



Dermatofitlerin identifikasyonunda moleküler yöntemlerin yeri ve uygulanabilirliğinin belirlenmesi

The place of molecular methods in the identification of dermatophytes and the determination of their feasibility

Fatma Bıyık, Yvonne Gräser*, Serdar Susever, Güzin Özarmağan**, Yıldız Yeğenoğlu

Istanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, **Deri ve Zührevi Hastalıklar Anabilim Dalı İstanbul, Türkiye

*Humboldt Üniversitesi, Mikrobiyoloji ve Hijyen Enstitüsü, Berlin, Almanya

Özet

Amaç: Dermatofitler geleneksel izolasyon besiyerlerinde fırsatçı mantarlar gibi birkaç günde izole edilemezler. Uygun ortamda üreme süreleri yaklaşık olarak iki haftayı kapsar ve identifikasyonunda tipik makroskopik, mikroskopik özellikler ve biyokimyasal testler gibi geleneksel yöntemlerden yararlanır. Ancak fenotipik özellikler ile her zaman başarılı sonuçların alınmayışı, bu nedenle tanı ve tedavide oluşabilecek gecikme ve sorunlar, nükleik asit amplifikasyon temeline dayalı yöntemlerden yararlanmayı gerekli kılmıştır. Bu çalışmada geleneksel yöntemler ile identifikasyonu yapılan 56 dermatofit suşunun moleküler yöntemlerle de identifiye edilerek her iki yöntemin birbirleriyle uyum derecelerinin araştırılması ve moleküler yöntemlerin rutin laboratuvarlarda kullanılabilirliklerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntemler: Dermatofitoz ön tanılı 270 hastanın çeşitli klinik örnekleri (saç+saçlı deri, deri ve tırnak kazıntısı) öncelikle geleneksel yöntemlerle incelenmiş; Sabouraud dekstroza agar, mısır unlu agar ve patates dekstroza agar besiyerleri izolasyon amacı ile kullanılmıştır. Gerekliğinde üreyi hidrolize etme, Trichophyton agar besiyerlerindeki çeşitli vitaminleri kullanabilme özellikleri araştırılmıştır. Moleküler tanı amacı ile polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ve sekans analizi yapılmıştır.

Bulgular: Geleneksel yöntemler ile suşların 37 (%66,1)'sinin Trichophyton (T) rubrum, dördünün (%7,1) T. mentagrophytes, dördünün (%7,1) T. tonsurans, birinin (%1,8) T. violaceum, sekizinin (%14,3) Trichophyton cinsinden, birinin (%1,8) Microsporum (M) canis, birinin (%1,8) Microsporum cinsinden olduğu saptanmıştır. Moleküler (T1 PCR, 25 GA PCR, ITS PCR-RFLP ve sekans analizi) identifikasyon sonuçlarına göre ise 41 suş (%73,2) T. rubrum, 10 suş (%17,8) T. interdigitale, bir suş (%1,8) T. violaceum, iki suş (%3,6) M. canis, bir suş (%1,8) Peacomyces lilacinus, bir suş (%1,8) Aspergillus fumigatus olarak belirlenmiştir.

Sonuç: Çalışmanın sonuçları identifikasyonlarında zorluk çekilen dermatofitlerin cins ve tür düzeyinde tanımlanmasında moleküler yöntemler ile hızlı ve güvenilir sonuçlar alındığını göstermiştir. (Türkderm 2013; 47: 26-32)

Anahtar Kelimeler: Dermatofit, Trichophyton spp, Microsporum spp, PCR, RFLP

Summary

Background and Design: Unlike opportunistic fungi, dermatophytes cannot be isolated on the conventional culture media in a few days. Their growing periods cover approximately two weeks in a suitable media and identification are made with conventional methods as typical macroscopic and microscopic appearance. However, successful results are not always obtained with the phenotypic features, and thus, diagnostic problems and delay in diagnosis and treatment may arise. For this reason, the methods based on nucleic acid amplification have been necessary. In this study, we aimed to identify 56 dermatophytes strains, which were identified by conventional methods, by molecular methods and to investigate the correlation between the two methods and to determine the usability of molecular methods in routine laboratories.

Yazışma Adresi/Address for Correspondence: Dr. Serdar Susever, İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye
Tel.: +90 212 414 20 00/32602 E-posta: ssusever2@yahoo.com **Geliş Tarihi/Received:** 12.04.2012 **Kabul Tarihi/Accepted:** 26.12.2011

Türkderm-Deri Hastalıkları ve Frengi Arşivi Dergisi, Galenos Yayınevi tarafından basılmıştır.
Türkderm-Archives of the Turkish Dermatology and Venerology, published by Galenos Publishing.



Materials and Methods: Several clinical samples of 270 patients with suspected dermatophytoses (hair+scalp, skin and nail scrapings) were examined by conventional methods; Sabouraud dextrose agar, corn meal agar and potato dextrose agar were used for isolation. In case of necessity to hydrolyze urea, to be used different vitamins in Trichophyton agar media were investigated. Polymerase chain reaction (PCR) and sequence analyses were done for the molecular diagnosis.

Results: Using conventional methods, 37 strains (66,1%) were identified as Trichophyton(T) rubrum, four (7.1%) - T.mentagrophytes, four (7.1%) - T.tonsurans, one (1.8%) - T.violaceum, eight (14.3%) - Trichophyton spp., one (1.8%) - Microsporum(M) canis, and one (1.8%) - Microsporum spp. According to the molecular and sequence analyses results (T1PCR, 25GAPCR, ITSPCR-RFLP and sequence analyses), 41 (73.8%) strains were identified as T.rubrum, 10 (17.8%) - T.interdigitale, one (1.8%) - T. violaceum, two (3.6%) - M. canis, one (1.8%) - Peacilomyces lilacinus, and one (1,8%) - Aspergillus fumigatus.

Discussion: This study suggests that, molecular methods offer fast and reliable results in identification of dermatophytes. (Turkderm 2013; 47: 26-32)

Key Words: Dermatophyte, Trichophyton spp., Microsporum spp., PCR, RFLP.

Giriş

Dermatofitler; keratini sindirip saçta, tırnakta ve deride dermatofitoz (ringworm, tinea) olarak tanımlanmış klinik tabloya neden olan; *Epidermophyton*, *Microsporum* (M) ve *Trichophyton* (T) olmak üzere üç anamorf cinsten oluşan keratinofilik mantarlardır¹.

Dermatofitlerin geleneksel olarak mikolojik açıdan tanımlanması, klinik örnekteki mantar elemanlarının direkt mikroskopik identifikasyonu ve onu izleyerek kültürel yöntemlere dayanmaktadır^{2,3,4}. Direkt mikroskopik inceleme hızlı ve ekonomik olmasına rağmen cins / türe özgü değildir. Ayrıca bu yöntem yeterince duyarlı olmayıp, örneklerin %5-15'inde yanlış negatif sonuç vermektedir⁵. Dermatofitlerin cins/tür düzeyindeki identifikasyonları için uygulanan rutin yöntemler, koloninin makroskopik olarak incelenmesi (koloni yüzeyi ve tersinin rengi, büyüme hızı ve yapısı) ve mikroskopik morfolojisine [mikrokonidyum, makrokonidyum ve hif biçimleri (spiral, nodüler, taraksı, favus şamdani)] dayanır⁶. Ancak farklı cins ve türlerin morfolojik özellikleri her zaman sabit olmayıp, farklı besiyerlerinde birkaç haftalık inkübasyon sonrasında bile özgün yapılar gözlenmeyebilir^{1,7}. İleri identifikasyonda besin gereksinimleri (vitaminler ve amino asitler), üreaz üretimi, sorbitol asimilasyonu, patates dekstroz agar (PDA) ve mısır unlu agarda (MUA) pigment oluşumu, in vitro saç perforasyonu gibi deneyler uygulanır^{1,8-10}. Fakat bu deneyler uzun zaman almaları ve sonuçta her zaman yeterli bilgiyi vermemeleri gibi negatif özelliklere sahiptir^{1,7,11}.

Geleneksel yöntemler, dermatofitlerin fenotipik özelliklerinin incelenmesini esas alır ve bu özellikler; sıcaklık değişimleri, ortam, kemoterapi gibi dermatofitlerin metabolik gelişmelerine engel olabilen ve in vitro kültür sonuçlarının yorumunu etkileyen dış ortam şartlarından kolayca etkilenebilirler^{1,7,12}. Ayrıca fenotipik özellikler; genellikle suştan suşa değişkenlik gösterebilir, mikroorganizma ayırt edici özelliklerini ya da spor oluşturma aktivitesini yitirebilir. Böyle koşullarda gerek cins, gerekse tür düzeyinde identifikasyon için daha güvenilir temellere dayalı yöntemleri uygulamak gerekir^{2,4,12,13}.

Dermatofit enfeksiyonları, genellikle yaşamı tehdit etmediklerinden; çok bulaşıcı ve yaygın olmalarına rağmen, sıklıkla pek de önemsenmeyen patojen mikroorganizmalar olarak kabul edilmişlerdir². Bunun yanısıra immün yetersizliği olan hasta sayısı ve yaşlı nüfustaki artış, geniş spektrumlu antibiyotiklerin gereksiz ve fazla kullanımı, spor salonlarına katılımın çoğalması, dermatofitozların da içinde bulunduğu, mantar enfeksiyonlarında, morbidite artışının önemli etkenlerinden olmuştur^{1,7,12}. Kemoterapinin uygulanması; rastgele modifikasyonlara ve dermatofitlerin morfolojik karakterlerinin değişmesine neden olmuş, sonuç olarak tipik olmayan koloni gelişimi ve görünümünün meydana gelmiş olması, fenotipik özelliklere dayalı yöntemlerin değerlendirilmesini zorlaştırmıştır. Tüm bu nedenlerden dolayı uygun

tedavi ve koruyucu önlemlerin uygulanabilmesi, hızlı, titiz tanı ve benzer dermatofitlerin ayrımı için gelişmiş laboratuvar yöntemlerine gereksinim duyulmuştur^{2,14,15}.

Moleküler yöntemler patojen mikroorganizmada genetik farklılıkların belirlenmesi temeline dayanmaktadır. Bu yöntemler fenotipik özellikleri saptayıcı yöntemlere göre daha duyarlı ve kesindir^{2,16}. Çünkü genotipik özellikler, nispeten sabit olup; sıcaklık değişimleri ve kemoterapi gibi dış ortam şartlarından daha az etkilenirler².

Son yıllarda nükleik asit amplifikasyon teknolojisinin geliştirilmesi ve uygulanması; dermatofitlerin mikolojik yönden tanısının hızlanması, güvenilir ve kesin sonuçlar alınmasını sağlamıştır². Günümüzde mitokondriyal DNA (mtDNA), 18S ve 28S ribozomal RNA'yı (rRNA) kodlayan gen bölgeleri, ITS1, ITS2 ve nontranscribed spacer (NTS) bölgelerinin kesilmiş bant uzunluğu farklılığı (RFLP)^{15,17-20}; rastgele başlatıcılı PCR (AP-PCR, RAPD ya da DNA fingerprinting)^{2,21}; çoğaltılan parça uzunluğu farklılığı (AFLP)²²; yuvalanmış PCR (nested PCR)²¹; çoklu PCR (multiplex PCR)²³; LightCycler PCR²⁴; hibridizasyon²⁵⁻²⁷ gibi birçok moleküler yöntem dermatofitlerin identifikasyonunda kullanılmaktadır.

Bu çalışmada geleneksel yöntemler ile identifikasyonu yapılan 56 dermatofit suşunun moleküler yöntemlerle de tanımlanarak her iki yöntemin birbirleriyle uyum derecelerinin araştırılması ve moleküler yöntemlerin rutin laboratuvarlarda kullanılabilirliklerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem

İstanbul Tıp Fakültesi Dermatoloji Polikliniği'ne; Aralık 2006 - Mart 2007 tarihleri arasında başvuran hastalardan alınan 270 klinik örnek (saç+saçlı deri, deri ve tırnak kazıntısı), İstanbul Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda geleneksel yöntemler ile (direkt mikroskopi + kültür) incelenmiş ve etken olarak izole edilip dermatofit olduğu düşünülen 56 suş ayrıca moleküler testler (T1 PCR, 25 GA PZR, ITS PCR-RFLP ve sekanslama) ile de tanımlanmıştır. Çalışmanın bu aşaması Institut für Mikrobiologie und Hygiene der Humboldt Universität Berlin, Charité'de gerçekleştirilmiştir. Çalışmada ayrıca *T. rubrum* M109a, *T. rubrum* J31, *T. violaceum* M68, *T. violaceum* M73 (Institut für Mikrobiologie und Hygiene der Humboldt Universität Berlin, Charité'de tanımlanmış suşlar), *T. rubrum* CBS 118892, *T. interdigitale/Arthroderma vanbreuseghemii* CBS 429.63, *Arthroderma benhamiae* CBS 623.66, *M. canis* CBS 113480, *T. tonsurans* CBS 127.97, *M. vanbreuseghemii* CBS 243.66 suşları referans olarak kullanılmıştır. Yüzeysel mikoz kuşku (saç + saçlı deri, deri ve tırnak kazıntısı) hasta örneklerine %10-15 KOH+kalkoflor beyazı eklenerek hazırlanan preparasyonlar floresan mikroskop yardımıyla incelenmiş ve mantar elemanları (hif ve sporlar)

arandıktan sonra, Sabouraud dekstroza agar (SDA), MUA ve PDA besiyerlerine ekilerek oda ısısında, dört hafta bekletilmiştir. Üreyen kolonilerden laktofenol pamuk mavisi kullanılarak selofan bant ve / veya lam kültürü yöntemiyle preparasyonlar hazırlanmış, mikroskopta incelenerek; makro, mikrokonidyum ve hif yapılarına göre identifikasyon yapılmıştır^{1,7}. İdentifikasyonlarında zorluk çekilen dermatofitlerin gerektiğinde Christensen'in üre agarı besiyerine ekilerek, yedi gün boyunca oda ısısında inkübasyonu yapılmış, besiyeri renginin pembeye dönüşmesi pozitif, renkte herhangi bir değişme olmaması negatif olarak kabul edilmiştir^{1,9,10}. *Trichophyton* cinsinden olduğu düşünülen dermatofitlerin tür düzeyinde tanısı için *trichophyton* agar besiyerlerinin her birine, ekim yapılmış ve bu besiyerleri oda ısısında iki hafta boyunca inkübe edilmiştir. En fazla üreme gösteren besiyeri dört pozitif olarak belirlenmiş diğer besiyerleri bununla karşılaştırılarak değerlendirilmiştir^{6,7,12}. Klinik örneklerin ve referans suşların moleküler yöntemler ile tanımlanmasında; ilk aşamada DNA ekstraksiyon kiti [Illustra tissue & cells genomicPrep Mini Spin Kit (GE Healthcare, İngiltere)], ile referans suşlardan ve hasta örneklerinden mantar DNA'sı saptanmıştır. *T. rubrum* ve *T. violaceum*'a özgü PCR (T1 PZR) ve (25 GA PZR) için Ohst ve Gräser'ın yöntemleri uygulanmıştır^{28,29}. Geleneksel yöntemlerle *T. mentagrophytes*, *T. tonsurans*, *Trichophyton* cinsinden, *M. canis* ve *Microsporum* cinsinden olarak identifiye edilen dermatofitler için ITS PCR yapılmıştır^{30,31}. PCR(T1 PCR)'da³⁰ "master mix" için DNA(~20 ng), 10 mM Tris-HCl (pH 8), 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, dNTP (her biri için 200 uM dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 30 pmol primerler [ACnT1.for5'-TGCTGCTGGCCTGACTGACC, ACnT1.rev5'-GTAAGGTG GCTAGTTAGGGG (280 bç)], 2,5 U Taq DNA polimeraz kullanılmış ve toplam hacim 46 ul olarak belirlenmiştir. PCR döngüsü 95°C'de 10 dakika (1 döngü) [95°C'de 30 saniye, 60°C'de 30 saniye 72°C de 45 saniye (30 döngü)] ve 72°C'de 3 dakika olarak gerçekleştirilmiş, elde edilen PCR ürünlerinin kontrolü için %1,4'lük agaroz jel hazırlanıp, elektroforezde 120 volt altında yaklaşık bir saat yürütülmüştür. Jel, etidyum bromür (0,5 ug/ml) ile boyandıktan sonra DNA bantları ultraviyole ışığı altında incelenmiş ve fotoğrafı çekilmiştir. 25 GA PCR'da²⁹ "master mix" için DNA(~100 ng), 10 mM Tris-HCl (pH 8), 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, dNTP (her biri için 200 uM dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 30 pmol primerler[R28-25GAR5'-GCCTGTGCG TGCTTACTG (142 bç)], 2,5 U Taq DNA polimeraz kullanılmış ve toplam hacim 50 ul olarak belirlenmiştir. PCR döngüsü 95°C'de 10 dakika (1 döngü) [95°C'de 30 saniye, 58°C'de 30 saniye, 72°C de 45 saniye (30 döngü)] ve 72°C'de 10 dakika olarak gerçekleştirilmiş, elde edilen PCR ürünlerinin kontrolü için %1,4'lük agaroz jel hazırlanıp, elektroforezde 120 volt altında yaklaşık bir saat yürütülmüştür. Jel, etidyum bromür (0,5 ug/ml) ile boyandıktan sonra DNA bantları ultraviyole ışığı altında incelenmiş ve fotoğrafı çekilmiştir. ITS PCR'da^{30,31} "master mix" için DNA(~25 ng), 10 mM Tris-HCl (pH 8), 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, dNTP (her biri için 200 uM dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 50 pmol primerler [Mas 266 5'-GCA TCCCAAACAACCTGACTC,V9D5'-TTACGTCCCTGCCCTTGTGA (1000 bç)], 2 U Taq DNA polimeraz kullanılmış ve toplam hacim 50 ul olarak belirlenmiştir. PCR döngüsü 94°C'de 5 dakika (1 döngü) [94°C'de 1 dakika, 56 °C'de 1 dakika, 72°C de 1 dakika (29 döngü)] ve 72 °C'de 10 dakika olarak gerçekleştirilmiş, elde edilen PCR ürünlerinin kontrolü için %1,4'lük agaroz jel hazırlanıp, elektroforezde 120 volt altında yaklaşık bir saat yürütülmüştür. Jel, etidyum bromür (0,5

ug/ml) ile boyandıktan sonra DNA bantları ultraviyole ışığı altında incelenmiş ve fotoğrafı çekilmiştir. ITS PCR ürünlerinin RFLP analizi için³¹, PCR ürününden 20 ul alınıp üzerine, 2ul Na-asetat (3M) ve 50 ul etil alkol (%96'lık) ilave edilmiş ve 4 °C'de bir gece inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası tüpler on dakika 13000 rpm'de santrifüj edilmiş, pelet üzerine 500ul tekrar 70'lik etil alkol eklenerek 13000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Üst sıvısı atılan tüplere 30 dakika kurutulduktan sonra, 18ul distile su2 ul 10XR+ tampon ve 10 U Mva I enzimi eklenerek uygun bölgenin kesilmesi için 37°C'de 4 saat inkübe edilmiştir. Kesim ürünlerinin kontrolü için % 2'lik MetaPhor agaroz jel hazırlanıp, elektroforezde 120 volt altında yaklaşık 1 saat yürütülmüştür. Jel etidyum bromürle (0,5 ug/ml) boyandıktan sonra ultraviyole ışığı altında fotoğraf çekilmiştir.

ITS PCR-RFLP sonucunda tanımlanamayan suşlar ve daha sonra çalışma kapsamına alınan *T. violaceum* için sekans analizi yapılmıştır. ITS ürünleri, "QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen)" ile saflaştırılmış, elde edilen DNA'nın, "BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, ABD)" protokolüne göre ITS5 (5'-GGAAGTAAAGTCGTAACAAGG) primeri kullanılarak 3130xl DNA Analyzer (Applied Biosystems, ABD) ile dizi analizi elde edilmiştir. Elde edilen dizinin "National Center for Biotechnology Information" internet sayfasında bulunan nucleotide BLAST programı ile gen bankasındaki nükleotid dizilerinin karşılaştırılması sonucunda identifikasyonu yapılmıştır³².

PCR reaksiyonları kontrollü olarak gerçekleştirilmiştir. PCR reaksiyonunun uygulanabilmesi için, gerekli olan DNA konsantrasyonunda çalışabilmek amacı ile izole edilen DNA'nın normal ve 1:4 oranında sulandırılmış konsantrasyonu iki farklı amplifikasyon tüpüne eklenmiş, böylece her suş için iki farklı DNA konsantrasyonu kullanılarak PCR yapılmıştır. Ayrıca her suş için daha önceden çoğaltıldığı bilinen diğer bir DNA ile, test edilen DNA, aynı amplifikasyon tüpüne konularak PCR reaksiyonunun test edilen suş için inhibe edilmediği kontrol edilmiştir. DNA ekstraksiyon kitinin kontrolü için ise, ayrı bir amplifikasyon tüpünde herhangi bir DNA eklenmeden, DNA ekstraksiyon aşamasından PCR sonuna kadar işlem yapılmış, elektroforez sonucunda, bu tüpte amplifikasyonun gerçekleşmediğinin saptanması, ekstraksiyon kitinin kontamine olmadığını göstermiştir.

Bulgular

Çalışma kapsamına alınan 56 dermatofit suşunun 26 (%46,4)'si ayak tırnağından, 12 (%21,4)'si ayak parmak arasından, 8 (%14,3)'i ayak tabanından, 2 (%3,6)'si el tırnağından, 4 (%7,1)'ü gövdeden, 2 (%3,6)'si kasıktan ve 2 (%3,6)'si saç+sacıklı deriden izole edilmiştir. Dermatofit izole edildiği düşünülen 56 klinik örneğin doğrudan mikroskopik incelenmesinde; 53 (%94,6)'ünde mantar elemanları görülürken, 3 (%5,4)'ünde görülemez. Üreyen kolonilerin selofan band / lam kültürü yöntemi ve laktofenol pamuk mavisi ile hazırlanan preparasyonlarında 37 (%66,1)'sinin *T. rubrum*, dördünün (%7,1) *T. mentagrophytes*, dördünün (%7,1) *T. tonsurans*, birinin (%1,8) *T. violaceum*, sekizinin (%14,3) *Trichophyton* cinsinden, birinin (%1,8) *M. canis*, birinin (%1,8) *Microsporum* cinsinden olduğu belirlenmiştir. Benzer makroskopik ve mikroskopik özelliklere sahip olan *T. rubrum*, *T. mentagrophytes* ve *Trichophyton* cinsinden olarak adlandırılan suşların, daha doğru identifikasyonunu sağlamak için; makroskopik ve mikroskopik incelemeler dışında rutin uygulamada pratikliği nedeniyle

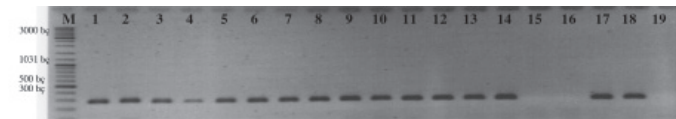
yeğlenen, sporulasyonu ve pigment oluşumunu uyaran MUA / PDA ve üreaz oluşumunu sağlayan üre agar, besiyerlerine ekim yapılmıştır. *T. rubrum* olarak tanımlanan 37 suştan yedisi üreyi hidrolize ederken, altısının etmediği ve 24'ünün üreyi hidrolize etme yeteneğinin zayıf olduğu saptanmıştır. *T. mentagrophytes* olarak tanımlanan dört suştan üçü üreyi hidrolize etmiş, biri etmemiş, *T. tonsurans* olarak tanımlanan dört suştan biri üreyi hidrolize etmiş, üçünün üreyi hidrolize etme yeteneğinin zayıf olduğu saptanmıştır. Trichophyton cinsinden olarak tanımlanan sekiz suştan ikisi üreyi hidrolize etmiş, biri etmemiş ve beşinin üreyi hidrolize etme yeteneğinin zayıf olduğu bulunmuştur. %1 glikoz içeren MUA besiyerinde; *T. rubrum* olarak tanımlanan 37 suştan 29'u kırmızı, biri kahverengi pigment oluştururken, yedisi oluşturmamıştır. *T. mentagrophytes* olarak tanımlanan dört suştan biri kırmızı pigment oluştururken, üçü pigment oluşturmamıştır. *Trichophyton* cinsinden olarak tanımlanan sekiz suştan beşi kırmızı pigment oluştururken, üçü pigment oluşturmamıştır. PDA'da; *T. rubrum* olarak tanımlanan 37 suştan 32'si kırmızı, biri kahverengi pigment oluştururken, dördü pigment oluşturmamıştır. *T. mentagrophytes*

olarak tanımlanan dört suştan ikisi kırmızı, biri kahverengi pigment oluştururken, biri pigment oluşturmamıştır. *Trichophyton* cinsinden olarak tanımlanan sekiz suştan dördü kırmızı, üçü kahverengi pigment oluştururken, biri pigment oluşturmamıştır.

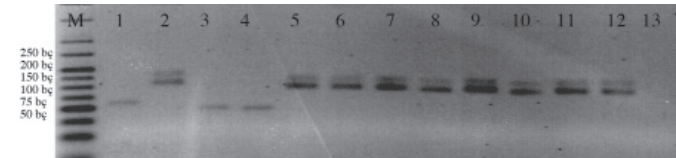
Trichophyton türlerinin doğru adlandırılmasının gerçekleştirilmesi için diğer teslerin yanı sıra vitamin gereksinimlerini sağlayabilme temeline dayalı trichophyton agar 1-7 besiyerlerinden yararlanılmıştır.

Laktofenol pamuk mavisi kullanılarak yapılan preparasyon, üre hidrolizi, MUA ve PDA besiyerlerinde pigment oluşturma ve trichophyton agar 1-7 besiyerlerindeki pozitiflik sonuçlarına göre 56 suştan 29'u *T. rubrum*, üçü *T. mentagrophytes*, ikisi *T. tonsurans*, biri *T. violaceum*, 19'u *Trichophyton* cinsinden, biri *M. canis*, biri *Microsporum* cinsinden olarak adlandırılmıştır.

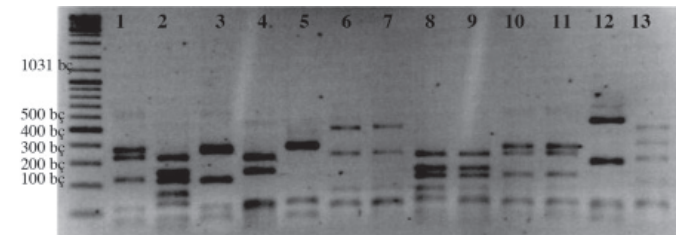
Geleneksel yöntemler ile *T. rubrum*, *T. mentagrophytes*, *T. tonsurans*, *T. violaceum*, *Trichophyton* cinsinden, *M. canis* ve *Microsporum* cinsinden olarak tanımlanan suşların kesin identifikasyonları T1 PCR, 25 GA PCR, ITS PCR-RFLP ve sekanslama yöntemleri uygulanarak sağlanmıştır. Fenotipik özelliklerine göre *T. rubrum* olarak tanımlanan 29 suş, T1 PCR ve 25 GA PCR ile de *T. rubrum* olarak saptanmıştır. *T. mentagrophytes* olarak tanımlanan üç suş ITS PCR-RFLP ile *T. interdigitale* olarak belirlenmiştir. *T. tonsurans* olarak tanımlanan iki suşun biri ITS PCR-RFLP ile *T. interdigitale*, diğeri ise ITS PCR-sekanslama ile *Aspergillus (A) fumigatus* olarak tanımlanmıştır. *T. violaceum* olarak tanımlanan bir suş ITS PCR-sekanslama ile de *T. violaceum* olarak tanımlanmıştır. *Trichophyton* cinsinden olarak tanımlanan 19 suşun ITS PCR-RFLP ile 12'sinin *T. rubrum*, altısının *T. interdigitale*, ITS PCR-sekanslama ile birinin *Peacilomyces (P) lilacinus* olduğu saptanmıştır. *M. canis* olarak tanımlanan bir suş ITS PCR-RFLP ile de *M. canis* olarak tanımlanmıştır. *Microsporum* cinsinden olarak belirlenen bir suş ITS PCR-RFLP ile *M. canis* olarak tanımlanmıştır (Şekil 1). Moleküler yöntemler kullanıldığında 41 (%73,2) suş *T. rubrum*, 10 (%17,8) suş *T. interdigitale*, bir (%1,8) suş *T. violaceum*, iki (%3,6) suş *M. canis*, bir (%1,8) suş *A. fumigatus*, bir (%1,8) suş *P. lilacinus* olarak saptanmıştır.



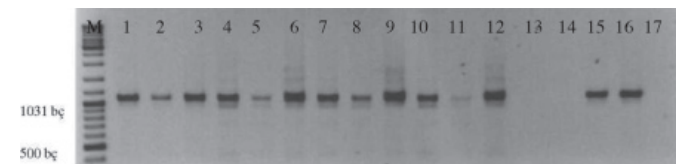
M: Marker (Gene Ruler DNA Ladder Mix, Fermentas) 1: *T. rubrum* CBS 118892, 2: *T. violaceum* M68, 3: *T. rubrum / T. violaceum* 3, 4: *T. rubrum / T. violaceum* 3 (1:4), 5: *T. rubrum / T. violaceum* 3 (inhibisyon), 6: *T. rubrum / T. violaceum* 29 7: *T. rubrum / T. violaceum* 29 (1:4), 8: *T. rubrum / T. violaceum* 29 (inhibisyon), 9: *T. rubrum / T. violaceum* 28, 10: *T. rubrum / T. violaceum* 28 (1:4), 11: *T. rubrum / T. violaceum* 28 (inhibisyon), 12: *T. rubrum / T. violaceum* 49, 13: *T. rubrum / T. violaceum* 49 (1:4), 14: *T. rubrum / T. violaceum* 49 (inhibisyon), 15: Kontrol, 16: Kontrol 1:4, 17: Kontrol inhibisyon, 18: (+) Kontrol, 19: (-) Kontrol



M: Marker (Hyper Ladder V) 1: *T. rubrum* M109a, 2: *T. rubrum* J31, 3: *T. violaceum* M68, 4: *T. violaceum* M73, 5: *T. rubrum* 29, 6: *T. rubrum* 18, 7: *T. rubrum* 28, 8: *T. rubrum* 31, 9: *T. rubrum* 54, 10: *T. rubrum* 50, 11: *T. rubrum* 49, 12: (+) Kontrol, 13: (-) Kontrol.



M: Marker (Gene Ruler DNA Ladder Mix, Fermentas) 1: *T. rubrum* CBS 118892, 2: *T. interdigitale / A. vanbreuseghemii* CBS 429.63, 3: *A. benhamiae* CBS 623.66, 4: *T. tonsurans* CBS 127.97, 5: *M. vanbreuseghemii* CBS 243.66, 6: *M. canis* CBS 113480, 7: *M. canis* 52, 8: *T. interdigitale* 13, 9: *T. interdigitale* 26, 10: *T. rubrum* 21, 11: *T. rubrum* 35, 12: ITS PCR-RFLP sonucundatanımlanamayan suş 45 (*Peacilomyces lilacinus*), 13: ITS PCR-RFLP sonucunda tanımlanamayan suş 48 (*Aspergillus fumigatus*).



M: Marker Gene Ruler DNA Ladder Mix, Fermentas) 1: 46 numaralı suş, 2: 46 numaralı suş (1:4), 3: 46 numaralı suş (inhibisyon), 4: 37 numaralı suş, 5: 37 numaralı suş (1:4), 6: 37 numaralı suş (inhibisyon), 7: 35 numaralı suş, 8: 35 numaralı suş (1:4), 9: 35 numaralı suş (inhibisyon), 10: 19 numaralı suş 11: 19 numaralı suş (1:4), 12: 19 numaralı suş (inhibisyon), 13: Kontrol, 14: Kontrol 1:4, 15: Kontrol inhibisyon 16: (+) Kontrol, 17: (-) Kontrol.

Şekil 1. İzole edilen mantarların moleküler yöntemler ile identifikasyon sonuçları

Tartışma

Dermatofitlerin; tür, hatta seyrek de olsa cins düzeyinde tanımlanmalarında bile zaman zaman zorluklar yaşanabilir. İdentifikasyon için öncelikle; geleneksel yöntemler ile bu mikroorganizmaların kendilerine özgü makroskopik (renk, üreme hızı, koloni yapısı) ve mikroskopik (mikrokonidyum, makrokonidyum, hif yapısı) özelliklerinden yararlanılır; ancak her zaman tipik yapıların saptanamaması, karışıklıklara neden olabilir. Genellikle *Trichophyton* cinsinden, nadiren de *Microsporum* ve *Epidermophyton* cinsinden mantarların tür düzeyinde tanıları yapılırken bu sorunlarla karşılaşma olasılığı vardır. *T. rubrum* ve *T. mentagrophytes*'in çoğunlukla benzer makroskopik ve mikroskopik özellikler taşıması, ayırmaları açısından sadece morfolojilerinin yeterli olmadığını ve doğru tanıyı sağlamak için ek testlere gereksinim olduğunu göstermiştir. 1990'lı yıllarda mikolojik amaçla uygulanmaya başlanan türe özgü PCR, PCR-RFLP, AFLP, RAPD gibi testler kısa sürede kesin identifikasyonu sağlayabilmedeki başanlan nedeniyle giderek önem kazanmışlardır. Bu çalışmada 270 klinik örnek mikolojik yönden incelenmiş, 56 (%20,7)'sında yüksek olasılıkla dermatofit olduğu düşünülen mantar üretilirken, 214 (%79,3)'ünde dermatofit üremesi olmamıştır. İzole edilen 56 mantar suşu, çalışma kapsamına alınıp incelendiğinde, ait

oldukları klinik örneklerin 53 (%94,6)'ünün direkt mikroskopi ile pozitif, üçünün (%5,4) negatif yanıt verdiği görülmüş, suşların 37 (%66,1)'sinin *T. rubrum*, dördünün (%7,1) *T. mentagrophytes*, dördünün (%7,1) *T. tonsurans*, birinin (%1,8) *T. violaceum*, sekizinin (%14,3) *Trichophyton* cinsinden, birinin (%1,8) *M. canis*, birinin (%1,8) *Microsporum* cinsinden olduğu belirlenmiştir.

Bu çalışmada saptanan direkt mikroskopi sonuçlarının pozitiflik oranının yüksekliği; klinik açıdan olasılık oranı yüksek mikoz tanısı almış, kültürlerinde mantar üremiş ve antifungal kullanmamış olgulardan, uygun şekilde örnek alınıp incelenmiş olması ile açıklanabilir. Gerekli koşulların uygun olmadığı durumlarda; epidemiyolojik ve rutin çalışmalarda her zaman bu kadar yüksek pozitiflik oranları görülmeyebilir. Arca ve ark.'nin³³ 2004 yılında yaptıkları çalışmada 52 hastaya ait tırnak örneklerinin direkt mikroskopik incelenmesinde 40 (%77)'inde pozitiflik saptanırken, 12 (%23)'ünün kültüründe üreme görülmüştür. Kardjeva ve ark.³¹ 2006 yılında yaptıkları bir çalışmada 195 tırnak örneğinin direkt mikroskopik incelenmesi sonucunda 181(%93)'inde mantar elemanı gördüklerini, 44 (%22)'ünün kültüründe üreme olduğunu bildirmişlerdir. Garg ve ark.'nin³⁴ 2007 yılında inceledikleri 152 hasta örneğinin 96 (%63,4)'sı direkt mikroskopi, 38 (%25)'i kültürel inceleme sonucunda pozitif bulunmuştur.

Sözü geçen araştırmacılara ait çalışmalar epidemiyolojik temele dayandığı ve bu çalışmada ise; önceden izole edilmiş suşlar ile çalışıldığı için, saptanan veriler ile ilgili olarak herhangi bir karşılaştırma yapılamamıştır. Klinik örneklerden üretilen izolat sayısına [56 (%20,7)] ilişkin bulgular; Arca³³, Kardjeva³¹, Garg ve ark.³⁴'nin sonuçları ile uyumlu görülmektedir.

Trichophyton cinsinden mantarların tür düzeyinde tanımlanmalarında morfolojilerinin yanı sıra, üreyi hidrolize edebilme, pigment oluşturma, sorbitol asimilasyonu, saçı perfore edebilme (kıl delme), *trichophyton* agar 1-7 besiyerlerinde üreme testlerinden yararlanır. Çalışmada; bunlardan daha pratik oluşu nedeniyle üre hidrolizi, MUA/PDA'da pigment oluşturma ve *trichophyton* agar 1-7 besiyerlerinde üreme testleri tercih edilmiş, sonuç olarak 29 (%51,8) suş *T. rubrum* olarak belirlenmiştir. Olguların çoğundan *T. rubrum*'un izole edilmiş olması, birçok çalışmada vurgulandığı gibi tüm dermatofitoz olgularında *T. rubrum*'un birincil etken olarak saptanması ile uyumludur³⁵⁻³⁸. *T. rubrum*'un üreyi hidrolize etmediği, *T. mentagrophytes* ve *T. tonsurans*'in hidrolize ettiği bildirilmiştir^{1,6}. MUA ve PDA besiyerlerinde *T. rubrum* kırmızı pigment oluştururken, *T. mentagrophytes* oluşturmaz¹⁰. *Trichophyton* cinsine ait tüm türlerin; ürenin hidrolizi, MUA / PDA'da pigment oluşturma, *trichophyton* agar 1-7 besiyerlerinde üreme testleri ile her zaman beklenen sonucu vermediği, değişkenlik gösterdiği belirlenmiştir. Makroskopik ve mikroskopik özelliklerinin esas alınmasıyla daha önceden *T. rubrum* olarak adlandırılan sekiz suş, fizyolojik test sonuçlarına göre *Trichophyton* cinsinden; *Trichophyton* cinsinden olarak adlandırılan sekiz suş, yine *Trichophyton* cinsinden; *T. tonsurans* olarak adlandırılan iki suş, *Trichophyton* cinsinden; *T. mentagrophytes* olarak adlandırılan bir suş, *Trichophyton* cinsinden olarak belirlenmiş, 19 suşun morfolojik inceleme ve fizyolojik test sonuçlarına göre adlandırılmasının yeterli olmadığı görülmüştür. Sinski ve ark.'nin⁹ toplam 100 *T. rubrum* ve *T. mentagrophytes* suşu ile yaptıkları bir çalışmada üreaz deneyi %95 doğru, %4 yanlış pozitif ve %1 yanlış negatif olarak belirlenmiştir. Gräser ve ark.²⁸, moleküler yöntemler ile identifikasyonunu yaptıkları 233 *T. rubrum* suşunun 19'unun üreyi hidrolize ettiğini bildirmişlerdir. Gräser ve ark.²² yaptıkları diğer bir çalışmada moleküler yöntemler ile identifiye ederek *T. rubrum* adı altında sınıflandırdıkları *T. kuryangei*, *T. megninii* ve

T. raubitschekii ve *T. rubrum* var. *nigricans*'in üre hidrolizini pozitif olarak saptamışlardır, van Gelderen de Komaid ve Borges de Kestelman³⁹, Arabatzis ve ark.⁴⁰, Tietz ve ark.⁴¹ da yaptıkları çalışmalarda üreaz pozitif *T. rubrum* (*T. raubitschekii*) suşlarını izole etmişlerdir. Sinski ve ark.'nin⁹ yaptığı çalışmada PDA'da pigment oluşumu deneyi %82 oranında doğru, %7 oranında yanlış pozitif ve %11 oranında yanlış negatif sonuç vermiştir. Bu çalışmaların sonuçları esas alındığında; üreaz testi, MUA ve PDA'da pigment oluşumu deneylerinin *T. rubrum* ve *T. mentagrophytes*'i birbirinden kesin olarak ayırt edemediği görülmektedir. Çalışmada *trichophyton* agar 1-7 besiyerlerindeki üreme yoğunlukları karşılaştırıldığında bu besiyerinin *T. rubrum* ve *T. mentagrophytes*'in ayırımında yeterli olmadığı; *T. violaceum*'un, *T. rubrum* ve *T. mentagrophytes*'ten farklı olarak sadece üç ve dördüncü besiyerlerinde daha iyi ürettiği, diğerlerinde üremenin zayıf olduğu bulunmuştur. Tüm bu veriler kesin identifikasyonu sağlamak için geleneksel yöntemlerin yeterli olmadığını göstermekte olup, birçok çalışma bu görüşümüzü destekleyici nitelik taşımaktadır. Gräser ve ark.'nin^{22,42} yaptıkları araştırmalarda da *trichophyton* agar 1-7 besiyerindeki üremelerde, farklı türler arasında anlamlı farklar olmadığı gösterilmiştir. Weitzman ve ark.⁴³ da *T. soudanense*'nin identifikasyonunda *trichophyton* agarların kullanılmaması gerektiğini bildirmişlerdir.

Özellikle son yıllarda moleküler testlerin uygulanması sonucunda mikolojik terminolojide büyük değişiklikler olmuştur. Birçok yeni tür ve alt türün tanımlanması, çalışmaların yeniden gözden geçirilmesine ve araştırmacılar arasında fikir ayrılığına neden olmuştur. Özellikle *T. mentagrophytes* ve *T. rubrum* ile ilgili olarak bu konuda çok sayıda yayın yapılmıştır.

Makimura ve ark.'nin¹³ 1999 yılında yaptığı çalışmada rDNA'nın ITS1 bölgesi sekanslanmış, *Trichophyton* cinsi mantarlar ITS1 bölgesinin sekanslanması sonucuna göre üç gruba ayrılmıştır. A. vanbreuseghemii, A. simii, *T. mentagrophytes* (insandan izole edilen suş), *T. mentagrophytes* var. *quinckeanum*, *T. tonsurans* ve *T. schoenleinii*, A. vanbreuseghemii-A. simii grubunda; A. benhamiae, *T. mentagrophytes* var. *erinacei* ve *T. verrucosum*, A. benhamiae grubunda; *T. rubrum* ve *T. violaceum* ise *T. rubrum* grubunda sınıflandırılmıştır. Bu çalışmada ayrıca 11 klinik suşun identifikasyonu yapılmıştır. Geleneksel yöntemlerle *T. rubrum* olarak tanımlanan üç, *T. mentagrophytes* olarak tanımlanan dört, *T. violaceum* olarak tanımlanan bir ve *M. canis* olarak tanımlanan bir suş ITS1 sekans analizine göre de aynı şekilde identifiye edilmiştir. Geleneksel yöntemler ile identifikasyonu yapılamayan iki suşun ITS 1 sekans analizi sonucunda biri *T. rubrum*, diğeri ise *T. violaceum* olarak tanımlanmıştır. Gupta ve ark.'nin⁴⁴ 2001 yaptıkları çalışmada *T. rubrum* infeksiyonu olan 16 ve *T. mentagrophytes* infeksiyonu olan 4 hastadan, antifungal tedavi uygulanan ve tedaviye ara verilen farklı dönemlerde 66 *T. rubrum*, 11 *T. mentagrophytes* suşu izole edilmiş; suşlara ait DNA'ların EcoRI enzimi kullanılarak kesimi sonucunda, 18S rDNA ve ITS bölgesinden düzenlenen prob ile hibridizasyon sonuçları karşılaştırılmıştır. Sonuçta *T. rubrum*'da beş, *T. mentagrophytes*'te ise iki farklı RFLP deseni belirlenmiştir. Ayrıca 10 farklı hastadan izole edilen *T. tonsurans* suşlarının aynı RFLP tipini oluşturduğu gözlenmiştir.

Terminolojisinde güçlük çekilen *T. interdigitale* ilk kez 1917'de yeni bir tür olarak tanımlanmış, Ajello tarafından 1967'de dermatofit olmadığı bildirilmiştir. Ancak daha sonra yapılan çalışmalarda antropofilik varyetesi *T. mentagrophytes* var. *interdigitale*, zoofilik varyetesi ise *T. mentagrophytes* var. *mentagrophytes* adını almış, 1979'da morfoloji, patojenite, coğrafi dağılımlar ve çiftleşme çalışmaları konusunda yoğun

araştırmalar yapılmıştır.1990'da *T.mentagrophytes* var. interdigitale genotipi mitokondriyal DNA kısıtlı enzim analizi ile araştırılmış, bant paternlerinin *A. vanbreuseghemii* ile identik olduğu gösterilmiştir. Aynı zamanda yapılan bazı çalışmalarda nüklear ribozomal RNA geni kullanıldığında ise identik bantlar görülmemiştir.Bazı çalışmacılar *T. interdigitale* olarak adlandırmayı tercih etse de^{14,22,28,42,45} son çalışmalarda, henüz yeterli aşamaya gelinmediği için karışıklığa neden olmamak açısından bazı çalışmalarda *T. mentagrophytes* var. interdigitale'nin kullanılması gerektiği belirtilmiştir⁴⁵. Bu çalışma Humboldt Üniversitesi'nde bu konuda çok sayıda araştırması olan ve *T. interdigitale* olarak adlandırmayı kabul eden ekip içinde yer alan Dr. Graser ile birlikte yapıldığından bu mantar adı makale içerisinde *T.interdigitale* olarak kullanılmıştır.

Mochizuki ve ark.'nın¹⁶ 2003 yılında yaptıkları çalışmada morfolojik özelliklerine göre *T. mentagrophytes* var. mentagrophytes olarak tanımlanan 20 ve *T. mentagrophytes* var. interdigitale olarak tanımlanan 47 olmak üzere toplam 67 suşun ITS1 ve ITS 2 PCR ve daha sonra Mval enzimi kullanılarak yapılan RFLP analizi sonucunda 60'ı *T. mentagrophytes* var. interdigitale, beşi *A. vanbreuseghemii*, biri *A. benhamiae* olarak tanımlanmış, bir suşun identifikasyonu yapılamamıştır. *T. mentagrophytes* var. interdigitale olarak tanımlanan 60 suş DNA'larının EcoRI enzimi ile kesilmiş, oluşan DNA parçalarının 18S rDNA'nın 3' ucu, ITS1, 5,8S rDNA, ITS2 ve 28S rDNA'nın 5' ucunu çoğaltan prob kullanılarak yapılan PCR sonucu, NTS bölgelerindeki polimorfizme göre 23 farklı RFLP deseni gözlenmiştir.

Ninet ve ark.'nın⁴, 2003 yılında yaptıkları çalışmada 28S rRNA'yı kodlayan gen bölgesinin bir kısmının sekans analizi yapılmıştır. Yüz otuz sekiz klinik, sekiz standart suş kullanılan çalışmada *T. rubrum*, *T. tonsurans*, *T. soudanense*, *T. violaceum*, *M. canis*, *M. audouinii*, *M. gypseum* ve *E. floccosum* tanımlanmış, *T. mentagrophytes* üç farklı tipe ayrılmıştır. İdentifikasyonu yapılan *T. mentagrophytes* suşlarının ITS1, 5,8S rDNA ve ITS2 bölgelerinin sekans analizi sonucunda ise *T. mentagrophytes* tip I ve II'nin birbirine benzer olduğu, Tip III'ün bunlardan farklı olduğu gösterilmiştir. Tip I ve tip II'nin bulunduğu grupta sınıflandırılan dermatofitler *T. mentagrophytes* var. interdigitale ile, Tip III'ün bulunduğu diğer grupta sınıflandırılanlar ise *T. mentagrophytes* var. mentagrophytes ile benzerlik göstermiştir.

Arca ve ark.'nın³³ 2004 yılında yaptıkları diğer bir çalışmada 52 hastadan alınan tırnak örneklerinin direkt mikroskopi, kültür ve PCR sonuçları karşılaştırılmıştır. Direkt mikroskopik incelemede 40 (%77) örnekte pozitiflik saptanırken, kültürde 12 (%23) örnekte üreme görülmüştür (yedi *T. mentagrophytes*, dört *T. rubrum*, bir *Acremonium* cinsi). Mantar türlerinin birbirlerinden ayırımı için mantar DNA'sının değişken olan ITS bölgelerine yönelik primerler kullanılmasıyla yapılan PCR sonucunda 20 (%38) örnekte pozitiflik saptanmış fakat PCR pozitifliği tür düzeyinde identifikasyonu sağlamamış, oluşan bantın büyüklüğüne göre pozitifliğin *M. gypseum*, *T. mentagrophytes* ya da *T. rubrum*'a ait olduğu belirtilmiştir.

Kardjeva ve ark.'nın³¹ 2006 yılında yaptıkları çalışmada geleneksel yöntemlerle *T. rubrum* olarak tanımlanan 55 dermatofit suşununun 51'i, *T. rubrum*'a özgü primer kullanılarak tanımlanmıştır. İdentifikasyonu yapılamayan dört suş için ITS-PCR ve RFLP yöntemi uygulanmış, üçü *interdigitale*, biri *Arthroderma benhamiae* olarak tanımlanmıştır. Yine aynı çalışmada 195 tırnak örneğinden çalışılmış, direkt mikroskopi 181 (%93) örnekte pozitif iken 44 (%22) kültürde üreme görülmüştür. *T. rubrum*'a özgü PCR ile 148 (%76) suş tanımlanırken, ITS PCR ve RFLP

ile dört suş *T. interdigitale* olarak saptanmıştır. *T. rubrum*'a özgü PCR ile identifikasyonda iki farklı tip belirlenmiştir.

Sharma ve ark.'nın⁴⁶, 2006 yılında yaptıkları çalışmada ITS-PCR-RFLP ve ITS PCR-sekanslama ile yeni tanımlanan bir tür olan *M. appendiculatum*'un *M. gypseum* ile aynı genotip yapısına sahip olduğu gösterilmiştir.

Brillowska-Dabrowska ve ark.'nın²³ 2007 yılında yaptıkları çalışmada 65 Trichophyton cinsinden (sekiz standart, 57 klinik suş), 21 Microsporum cinsinden (üç standart 18 klinik suş) ve 15 E floccosum (bir standart, 14 klinik) olmak üzere 101 dermatofit tanımlanmıştır. 13 *T. rubrum* suşunun tümü hem ITS2 bölgesinde bulunan *T. rubrum*'a özgü primer kullanarak yapılan PCR sonucu ile, hem de kitin sentezleyen DNA gen bölgesinde bulunan pan-dermatofit primerler ve *T. rubrum*'a özgü primerler kullanılarak yapılan multiplex PCR ile tanımlanmıştır. 101 suş gerek pandermatofit PCR, gerekse multiplex PCR ile pozitif sonuç vermiştir. Ayrıca kontrol olarak kullanılan 21 dermatofit dışı küf, maya ve üç insan DNA'sında PCR ürünü gözlenmemiştir. Yine aynı çalışmada 118 tırnak örneğinin 45 (%38,1)'inde direkt mikroskopi ya da kültür pozitifliği saptanırken, 50 (%42,4)'inde kullanılan her üç PCR sonucunda dermatofit varlığı saptanmıştır.

Tüm bu çalışmalarda görüldüğü gibi; tür düzeyinde identifikasyon, mantar DNA'sının aşırı değişken bölgeleri olan ITS1 ve ITS2 bölgelerinin gerek restriksiyon enzimleri ile kesimi, gerekse sekanslanması sonucunda sağlanabilmektedir. Ancak, kitin sentezleyen DNA bölgesinin çoğaltılması ya da korunmuş 18S ve 28S rDNA bölgelerinin restriksiyon enzimi ile kesiminin bu tanıyı sağlayamadığı, bu bölgelerin sekanslanması ile tür düzeyinde tanımlamanın mümkün olduğu görülmektedir. Sekanslama sonucunda tür düzeyinde tanımlama gerçekleşmesine rağmen, bu işlemin rutin uygulamada kullanılması zor gibi görülmektedir. Bu nedenle bu çalışmada, amaca yönelik olarak, daha kolay uygulanabilmesinden dolayı *T. rubrum* ve *T. violaceum*'a özgü primerler kullanılmış, diğer dermatofitlerin tanımlanmasında mantar DNA'sının değişken bölgeleri olan ITS1, ITS2 bölgeleri çoğaltılarak RFLP analizi yapılmış ve RFLP sonucunda tanımlanamayan suşlar sekanslanmıştır. Genotipik tanı sonucunda, fenotipik tanımlanmalarına göre *T. rubrum* olarak saptanan 29 suşun yanı sıra, *Trichophyton* cinsinden olarak belirlenen 19 suşun 12'sinin daha *T. rubrum*, altı suşun *T.interdigitale*, birinin *Plilacinus* olduğu belirlenmiştir. Üç *T. mentagrophytes* suşunun üçünün de *T. interdigitale*; iki *T. tonsurans*'dan birinin *T.interdigitale*, diğerinin *A. fumigatus*; bir *T. violaceum*'un, *T. violaceum*; bir *M. canis*'in *M. canis*, diğer Microsporum cinsinden mantarın ise *M. canis* olduğu saptanmıştır. Görüldüğü gibi doğru DNA bölgesi ve moleküler yöntem seçildiği zaman, hem tanımlanamayan, hem de yanlış olarak tanımlanan suşların kısa zamanda ve kesin identifikasyonu sağlanmaktadır. Tipik miçel, makro ve mikrokonidyumları saptanmayan ve geç ürettiği için dermatofit olabileceği düşünülen ve genotipik identifikasyon sonucunda fırsatçı mantarlar olduğu belirlenen *A. fumigatus* ve *P. lilacinus*'un saptanmış olması, moleküler testlerin önemini bir kez daha vurgulamaktadır. Özellikle sistemik mikoz kuşkulu bireylerde fırsatçı mantarlar izole edildiğinde kontaminasyon veya etken olup olmadığının kısa zamanda yapılan tekrarlar ile belirlenmesi, zaten vücut direnci yeterince güçlü olmayan hastaların uygun tedavi izlemi ve yaşamları açısından da çok önemlidir.

Gerek yüzeysel, gerekse sistemik mantar infeksiyonları ve etkenlerinin hızlı ve doğru olarak tanımlanmaları; tedavi, gereksiz ilaç kullanımını önleme, hastane infeksiyonlarında kökeni belirleme ve bulaşları

engelleme gibi halk sağlığını yakından ilgilendiren konular açısından son derece önemlidir. Ayrıca sınıflandırma çalışmalarına ışık tutması ve mikoloji alanındaki bilgileri yoğunlaştırması, bu testlerin ne denli gerekli olduğunu göstermektedir.

Moleküler düzeyde çalışmaların yapılabilmesi amacıyla; üniversite laboratuvarları gibi referans olabilecek belirli ortamlarda; gerekli kit, malzeme ve cihaz temini sağlanmalı, akademik çalışmalar teşvik edilmeli ve bu alandaki yeniliklerin yakın takibi sağlanmalıdır. Ancak özellikle ekonomisi yeterince güçlü olmayan ülkeler için, rutin çalışmalarda öncelikli olarak yapılması gereken; geleneksel yöntemlerin uygulanması, başarılı sonuç alınmadığında moleküler tanı testlerine başvurulmasıdır.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: T-87/15122006.

Kaynaklar

1. Padhye AA, Summerbell RC: Medical Mycology. The dermatophytes. Ed. Merz WG, Hay RJ, Washington, USA ASM Pres, 2005;220-43.
2. Liu D, Coloe S, Baird R, Pedersen J: Application of PCR to the identification of dermatophyte fungi. J Med Microbiol 2000;49:493-7.
3. Machouart-Dubach M, Lacroix C, de Chauvin MF, et al: Rapid discrimination among dermatophytes, *Scytalidium* spp., and other fungi with a PCR-restriction fragment length polymorphism ribotyping method. J Clin Microbiol 2001;39:685-90.
4. Ninet B, Jan I, Bontems O, et al: Identification of dermatophyte species by 28S ribosomal DNA sequencing with a commercial kit. J Clin Microbiol 2003;41:826-30.
5. Weitzman I, Summerbell RC: The dermatophytes. Clin Microbiol Rev 1995; 8:240-59.
6. Larone DH: Medically important fungi a guide to identification. Ed. Washington, ASM Pres, 2011:245-6.
7. Kwon-Chung KJ, Bennet JE: Medical Mycology. Ed. Philadelphia, London Lea&Febiger, 1992;105-97.
8. Rezusta A, Rubio MC, Alejandre MC: Differentiation between Trichophyton mentagrophytes and T. rubrum by sorbitol assimilation. J Clin Microbiol 1991;29:219-20.
9. Sinski JT, Van Avermaete D, Kelley LM: Analysis of tests used to differentiate Trichophyton rubrum from Trichophyton mentagrophytes. J Clin Microbiol 1981;13:62-5.
10. Sudman MS, Schmitt JA: Differentiation of Trichophyton rubrum and Trichophyton mentagrophytes by pigment production. Appl Microbiol 1965;13:290.
11. Pounder JI, Williams S, Hansen D, et al: Repetitive-sequence-PCR-based DNA fingerprinting using the Diversilab system for identification of commonly encountered dermatophytes. J Clin Microbiol 2005;43:2141-7.
12. Rippon JW: Medical Mycology. Philadelphia, WB Saunders Company, Harcourt Brace Jovanovich Inc, 1988;154-275.
13. Makimura K, Tamura Y, Mochizuki T, et al: Phylogenetic classification and species identification of dermatophyte strains based on DNA sequences of nuclear ribosomal internal transcribed spacer 1 regions. J Clin Microbiol 1999;37:920-4.
14. Gräser Y, el Fari M, Presber W, Sterry W, Tietz HJ: Identification of common dermatophytes (Trichophyton, Microsporum, Epidermophyton) using polymerase chain reactions. Br J Dermatol 1998;138:576-82.
15. Jackson CJ, Barton RC, Evans EG: Species identification and strain differentiation of dermatophyte fungi by analysis of ribosomal-DNA intergenic spacer regions. J Clin Microbiol 1999;37:931-6.
16. Mochizuki T, Ishizaki H, Barton RC, et al: Restriction fragment length polymorphism analysis of ribosomal DNA intergenic regions is useful for differentiating strains of Trichophyton mentagrophytes. J Clin Microbiol 2003;41:4583-8.
17. Baek SC, Chae HJ, Houh D, Byun DG, Cho BK: Detection and differentiation of causative fungi of onychomycosis using PCR amplification and restriction enzyme analysis. Int J Dermatol 1998;37:682-6.
18. Kawasaki M, Anzawa K, Ushigami T, Kawanishi J, Mochizuki T: Multiple gene analyses are necessary to understand accurate phylogenetic relationships among Trichophyton species. Med Mycol J 2011;52:245-54.
19. Monod M, Bontems O, Zaugg C, et al: Fast and reliable PCR/sequencing/RFLP assay for identification of fungi in onychomycoses. J Med Microbiol 2006;55:1211-6.
20. Nishio K, Kawasaki M, Ishizaki H: Phylogeny of the genera Trichophyton using mitochondrial DNA analysis. Mycopathologia 1992;117:127-32.
21. Faggi E, Pini G, Campisi E, et al: Application of PCR to distinguish common species of dermatophytes. J Clin Microbiol 2001;39:3382-5.
22. Gräser Y, Kuijpers AF, Presber W, de Hoog GS: Molecular taxonomy of the Trichophyton rubrum complex. J Clin Microbiol 2000;38:3329-36.
23. Brillowska-Dabrowska A, Saunte DM, Arendrup MC: Five-hour diagnosis of dermatophyte nail infections with specific detection of Trichophyton rubrum. J Clin Microbiol 2007;45:1200-4.
24. Gutzmer R, Mommert S, Küttler U, Werfel T, Kapp A: Rapid identification and differentiation of fungal DNA in dermatological specimens by LightCycler PCR. J Med Microbiol 2004;53:1207-14.
25. El Fari M, Tietz HJ, Presber W, Sterry W, Gräser Y: Development of an oligonucleotide probe specific for Trichophyton rubrum. Br J Dermatol 1999;141:240-5.
26. Kawasaki M: Verification of a taxonomy of dermatophytes based on mating results and phylogenetic analyses. Med Mycol J 2011;52:291-5.
27. Li HC, Bouchara JP, Hsu MM, Barton R, Chang TC: Identification of dermatophytes by an oligonucleotide array. J Clin Microbiol 2007;45:3160-6.
28. 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.
29. Ohst T, de Hoog S, Presber W, Stavrakieva V, Gräser Y: Origins of microsatellite diversity in the Trichophyton rubrum-T. violaceum clade (Dermatophytes). J Clin Microbiol 2004;42:4444-8.
30. de Hoog GS, Gerrits van den Ende AH: Molecular diagnostics of clinical strains of filamentous Basidiomycetes. Mycoses 1998;41:183-9.
31. Kardjeva V, Summerbell R, Kantardjiev T, et al: Forty-eight-hour diagnosis of onychomycosis with subtyping of Trichophyton rubrum strains. J Clin Microbiol 2006;44:1419-27.
32. BLAST. National Center for Biotechnology Information (internette) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>
33. Arca E, Saracil MA, Akar A, et al: Polymerase chain reaction in the diagnosis of onychomycosis. Eur J Dermatol 2004;14:52-5.
34. Garg J, Tilak R, Singh S, et al: Evaluation of pan-dermatophyte nested PCR in diagnosis of onychomycosis. J Clin Microbiol 2007;45:3443-5.
35. Berktaş M, Metin A, Bozkurt H, Yavuz MT, Dalkılıç AE: Van ve yöresinde izole edilen dermatofitler. Van Tıp Derg 1995;2:14-9.
36. Lupa S, Seneczko F, Jeske J, Głowacka A, Ochecka-Szymaska A: Epidemiology of dermatomycoses of humans in Central Poland. Mycoses 1999;42:563-5.
37. Özekinci T, Özbek E, Gedik M, et al: Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Laboratuvarına başvuran hastalarda dermatofitoz etkenleri. Dicle Tıp Derg 2006;33:19-22.
38. Perea S, Ramos MJ, Garau M, et al: Prevalence and risk factors of tinea unguium and tinea pedis in the general population in Spain. J Clin Microbiol 2000;38:3226-30.
39. van Gelderen de Komaid A, Borges de Kestelman I: Urease-positive Trichophyton rubrum strains (previously described as T. raubitschekii): first isolations in Argentina. Eur J Epidemiol 2001;17:929-33.
40. Arabatzis M, Velegraki A, Kantardjiev T, et al: First report on autochthonous urease-positive Trichophyton rubrum (T. raubitschekii) from South-east Europe. Br J Dermatol 2005;153:178-82.
41. Tietz HJ, Hopp M, Gräser Y: First isolation of Trichophyton raubitschekii (syn. T. rubrum) in Europe. Mycoses 2002;45:10-4.
42. Baek SC, Chae HJ, Houh D, Byun DG, Cho BK: Detection and differentiation of causative fungi of onychomycosis using PCR amplification and restriction enzyme analysis. Int J Dermatol 1998;37:682-6.
43. Weitzman I, Salkin IF, Rosenthal SA: Evaluation of trichophyton agars for identification of Trichophyton soudanense. J Clin Microbiol 1983;18:203-5.
44. Gupta AK, Kohli Y, Summerbell RC: Variation in restriction fragment length polymorphisms among serial isolates from patients with Trichophyton rubrum infection. J Clin Microbiol 2001;39:3260-6.
45. Anzawa K, Kawasaki M, Hironaga M, Mochizuki T: Genetic relationship between Trichophyton mentagrophytes var. interdigitale and Arthroderma vanbreuseghemii. Med Mycol J 2011;52:223-7.
46. Sharma R, Rajak RC, Pandey AK, Gräser Y: Internal Transcribed Spacer (ITS) of rDNA of appendaged and non-appendaged strains of Microsporum gypseum reveals Microsporum appendiculatum as its synonym. Antonie van Leeuwenhoek 2006;89:197-202.