):682-93.
34. Csucos M, Csucos C. *Microbiological obseration of water and wastewater*. United States: CRC Press 1999.
35. Tietz HJ, Kunzelmann V, Schoenian G. Changes in the fungal spectrum of dermatomycoses. *Mycoses* 1995;38(1):33–9.
36. Lehenkari E, Silvennoinen-Kassinen S. Dermatophytes in northern Finland in 1982–90. *Mycoses* 1995;38:411–4.
37. Kostanje MJ, Staats CCG. Fungal infections in the Netherlands. *Dermatology* 1995;190:39–42

38. Kuklova´ I, Kucerova´ H. Dermatophytoses in Prague, Czech Republic, between 1987 and 1998. *Mycoses* 2001;44:493–6.
39. Nowicki R. Dermatophytoses in the Gdansk area, Poland: a 12-year survey. *Mycoses* 1996;39: 399–402.
40. Gräser Y, Kuijpers AF, Presber W, de Hoog GS. Molecular taxonomy of the *Trichophyton rubrum* complex. *J Clin Microbiol* 2000;38(9):3329-36.
41. Winn W, Allen S, Janda W, Koneman E, Procop G, Schreckenberger P, Woods G. Koneman’s Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 6th edition. Philadelphia: Lippincott Williams&Wilkins; 2006.
42. www.mycology.adelaide.edu.au
43. Makimura K, Mochizuki T, Hasegawa A, Uchida K, Saito H, Yamaguchi H. Phylogenetic classification of *Trichophyton mentagrophytes* complex strains based on DNA sequences of nuclear ribosomal internal transcribed spacer 1 regions. *J Clin Microbiol* 1998;36(9):2629-33.
44. www.labmicta.nl
45. Larone DH. Medically important fungi . A guide to identification. 4th ed. Washington: ASM Press; 2002.
46. Padhye AA, Summerbell RC. The dermatophytes. İçinde Merz WG, Hay RJ, editörler. *Medical Mycology*. Washington, USA: ASM Press; 2005. s. 220-243.
47. Rippon JW. Medical mycology. In *The Pathogenic Fungi and the Pathogenic Actinomycetes* 3rd edition. Philadelphia: WB Saunders; 1988.
48. Novick NL, Tapia L, Bottone EJ. Invasive trichophyton rubrum infection in an immunocompromised host. Case report and review of the literature. *Am J Med* 1987;82(2):321-5.
49. Faergemann J, Gisslen H, Dahlberg E, Westin J, Roupe G. *Trichophyton rubrum* abscesses in immunocompromised patients. *Acta Dermato Venereol* 1989;69:244–7.
50. Squeo RF, Beer R, Silvers D, Weitzman I, Grossman M. Invasive *Trichophyton rubrum* resembling blastomycosis infection in the immunocompromised host. *J Am Acad Dermatol* 1998;39:379-80.
51. Akman A, Savaş B, Uguz A, Özhak B, Heper AO, Başaran E, Alpsoy E. Invasive *Trichophyton rubrum* infection resembling blastomycosis in a patient with altered

- immune status during the course of chronic superficial *Trichophyton rubrum* infection. Eur J Dermatol 2007;17(5):452-3.
52. Marconi VC, Kradin R, Marty FM, Kospenthal DR, Koton CN. Disseminated dermatophytosis in a patient with hereditary hemochromatosis and hepatic cirrhosis: case report and review of the literature. Med Mycol 2010;48(3):518-27.
 53. Wagner DK, Sohnle PG. Cutaneous defenses against dermatophytes and yeasts. Clin Microbiol Rev 1995;8(3):317-335.
 54. Kaufman G, horwitz BA, Hadar R, Ullman Y, Berdicevsky I. Green fluorescent protein (GFP) as a vital marker for pathogenic development of the dermatophyte *Trichophyton mentagrophytes*. Microbiology 2004;150:2785-90.
 55. Esquenazi D, Alviano CS, de Souza W, Rozental S. The role of surface carbohydrates on the interaction of microconidia of *Trichophyton mentagrophytes* with epithelial cells. FEMS Immunol Med Microbiol 2003;35(2):113-23.
 56. Esquenazi D, Alviano CS, de Souza W, Rozental S. The influence of surface carbohydrates during in vitro infection of mammalian cells by the dermatophyte *Trichophyton rubrum*. Res Microbiol 2004;155:144–53.
 57. Duek L, Kaufman G, Ullman Y, Berdicevsky I. The pathogenesis of dermatophyte infections in human skin sections. J Infect 2004;48:175–80.
 58. Peres NTA, Maranhao FCA, Rossi A, Martinez-Rossi NM. Dermatophytes: host-pathogen interaction and antifungal resistance. An Bras Dermatol 2010;85(5):657-67.
 59. Samdani AJ. Dermatophyte growth and degradation of human stratum corneum in vitro (pathogenesis of dermatophytosis). J Ayub Med Coll Abbottabad 2005;17(4):19-21.
 60. Monod M, Le'chenne B, Jousson O, Grand D, Zaugg C, Stocklin R, Grouzmann E. Aminopeptidases and dipeptidyl-peptidases secreted by the dermatophyte *Trichophyton rubrum*. Microbiology 2005;151:145–55.
 61. Cabrera RM, Blake JS, Dahl MV, Herron MJ, Nelson RD. Inhibition of keratinocyte proliferation by a mannan glycoprotein isolated from *Trichophyton rubrum*. J Invest Dermatol 1991;96:616.
 62. Lakshmipathy DT, Kannabiran K. Review on dermatomycosis: pathogenesis and treatment. Natural Science 2010;2(7):726-31.

63. Romano C, Maritati E, Gianni C. Tinea incognito in Italy: a 15 year survey. *Mycoses* 2006; 49:383-7.
64. Rodgers P, Bassler M. Treating onychomycosis. *Am Fam Physician* 2001;63:663-72.
65. İlkit M. Onychomycosis in Adana, Turkey: a 5-year study. *Int J Dermatol* 2005;44(10):851-4.
66. 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(8):811-22.
67. Summerbell RC, Rosenthal SA, Kane J. *Rapid method for differentiation of Trichophyton rubrum, Trichophyton mentagrophytes, and related dermatophyte species.* *J Clin Microbiol* 1988;26(11):2279-82.
68. Weitzman I, Salkin IF, Rosenthal SA. Evaluation of Trichophyton agars for identification of *Trichophyton soudanense*. *J Clin Microbiol* 1983;18:203-5.
69. Beak SC, Chae HJ, Houh D, Byun DG, Cho BK. Detection and differentiation of causative fungi of onychomycosis using PZR amplification and restriction enzyme analysis. *Int J Dermatol* 1998;37:682-6.
70. Jackson CJ, Barton RC, Evance EGV. Species identification and strain differentiation of dermatophyte fungi by analysis of ribosomal-DNA intergenic spacer regions. *J Clin Microbiol* 1999;37:931-6.
71. Mochizuki T, Ishizaki H, Barton RC, Moore MK, Jackson CJ, Kelly SL, Evans EGV. Restriction fragment length polymorphism analysis of ribosomal DNA intergenic regions is useful for differentiating strains of *Trichophyton mentagrophytes*. *J Clin Microbiol* 2003;41 (10):4583-8.
72. Monod M, Bontems O, Zaugg C, Léchenne B, Fratti M, Panizzon R. Fast and reliable PZR/sequencing/RFLP assay for identification of fungi in onychomycoses. *J Med Microbiol* 2006;55:1211-16.
73. Summerbell RC, Haugland RA, Li A, Gupta AK. rRNA gene internal transcribed spacer 1 and 2 sequences of asexual, anthropophilic dermatophytes related into *Trichophyton rubrum*. *J Clin Microbiol* 1999; 37 (12): 4005-11.
74. Nishio K, Kawasaki M, Ishizaki H. Phylogeny of the genera *Trichophyton* using mitochondrial DNA analysis. *Mycopathologia* 1992;117(3):127-32.

75. Makimura K, Tamura Y, Mochizuki T, Hasegawa A, Tajiri Y, Hanazawa R, Uchida K, Saito H, Yamaguchi H. Phylogenetic classification and species identification of dermatophyte strains based on DNA sequences of nuclear ribosomal internal transcribed spacer 1 regions. *J Clin Microbiol* 1999;37(4):920-4.
76. Gutzmer R, Mommert S, Küttler U, Werfel T, Kapp A. Rapid identification and differentiation of fungal DNA in dermatological specimens by LightCycler PZR. *J Med Microbiol* 2004;53:1207–14.
77. Uchida T, Makimura K, Ishihara K, Goto H, Tajiri Y, Okuma M, Fujisaki R, Uchida K, Abe S, Iijima M. 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;36:202–8.
78. Mochizuki T, Sugie N, Uehara M. Random amplification of polymorphic DNA is useful for the differentiation of several anthropophilic dermatophytes. *Mycoses* 1997;40:405–9.
79. Liu D, Coloe S, Baird R, Pedersen J. Application of PZR to the identification of dermatophyte fungi. *J Med Microbiol* 2000;49:493-7.
80. Durmaz R. Polimeraz zincir reaksiyonunun tipleri. İçinde Durmaz R, editör. *Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji*. 2. Baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 2001. s. 35-43.
81. Durmaz R, Özerol İH, Kalcioğlu T. Nazofarinks örneklerinde üç solunum patojeninin multiplaks polimeraz zincir reaksiyon (PZR) yöntemiyle araştırılması. XXIX Türk Mikrobiyoloji Kongresi kongre kitabı, Antalya:2000.s.373.
82. Gil-Lamagnere C, Roilides E, Hacker J, Müller F-MC. Molecular typing for fungi-a critical review of the possibilities and limitations of currently and future methods. *Clin Microbiol Infect* 2003;9:172-85.
83. Durmaz R. Mikozyların epidemiyolojik analizinde moleküler yöntemlerin yeri ve MLST yöntemine özet bir bakış. *İnfeksiyon derg* 2007;21(eki):173-9.
84. Koç AN. CLSI ve EUROCAST dışı yöntemlerle ilgili gelişmeler. XXXIV. Türk Mikrobiyoloji Kongresi (7-11 Kasım 2010, Girne). İstanbul, 2010:95-8.
85. CLSI. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi; Approved Standard-Second Edition. CLSI Document M38-A2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008.

86. Akdağlı SA. Antifungal duyarlılık testlerinde yeni neler var?: CLSI yöntemi ve yeni öneriler. XXXIV. Türk Mikrobiyoloji Kongresi (7-11Kasım 2010, Girne). İstanbul, 2010: 93.
87. Diogo HC, Melhem M, Sarpieri A, Pires MC. Evaluation of the disk-diffusion method to determine the in vitro efficacy of terbinafine against subcutaneous and superficial mycoses agents. *An Bras Dermatol* 2010;85(3):324-30
88. Solgun G, Fındık D, Dağı HT, Arslan U. *Trichophyton rubrum* klinik izolatlarının hemolitik aktivitesi ve antifungal ilaçlara in vitro duyarlılığının saptanması. *Mikrobiyol Bul* 2011;45(1):159-67.
89. Gupta AK, Cooper EA. Update in antifungal therapy of dermatophytosis. *Mycopathologia* 2008;166:353-67.
90. Aly R. Ecology and epidemiology of dermatophyte infections. *J Am Acad Dermatol* 1994; 31:21-5.
91. Gräser Y, El-Fari M, Presber W, Sterry W, Tietz H-J. Identification of common dermatophytes (*Trichophyton*, *Microsporum*, *Epidermophyton*) using polymerase chain reactions. *Br J Dermatol* 1998;138:576-582.
92. Koç AN. Mikozların laboratuvar tanısı, etken mantarın tür tanısı ve antifungal direnç analizinde moleküler yöntemlerin yeri. *İnfeksiyon derg* 2007;21(eki):165-72.
93. Davidson FD, Mackenzie DWR, Owen RJ. Deoxyribonucleic acid base compositions of dermatophytes. *J Gen Microbiol* 1980;118:465-70.
94. Koçoğlu E, Göksüğü N, Karabay O, Özbostancı B, İnce N, Parlak AH. Huzurevi sakinlerinde dermatofit infeksiyonları. *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 2007;37(4):209-12.
95. Meriç M, Yuluđkural Z, Keçeli S, Willke A. Onikomikoz ön tanılı olgulardan izole edilen dermatofit türleri ve mantar kültürünün tanısal değeri. *Mikrobiyol Bul* 2004;38:435-39.
96. Arca E, Saracli MA, Akar A, Yildiran ST, Kurumlu Z, Gur AR. Polymerase chain reaction in the diagnosis of onychomycosis. *Eur J Dermatol* 2004;14:52-5.
97. Kardjeva V, Summerbell R, Kantardjiev T, Devliotou-Panagiotidou D, Sotiriou E, Gräser Y. Forty-eight-hour diagnosis of onychomycosis with subtyping of *Trichophyton rubrum* strains. *J Clin Microbiol* 2006;44(4):1419-27.

98. Garg J, Tilak R, Singh S, Gulati AK, Garg A, Prakash P, Nath G. Evaluation of pan-dermatophyte nested PZR in diagnosis of onychomycosis. *J Clin Microbiol* 2007;45(10):3443-5.
99. Liu D, Pearce L, Lilley G, Coloe S, Baird R, Pedersen J. PZR identification of dermatophyte fungi *Trichophyton rubrum*, *T. soudanense* and *T. gourvilii*. *J Med Microbiol* 2002;51:117-22.
100. Gräser Y, Fröhlich J, Presber W, de Hoog S. Microsatellite markers reveal geographic population differentiation in *Trichophyton rubrum*. *J Med Microbiol* 2007;56:1058-65.
101. Tietz HJ, Hopp M, Gräser Y. First isolation of *Trichophyton raubitschekii* (syn. *T. rubrum*.) in Europe. *Mycoses* 2002;45:10-4.
102. Arabatzis M, Velegraki A, Kantardjiev T, Stavrakieva V, Rigopoulos D, Katsambas A. First report on autochthonous urease-positive *Trichophyton rubrum* (*T. raubitschekii*) from South-east Europe. *Br J Dermatol* 2005;153:178-82.
103. Yücel A, Mohammed FS. *Trichophyton mentagrophytes* ile *T. rubrum*'un birbirinden ayırt edilmesi. *Cerrahpaşa Tıp Derg* 1983;14:85-91.
104. Erbakan N, Erdem C, Erdem B. Identification of *Trichophyton rubrum* and *Trichophyton mentagrophytes* by classical methods. In: Tümbay E, Ed. FEMS Symposium on Dermatophytes and Dermatophytes in Man and Animals (May 21-2, 1986, İzmir) Proceedings. İzmir: Bilgehan Publishing House, 1988:150-9.
105. Ertam İ, Aytimur D. Culture results of tinea pedis and onychomycosis during 1995-2003. *Türkiye Klinikleri J Dermatol* 2004;14:184-8.
106. Summerbell RC, Cooper E, Bunn U, Jamieson F, Gupta AK. Onychomycosis: a critical study of techniques and criteria for confirming the etiologic significance of nondermatophytes. *Med Mycol* 2005;43:39-59.
107. Kano R, Hirai A, Muramatsu M, Watari T, Hasegawa A. Direct detection of dermatophytes in skin samples based on sequences of the chitin synthase 1 (*CHS1*) gene. *J Vet Med Sci* 2003;65(2):267-70.