

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

***TRICHOPHYTON RUBRUM*'UN ÇABUK TANISINDA
KSANTOMEGNİNİN HPLC İLE SAPTANMASI**

Bio. Ayşegül Hazal KANDEMİR

**TIBBİ MİKROBİYOLOJİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMANI
Prof. Dr. M. Macit İLKİT**

ADANA - 2015

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

***TRICHOPHYTON RUBRUM*'UN ÇABUK TANISINDA
KSANTOMEGNİNİN HPLC İLE SAPTANMASI**

Bio. Ayşegül Hazal KANDEMİR

**TIBBİ MİKROBİYOLOJİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMANI
Prof. Dr. M. Macit İLKİT**

**Bu tez, Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafında
TF2013YL9 numaralı proje ile desteklenmiştir.**

ADANA – 2015

KABUL VE ONAY

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Programı Çerçevesinde yürütülmüş olan

“Trichophyton rubrum’un Çabuk Tanısında Ksantomegninin HPLC İle Saptanması”
adlı çalışma, aşağıdaki jüri tarafından **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Tarihi: 07 / 01 / 2015

TEZ SINAV JÜRİSİ



Prof. Dr. Macit Ilkit
Çukurova Üniversitesi
Başkan



Prof. Dr. Fatih Köksal
Çukurova Üniversitesi
Üye



Prof. Dr. Akif Çürük
Çukurova Üniversitesi
Üye

Dr.
Üniversitesi
Üye

Dr.
Üniversitesi
Üye

Yukarıdaki Tez, Yönetim Kurulunun / / tarih ve
edilmiştir.

sayılı kararı ile kabul

Prof.Dr. Şeref ERDOĞAN
Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi, deneyim ve önerileri ile bana yol gösteren, bilimsel ve sosyal alanda gelişmeye rehberlik eden hocalarım Sayın Prof. Dr. Macit İLKİT ve Sayın Prof. Dr. Fatih KÖKSAL'a; çalışmam süresince bana konu ile ilgili bilgisini aktaran ve her türlü olanağı özveri ile sağlayan Sayın Prof. Dr. Akif ÇÜRÜK'e; Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'ndaki tüm hocalarıma, çalışma arkadaşlarıma ve bölüm çalışanlarına; her zaman bana destek olan, tez çalışmamda da yardımlarını esirgemeyen Sayın Doç. Dr. Aylin DÖĞEN ve Sayın Doç. Dr. Ramazan GÜMRAL'a; yüksek lisans eğitimime kazandırdıkları önemli değerler için Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda bulunan tüm hocalarıma;

Hayatım boyunca büyük bir sabırla bana maddi ve manevi destek sağlayan; varlıkları, güvenleri ve destekleriyle güç veren sevgili aileme; çalışmalarım süresince ilgisini ve desteğini benden eksik etmeyen Dr. Barış BORAL'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ayşegül Hazal KANDEMİR

İÇİNDEKİLER

KABUL ve ONAY	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
TABLolar DİZİNİ	vii
KISALTMALAR DİZİNİ	viii
ÖZET	ix
ABSTRACT	x
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. <i>T. rubrum</i> kompleks	6
2.2. <i>T. mentagrophytes</i> kompleks	10
2.3. Laboratuvar tanısı	11
2.3.1. Klinik örneklerin alınması	11
2.3.2. Doğrudan mikroskop incelemesi	12
2.3.3. Mantar Kültürü	13
2.4. Ksantomegnin	19
2.5. Kromatografi tekniği	19
2.5.1. HPLC	20
2.5.1.1. HPLC bileşenleri ve görevleri	21
3. GEREÇ ve YÖNTEM	23
3.1. Referans İzolatlar	23
3.2. Klinik Örnekler ve Klinik İzolatlar	23
3.2.1. Klasik Yöntemle Tanımlama Gereçleri	23
3.2.1.1. Besiyerleri	23
3.2.1.1.1. Sabouraud Glikoz Agar	23
3.2.1.1.2. Üre Besiyeri	24
3.2.1.1.3. Bromkrezol Moru Süt Tozu Glikoz Agar	24
3.2.1.1.4. Kıl Delme Testi	25

3.2.1.2. Laktofenol Pamuk Mavisi	27
3.3. HPLC Yöntemi İle Tanımlama Gereçleri	27
3.3.1. Solüsyonlar	27
3.3.1.1. Metanol-Kloroform-Asetik Asit	27
3.3.1.2. Asetonitril-Su-KH ₂ PO ₄	27
3.3.2. Ekstraksiyon	27
3.3.3. HPLC	28
4. BULGULAR	30
4.1. Referans Kökenler	30
4.2. Klinik Örnekler ve İzolatlar	30
5. TARTIŞMA	37
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	40
KAYNAKLAR	41
ÖZGEÇMİŞ	46

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 2.1. Çeşitli dermatofit türlerinin ITS dizi analizi verilerine göre filogenetik ilişkisi.	6
Şekil 2.2. <i>T. rubrum</i> 'un dünya üzerinde köken aldığı ve 19. yy sonları ile 20. yy başlarında yayıldığı bölgeler.	7
Şekil 2.3. <i>T. rubrum</i> kompleks, varyantları ve morfolojik olarak benzer türlerin gösterimi.	11
Şekil 2.4. Kromatogram bilgilerini kullanarak kolon etkinliğinin belirlenmesi.	21
Şekil 3.1. Çalışmada kullanılan HPLC sistemi ve bileşenleri.	29
Şekil 4.1. Ksantomegnin standart maddesine ilişkin HPLC kromatogramı.	31
Şekil 4.2. Ksantomegnin saptanan bazı <i>T. rubrum</i> kompleks üyelerine ilişkin kromatogramlar.	33
Şekil 4.3. Ksantomegnin saptanan <i>T. rubrum</i> kompleks dışı kökenlere ve ksantomegnin saptanmayan bazı <i>T. mentagrophytes</i> kompleks üyeleri ile bazı <i>Arthroderma</i> kökenlerine ilişkin kromatogramlar.	34
Şekil 4.4. Çalışmada kullanılan bazı klinik örneklerle ve bu örneklerin izolatlarına ilişkin kromatogramlar.	36

TABLO DİZİNİ

Tablo 2.1. <i>T. rubrum</i> kökenlerinin mikrosatelit belirteç ile tiplendirmesi	8
Tablo 2.2. <i>Trichophyton rubrum</i> kompleks içerisinde yer alan mikro-organizmaların genel özellikleri	16
Tablo 2.3 <i>Trichophyton mentagrophytes</i> komplekse ilişkin farklı kolonilerin genel özellikleri	18
Tablo 3.1. Çalışmada kullanılan referans kökenler	26
Tablo 4.1. Çalışmada kullanılan <i>Arthroderma</i> ve <i>Trichophyton</i> türlerine ilişkin kökenlerin HPLC sonuçları	32
Tablo 4.2. Çalışmada kullanılan klinik örneklerde ve klinik izolatlarda saptanan ksantomegnin miktarları	35

KISALTMALAR DİZİNİ

BCP-MS-G	: Bromkrezol purple milk solid glikoz agar
BKİA	: Beyin-kalp infüzyon agar
BLA	: Borelli laktrimel agar
CBS	: Centraalbureau voor Schimmelcultures
CEA	: Kazamino asit eritrol albumin
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DTM	: Dermatophyte test medium
HPLC	: Yüksek performans sıvı kromatografisi
ITS	: Internal transcribed spacer
KOH	: Potasyum hidroksit
NK Hücre	: Doğal öldürücü hücre
LC	: Sıvı kromatografi
LJ	: Löwenstein-Jensen besiyeri
MALDI-TOF MS	: Matrix-assisted laser desorption-ionization time-of-flight mass spectrometry
MEA	: Malt ekstrakt agar
NaOH	: Sodyum hidroksit
PAS	: Periyodik asit-schiff
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
PDA	: Patates dekstroza agar
PEEK	: Polieter eter keton
RAPD	: Random Amplification of Polymorphic DNA
RFLP	: Restriction Fragment Length Polymorphism
rRNA	: Ribozomal ribonükleik asit

ÖZET

Trichophyton rubrum'un Çabuk Tanısında Ksantomegninin HPLC İle Saptanması

Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) hemoglobin varyantlarının saptanması, vitamin D seviyesinin tespit edilmesi ve deri ve tırnak örneklerinde *Trichophyton rubrum*'un belirlenmesi gibi tıbbi tanıda kullanılan güvenilir ve gerçekçi bir yöntemdir. *T. rubrum*'un deri ve tırnak örneklerinde belirlenmesi ile ilgili daha önceki bilgilerde, HPLC ile ksantomegnin etkinliğinin saptanması güvenilir bir yöntem kabul edilmiştir. Bu çalışmada HPLC yöntemi kullanılarak ksantomegnin aktivitesinin belirlenmesi ile en yaygın iki insan patojeni dermatofitin, *T. rubrum* ve *T. mentagrophytes* komplekslerinin, ayırt edilmesi amaçlandı. Bu amaçla, *Arthroderma* spp. ($n=7$), *T. rubrum* ($n=18$) ve *T. mentagrophytes* kompleks ($n=7$) kökenleri olmak üzere toplam 32 referans köken ile 13 klinik örnek ve bu örneklerin ITS dizi analizi ile *T. rubrum* ($n=9$) ve *T. interdigitale* ($n=4$) olarak tanımlanan izolatları incelendi. *T. rubrum* komplekse ilişkin 18 referans kökenden 12'sinde ksantomegnin belirlendi. Ayrıca, 2 *A. vanbreuseghemii* izolatu ve 1 *T. interdigitale* izolatında *T. rubrum* kompleks üyelerinde belirlenen değerlerle uyumlu ksantomegnin saptandı. Çalışmada 13 klinik örnekten 11'i ile, *T. interdigitale* kökenlerini de içeren 11 klinik izolatta ksantomegnin saptandı. Ksantomegnin saptanması hızlı ve ucuz bir yöntem olmasına karşılık, referans *T. rubrum* kompleks kökenlerinin yalnız üçte ikisinde ve *T. mentagrophytes* kompleks üyesi 3 izolatta ksantomegnin saptanması sebebiyle, *T. rubrum* ve *T. mentagrophytes* komplekslerini ayırt etmede güvenilir bir yöntem olmadığı önerildi. Çalışmada elde edilen sonuçların özellikle mikrobiyoloji alanındaki bilim insanları ve klinisyenler için ilgi çekici olduğu düşünüldü.

Anahtar Sözcükler: antropofilik, dermatofitler, HPLC, mikotoksin, tanımlama.

ABSTRACT

Detection of Xanthomegnin By High Performance Liquid Chromatography For Rapid Identification Of *Trichophyton rubrum* Complex

High-performance liquid chromatography (HPLC) is a reliable and robust methodology in medical diagnostics, including the detection of hemoglobin variants, vitamin D levels, and *Trichophyton rubrum* in skin and nail materials. Previous information reported that the latter was reliably identified using xanthomegnin activity via HPLC. In the present study, we aimed to discriminate the two most common human pathogenic dermatophytic fungi, *T. rubrum* and *T. mentagrophytes* complexes, via the detection of xanthomegnin using HPLC methodology. Hence, we investigated 32 reference dermatophyte strains: *Arthroderma* spp. ($n=7$), *T. rubrum* ($n=18$) and the *T. mentagrophytes* complex ($n=7$) strains. In addition, we analyzed both clinical samples and isolates of 13 samples identified as *T. rubrum* ($n=9$) and *T. interdigitale* ($n=4$) using ITS-sequencing. Twelve of 18 reference *T. rubrum* complex strains produced detectable amounts of xanthomegnin. Moreover, and more importantly, 2 *A. vanbreuseghemii* and 1 *T. interdigitale* strains also demonstrated xanthomegnin activity. Furthermore, from a total of 13 specimens, 11 clinical samples and 11 clinical isolates were positive for xanthomegnin, including *T. interdigitale* isolates. Although xanthomegnin detection is a rapid and inexpensive method, we concluded that it is not a reliable method for discriminating between *T. rubrum* and *T. mentagrophytes* complexes, given that only two-thirds of reference *T. rubrum* complex strains and 3 strains from the *T. mentagrophytes* complex produced xanthomegnin. In addition we believe that the results of the present study should be of interest to scientists and clinicians specifically in the field of microbiology.

Keywords: anthropophilic, dermatophytes, HPLC, identification, mycotoxin.

1. GİRİŞ

Dünya genelinde obezite ve diyabetin görülme sıklığının artması, küresel iklim değişikliklerinin etkisiyle yeryüzü sıcaklığında görülen artış ve özellikle gelişmiş ülkelerde ortak yaşam alanlarının (spor salonu vb.) kullanımının yaygınlaşması nedeniyle, insan kökenli (antropofilik) *T. rubrum* en sık saptanan ve giderek baskın olan bir tür olmuştur. *T. rubrum* kompleks içerisinde yer alan mikro-organizmalar, yüzeysel mantar hastalıklarının yaklaşık % 60'ından sorumludur (1-3). *T. rubrum*'un bir insandan başka bir insana kolaylıkla bulaşabilmesi ve tüm dünyada yaygın olması, hastalıklarının kronik ve rekürren seyretmesi, özellikle ve sıklıkla etken olduğu tinea pedisin vücudun diğer bölgeleri için bir rezervuar olması ve bu durumun oto-inokülasyona sebep olması yönünden dermatofitlerin çabuk ve doğru tanımlanması önemlidir (1). Türler ve kökenler arasında morfolojik benzerlikler nedeniyle özellikle *T. rubrum* kompleks ve *T. mentagrophytes* kompleksin klasik yöntemlerle ayrımını yapmak güçtür.

Rutin uygulamada dermatofitler; kolonilerinin yapısal özellikleri, mikroskop morfolojileri, büyüme gereksinimleri (vitamin ve amino-asit), fizyolojik ve biyokimyasal özelliklerine göre tür düzeyinde tanımlanır (3, 4). Ancak, bu yöntemler zaman alıcıdır, deneyim gerektirir ve zahmetlidir. Ayrıca aynı dermatofit türünün morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal özelliklerinde görülen farklılıklar, mevcut yöntemlerin güvenilirliğinin sorgulanmasına neden olmuştur. Epidemiyolojik ve filogenetik çalışmalar için geliştirilen polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) temelli çeşitli moleküler yöntemler de mevcuttur ve yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu yöntemlerin bazı dezavantajları ise, alt yapı gerektirmesi, işlemlerin kontaminasyona açık ve görece maliyetli olmasıdır. Laboratuvar tanıda "altın standart" yöntem rDNA'nın internal transcribed spacer (ITS) bölgesinin dizi analizidir (5); ancak bu yöntem henüz rutin uygulamada değildir.

Son 20 yılda, *T. rubrum* kompleks üyelerinin etken olduğu, tinea pedis ve tinea unguium'un görülme sıklığındaki artış nedeniyle, bu türün en baskın dermatofit türü olduğu ve bu durumun bir ivme ile artacağı ön görülmüştür (2). *T. rubrum* kompleksin giderek yaygınlaşması ve mevcut tanı yöntemlerinde karşılaşılan zorluklar nedeniyle mikoloji laboratuvarlarında antropofilik *T. rubrum*'un, özellikle *T. rubrum sensu*

stricto'nun, çabuk tanısına yönelik çeşitli yöntemler önerilmiştir. Bu çalışmada (i) sekonder bir metabolit olan ksantomegnin varlığının saçsız deri ve tırnak örneklerinde ve izolatlarında yüksek performans sıvı kromatografisi (HPLC) ile belirlenmesi ve (ii) *T. rubrum* kompleks ve *T. mentagrophytes* kompleks'in ayırımındaki etkinliğinin değerlendirilmesi ve bulguların literatür eşliğinde tartışmaya açılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

Dermatofitler; Ascomycota şubesi, Euromycetes sınıfı, Onygenales takımı, Arthrodermatacea ailesi içerisinde yer alan keratinofilik ve keratinolitik mantarlardır. Makrokonidya morfolojisine göre üç eşeysiz (anamorf) cins içerisinde incelenirler; *Trichophyton*, *Microsporum* ve *Epidermophyton* (6). Eşeyli şekilleri (telemorf) *Arthroderma* cinsinde yer alır.

Dermatofit enfeksiyonlarının milattan önceki zamanlardan beri bilindiğine ilişkin bulgulara rastlanmıştır. Antik Hint Ayurveda tıp kaynaklarında “Dadru” olarak tanımlanan deri hastalığı, dermatofit enfeksiyonlarının günümüzdeki klinik görünümü ile benzerlik göstermektedir. Eski Ahit’in üçüncü kitabında yazılan “Tzara’at” kelimesi saçlı deri hastalığına; M.S. 1. y.y.’da Aulus Cornelius Celsus tarafından yazılmış *De Re-Medicina*’daki “porrigo” ise muhtemelen, dermatofitlerin saçlı deri hastalıklarından biri olan favusa karşılık gelmektedir. Günümüzde dermatofit enfeksiyonlarını tanımlarken kullandığımız “tinea” kelimesi ilk kez M.S. 400’de Cassius Felix tarafından kullanılmıştır. Modern Tıbbi Mikoloji’nin öncüsü olan Fransız dermatolog ve bilim adamı Raymond Sabouraud 1910’da “tinea” terimini güncellemiş ve yeniden kullanılmasını sağlamıştır (7, 8).

Bir dermatofit enfeksiyonu veya dermatofitoz belirtilirken “tinea” kelimesinin ardından enfekte anatomik bölgenin Latince karşılığı eklenir. Dermatofitoz saç ve saçlı deride ise tinea capitis, bıyık ve sakal bölgesinde tinea barbae, saçsız deride ise tinea glabrosa (gövdede tinea corporis, kasık bölgesinde tinea cruris, avuç içinde tinea manuum ve ayakta ise tinea pedis) adını alır. El ve ayak tırnaklarının mantar hastalığı onikomikoz olarak isimlendirilirken, dermatofitlerin etken olduğu tırnak hastalıklarına tinea unguium adı verilir (9). Dermatofit enfeksiyonlarına “dermatofitoz” denmesinin yanı sıra; deride çevresi kızarıklık, kabarıklık ve kıvrımlı, merkezi ise daha kepekli bir lezyon oluşturmaları sebebiyle, “vücuttaki kurtçuk” anlamında “ringworm” (ring: halka, worm: kurtçuk) da denir (6, 10).

Doğal yaşam alanlarına ve konak tercihlerine göre ise dermatofitler üç ayrı grup altında incelenir. İlki insandan insana bulaşabilen “antropofilik” türlerdir (Örnek: *T. rubrum*). Hemen her zaman insanda şiddetli olmayan, ancak kronik enfeksiyonlara

neden olur. İkinci grup “zoofilik” türler olup ana konağı hayvanlardır. Hayvanlardan başka hayvanlara veya insanlara bulaşabilirler (Örnek: *Microsporum canis*). Son grup “geofilik” türler ise toprakla ilişkili veya toprak kaynaklı organizmalardır; hem insanı hem de hayvanları enfekte edebilirler (Örnek: *Microsporum gypseum*). Bu şekilde yapılan bir ekolojik sınıflandırma, etken mikro-organizmanın belirlenmesi, patogenezinin anlaşılması, tedavi protokolü ile ve korunma ve kontrol yöntemlerinin geliştirilmesi yönünden önemlidir (6, 11).

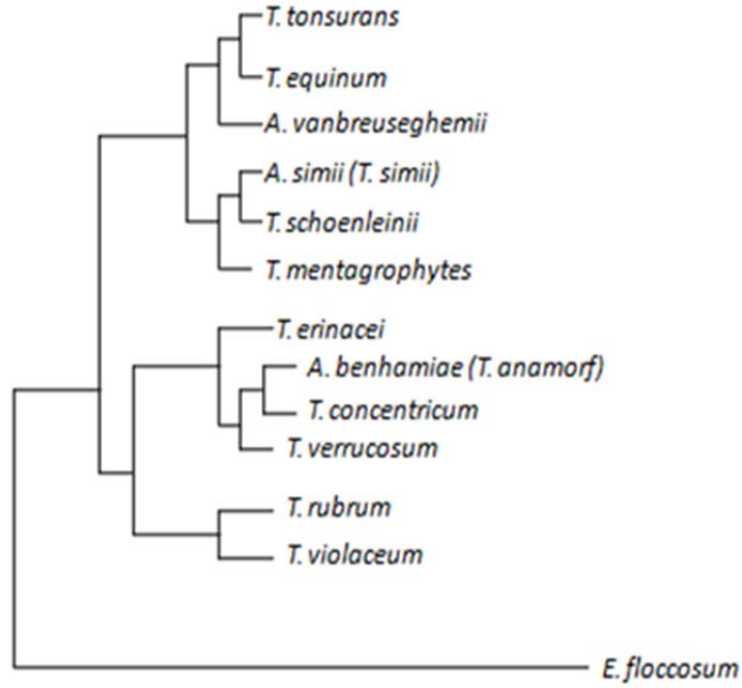
Dermatofitler hem bağışıklık sistemi baskılanmış bireylerde hem de sağlıklı bireylerde enfeksiyona neden olabilir. Şöyle ki; toplumdaki bireylerin %70’inden fazlası, hayatının bir döneminde, bir dermatofit türü ile enfekte olmakta ve yetişkin bireylerin %30-70’inin asemptomatik taşıyıcı olduğu düşünülmektedir (2). Yaş, cinsiyet, ailede kronik dermatofitoz öyküsü, uzun süreli antibiyotik ve kortikosteroid kullanımı, güreş veya judo gibi vücut teması gerektiren sporlarla uğraşmak, ayak maserasyonu, ortak kullanımı olan duş veya havuz gibi alanlarda çıplak ayakla dolaşmak, pamuklu giysiler yerine sentetik giysileri tercih etmek, bireyler arasında ortak çorap, ayakkabı, bere, şort vs. kullanımı ve evcil olmayan hayvanlarla temas risk faktörleri arasındadır. Hastalığın seyri özellikle konağın, mantara ait metabolik ürünlere karşı vereceği tepkiye bağlıdır. Sorumlu mantar kökeninin virülansı, enfeksiyonun anatomik odağı, konağın bağışıklık sistemi ve çevresel faktörler de enfeksiyonun şiddetini belirler (1, 6, 12, 13).

Dermatofitoz patogenezinde öncelikli mekanizma; artrokonidyumların, derinin en üst katmanı olan, stratum korneum (boynuzsu katman) ile temasıdır. *T. rubrum* ve *T. mentagrophytes*’in mikrokonidya yüzeyinde mannoz ve galaktozu tanıyan, karbonhidrat özgül adezinler eksprese edilmektedir. Bu adezinlerin dermatofitin adezyonunda rol alabileceği düşünülmüştür. Adezyon sonrası çimlenme borularının oluşmasıyla stratum korneuma penetrasyon başlar. İnvazyon aşamasıyla ilgili pek çok kurgu olsa da keratinaz, metalloproteaz, sistein dioksijenaz ve serin proteaz gibi enzimlerin bu aşamada etkili olduğu düşünülmektedir. İnvazyon stratum korneumda gerçekleşir. Enzimlerle keratin yıkımı gerçekleşirken bir yandan da keratinin direncini kırmak ve böylece yıkımı kolaylaştırmak amacıyla sülfid salgılanır. Sülfid SSU1 geni tarafından kodlanan dışa atım pompaları ile salınır ve SSU1’in fazla ekspresyonu dermatofitler için tipik bir özelliktir. Serumdaki özgül olmayan inhibitör faktörler, transferrin, doğal

öldürücü hücreler (NK hücreler), *Pseudomonas aeruginosa* varlığı, mantar keratinazlarının inhibisyonu, CD14+ monositler ve kısmen CD4+ T lenfositlerle düzenlenen Th1 tepkimesi gibi diğer immünolojik bariyerler dermatofitlerin invazyonuna ve derin dokulara penetrasyonuna engel olur (1, 6, 14, 15).

Dermatofitlerde re-enfeksiyonların sık görülmesi, tedavi protokollerinin türler arasında farklılık gösterebilmesi ve dermatofitoz benzeri klinik görünüme sahip dermatofit dışı mantarların ayırt edilmesi gibi gerekçelerle açıklanmaya çalışılmıştır. Ayrıca yetersiz tanı ve tedavi, re-enfeksiyonun önemli sebeplerinden birisidir (1). Bu sebeple dermatofitlerin doğru ve güvenilir olarak tanımlanması önemlidir (16). Ek olarak, özellikle, salgına neden olduğu bilinen dermatofitlerin tür düzeyinde tanısı, salgının kontrol altına alınması ve enfeksiyon kaynağının belirlenmesi yönünden önemlidir (3).

Sık görülen mikro-organizmalar olmalarına karşılık, dermatofitler için henüz kesin bir sınıflandırma ve tanımlama yöntemi bulunmamaktadır (16). Bu durumun temel nedeni, morfolojik olarak benzer olup genetik olarak uzak veya genetik olarak benzer olup morfolojik özellikler bakımından farklılık gösteren türlerin varlığıdır. Günümüzde ITS gen bölgeleri ile yapılan dizi analizleri tanıda “altın standart” olarak kullanılmaktadır. Buna göre, elde edilen dizilere ait veriler ITS rDNA barkod veri tabanındaki (<http://www.cbs.knaw.nl/dermatophytes/BioloMICS.aspx>) verilerle karşılaştırılarak tanımlama yapılmaktadır (5, 17). Ancak, halen yürütülmekte olan bir doktora tez çalışmasında bu yöntemin güvenilirliği tartışmaya açılmış ve β -tübülin, kalmodülin ve aktin gen bölgelerinin hedef alınması ile daha gerçekçi sonuçlar elde edilmiştir (18). Çeşitli dermatofit türlerinin ITS dizi analizi verilerine göre filogenetik ilişkisi Şekil 2. 1’de gösterilmiştir.



Şekil 2.1. ITS dizi analizi verilerine göre dermatofit türleri arasındaki filogenetik ilişki.

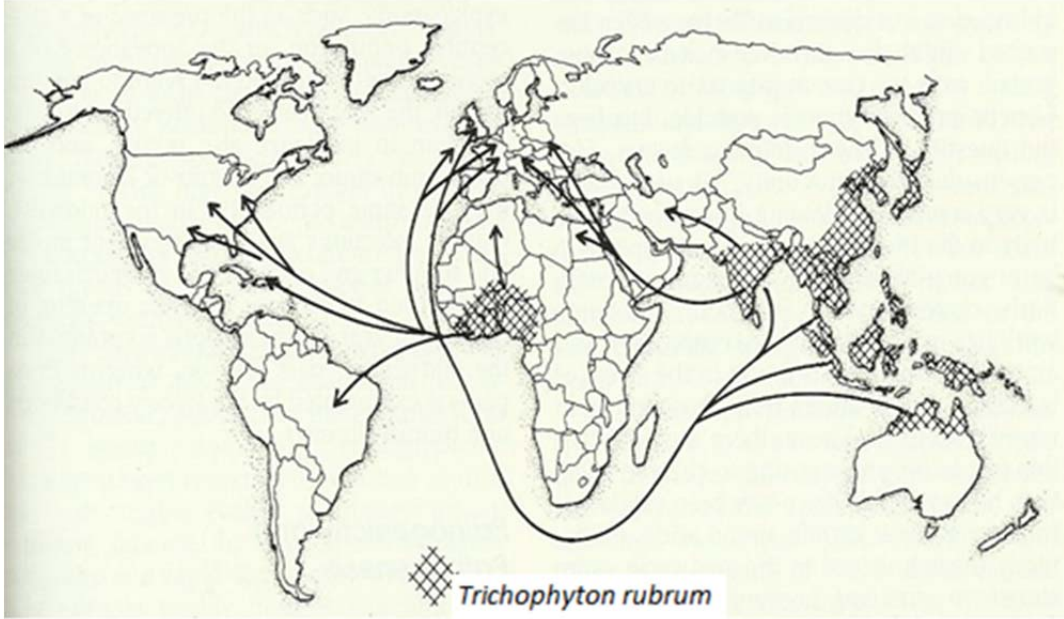
Saçsız deri ve tırnak dermatofitozlarının büyük bir kısmından *T. rubrum* kompleks, özellikle *T. rubrum sensu stricto* sorumludur (1, 9, 19). Bu verileri destekler şekilde, Borman *et al.* dünyadaki dermatofit türlerinin dağılımını inceleyen bir çalışmada antropofilik *T. rubrum*'un giderek baskın bir tür olduğuna dair güçlü kanıtlar elde etmişlerdir (20). İkinci sırada ise *T. mentagrophytes* kompleks, özellikle antropofilik *Trichophyton interdigitale* yer alır. Hastalık etkeninin doğru tanımlanması, büyük ölçüde, bu iki kompleks üyelerinin doğru şekilde ayırt edilmesiyle olur.

2.1. *T. rubrum* Kompleks

Castellani 1910'da *T. rubrum*'u, *Epidermophyton rubrum* olarak tanımlamıştır. Esasen, türün pek çok eş anlamlısı vardır: *E. perreti* Castellani., 1910; *Trichophyton purpureum* Bang., 1910; *T. rubidum* Priestley, 1917; *T. plurizoniforme* MacCarthy, 1925; *T. coccineum* Katoh, 1925; *T. multicolor* Magalhaes et Neues, 1927 ve *T. kagawaense* Fuji, 1931.

Günümüzde tüm dünyada görülen *T. rubrum*'un, Afrika ve kuzeydoğu Asya'da kronik tinea corporis etkeni olarak ortaya çıktığı ve bu iki bölgeden tüm dünyaya

yayıldığı düşünülmektedir (Şekil 2. 2.). 19. yy. sonlarında kendine yeni bir popülasyon grubu ve ekolojik odak bulan *T. rubrum*, Avrupalı askerler ve sömürgeciler arasında yayılım göstermiştir. Mikro-organizmanın Amerika'ya gelişi ise muhtemelen köleler ve onların sahipleri aracılığıyla olmuştur (21).



Şekil 2.2. *T. rubrum* kuzeydoğu Asya ve batı Afrika'dan köken almış; 19.yy sonları ile 20.yy başlarında Avrupa, Kuzey Amerika ve Güney Amerika'ya yayılmıştır.

T. rubrum kompleks içerisinde yüzeysel mantar enfeksiyonlarının %60'ından sorumlu olan ve tüm dünyada yaygın görülen antropofilik türler yer alır. Bu türlerin artrokonidyumları dış ortamda 18 aydan daha uzun süre canlı kalabilirler. Bu nedenle bulaş oranları yüksektir. Hastalıkları kronik ve rekürren seyirli olup tinea pedis ve dermatofit onikomikozunun en sık etkenidirler. Özellikle tinea pedisin; psöriyazis, herpetik enfeksiyonlar, selülit, kontakt dermatit, eritrazma, impetigo, ayak parmak arasında bakterilerin neden olduğu enfeksiyonlar, kandidoz ve pemfigus gibi pek çok hastalıkla karışması, vücudun diğer bölgeleri için rezervuar olması ve bunun sonucunda oto-inokülasyon gerçekleşebilmesi sebebiyle *T. rubrum* kompleksin *T. mentagrophytes* kompleksten ayırt edilmesi önemlidir (1, 2).

T. rubrum kompleks; *T. rubrum* ve *T. violaceum* olmak üzere iki ana dala ayrılır.

Ohst ve arkadaşları *T. rubrum* kökenlerini dört mikrosatelit gruba ayırmışlardır (Tablo 2. 1.). Bu sınıflandırma içerisinde *T. rubrum sensu stricto* izolatları ise iki mikrosatelit gruba ayrılmıştır. Grup A, çoğunlukla Afrika ve kuzey Asya kökenli olup, Afrika-Asya tipi olarak da bilinmektedir. Yaygın kullanılan eş anlamlısı *Trichophyton raubitschekii*'dir. Temel olarak granüler dokuda koloniler oluşturur. Kolonilerinin tabanı koyu kırmızıdır. Bu tür çok sayıda makrokonidya ve mikrokonidya oluşturur. Üreaz testleri tipik olarak 3–4 günde olumludur ve genellikle kronik ve yangılı tinea corporis ve tinea cruris ile ilişkilidirler (1, 16, 22).

Tablo 2.1. *T. rubrum* kökenlerinin mikrosatelit belirteç ile tiplendirmesi (23).

Tür adı	Mikrosatelit belirteç T1 tipi
<i>T. violaceum</i>	C
<i>T. yaoundei</i>	D
<i>T. gourvilii</i>	A
<i>T. soudanense</i>	A
<i>T. megninii</i>	A
<i>T. rubrum</i> (granüler koloni– <i>T. raubitschekii</i> ; tropikal yayılım; saçsız deri veya kasıkta etken)	A
<i>T. rubrum</i> (pamuksu koloni; dünya genelinde yayılım; ayak ve elde, bazen saçsız deri veya kasıkta etken)	B

Mikrosatellit grup A içerisinde yer alan *T. megninii* Blanchard, 1896; *T. rubrum* kompleksin tanımlanan ilk üyesidir. 1920'li ve 1930'lu yıllarda batı Avrupa'da tinea barbae etkeni olarak yaygınken, günümüzde Akdeniz ülkelerinde görülür ve çoğunlukla tinea corporis etkenidir. Kolonileri düz ve kadifemsidir. Koloni yüzeyinde geniş ışınal çizgilenmeler görülebilir. Başlangıçta beyaz olan koloni rengi zamanla pembeleşir. Koloni tabanı yoğun olmayan kırmızı renktedir. Üremesi için besiyerinde L-histidin bulunmalıdır. Bu özelliği ile *T. fischeri*, *T. gourvilii* ve *T. raubitschekii*'den ayırt edilir. Sabouraud glikoz agar (SGA)'da sınırlı üreme görülür ve bu besiyerinde konidya oluşturmaz. Sıvı üre besiyerinde üreaz aktivitesi olumludur, ancak bazı katı besiyerlerinde olumsuz sonuç verebilir. Grup A' da yer alan diğer türlerden farklı olarak

çok sayıda makrokonidya içermez. Çok sayıda ve armut biçimli mikrokonidya görülür. (5, 11, 24).

T. rubrum s. str. ise dünyada en sık görülen tür olup, grup B'de yer alır. Pamuksu görünümde, seyrek konidyalı ve temel olarak saplı (klavat) mikrokonidyumları vardır. SGA'da koloni tabanı koyu kırmızı renktedir. Bu türün üreaz aktivitesi en erken 6-7. günde görülür (4). Çoğunlukla yangısal olmayan; ayak, daha az sıklıkla el, saçsız deri ve kasık enfeksiyonları ile ilişkilidirler. *Tinea capitis* etkeni olarak nadir görülmekle birlikte, kıl içi (endotriks) veya kıl dışı (ektotriks) tutulum gösterebilirler (16).

T. rubrum s. str. dışında; *Trichophyton fischeri* Kane, 1977 ve *Trichophyton kanei* Summerbell, 1987 türleri, *T. rubrum* benzeri türler olarak tanımlanmıştır. *Trichophyton kanei* insanda deri lezyonlarından izole edilmiştir. Sıvı besiyerinde 7-9 gün içerisinde üreyi hidrolize eder ve mikrokonidya oluşturmaz. Çok sayıda artrokonidya ve ucu T şeklinde sonlanan makrokonidya oluşturur. *T. fischeri*; ilk kez kanlı agardan (25); daha sonra, dermatofitozu olmayan bireylerin derisinden alınan örneklerden ve balgamdan klinik kontaminant olarak izole edilmiştir. Patojen olarak kabul edilmez. Kazamino asit eritrol albumin (CEA) agarda kırmızı pigment oluşturmaması ayırt edici bir özelliktir (24, 11).

T. violaceum içerisinde; *Trichophyton soudanense*, *Trichophyton yaoundei* ve *Trichophyton gourvilii* türleri yer alır. *Trichophyton violaceum* kolonilerinin üreme hızı yavaştır. Kolonileri derimsi, buruşuk yüzeyle, mor-kırmızı, sarı veya turuncu; koloni tabanı ise koyu sarı, kırmızı-kahverengi veya mordur. Makrokonidya yoktur. Mikrokonidya -varsa- gözyaşı damlası şeklindedir. Hif düzeni karmaşıktır, birbirine karşıt dallanma gösterebilir (Örnek; *T. soudanense*). Klamidospor bulunabilir (Örnek; *T. yaoundei*). Üre testi ilk yedi günde olumsuz iken; daha sonra yavaş yavaş olumlu olur (4). *In vitro* kıl delme testi 6-7 gün sonra olumludur (26). Bromkresol moru süt tozu agar (BCP-MS-G)'da, 25 °C'de, 7 gün içinde koloni çevresinde geniş bir zon oluşumu ve alkalinizasyon görülür (1, 4, 5, 16).

T. rubrum kompleks içerisinde yer alan türler ve varyantları Şekil 2. 3.'de gösterilmiştir (27).

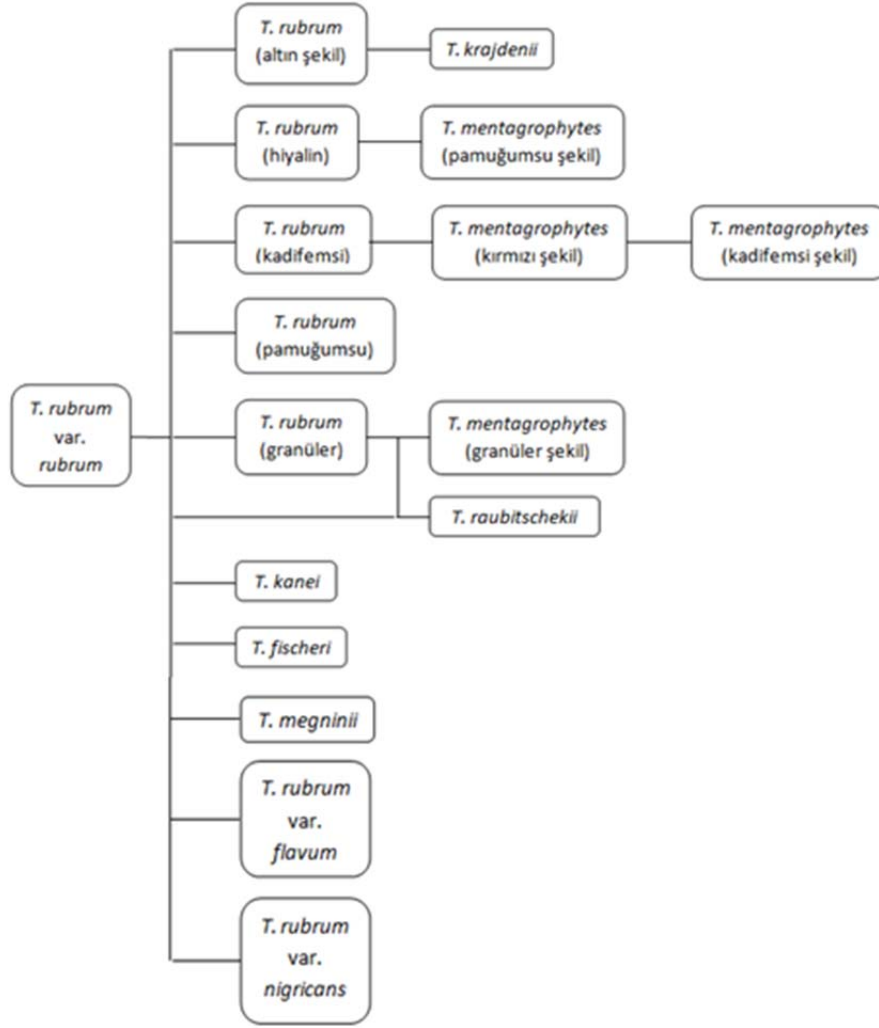
2.2. *T. mentagrophytes* Kompleks

İlk kez 1896'da Robin Blanchard tarafından tanımlanan *T. mentagrophytes*'in eş anlamlıları; *Microsporum mentagrophytes* Robin, 1853; *Achorion quinckeanum* Blanchard, 1896; *T. felineum* Blanchard, 1896; *T. gypseum* Bodin, 1902; *T. granulosum* Sab., 1909; *T. radiolatum* Sab., 1910; *T. lacticolor* Sab., 1910; *T. denticulatum* Sab., 1910; *T. asteroides* Sab., 1910; *T. farinulentum* Sab., 1910; *T. interdigitale* Priestley, 1917; *T. kaufmann-Wolf* Ota, 1922; *T. pedis* Ota, 1922 ve *T. proliferans* English et Stockdale, 1968'dir (24).

T. mentagrophytes sensu lato, hem antropofilik hem de zoofilik türleri içerir. Bu kompleks için iki eşeyli tür, *Arthroderma benhamiae* ve *Arthroderma vanbreuseghemii*, tanımlanır. *A. benhamiae* kemirgen ve kobaylarda sıklıkla bulunur. *A. vanbreuseghemii* ise insan, fare ve çinçillalardan izole edilmiştir (17). Güncel verilere göre kompleks içerisinde (i) *T. mentagrophytes sensu stricto*, (ii) zoofilik *T. erinacei*, (iii) *A. benhamiae*'nin eşeysiz şekli zoofilik *Trichophyton* ile (iv) *T. interdigitale*'nin zoofilik (CBS 318.56) ve antropofilik (CBS 428.63) kökenleri yer alır.

Kompleksin pamuğumsu veya kadifemsi görünümde kolonilere sahip izolatları ile granüler tipteki izolatları; klinik şekiller, epidemiyoloji ve virülans özellikleri yönünden farklılıklar gösterir. Pamuğumsu veya kadifemsi özellikte bahsedilen izolatlar en sık kronik tinea pedis etkeni iken; granüler tip izolatlar daha akut ve yangılı enfeksiyonlara neden olurlar. Tinea pedis, onikomikoz ve nadiren tinea manuum etkeni olarak izole edilen pamuğumsu veya kadifemsi izolatlar antropofilik *T. interdigitale* (CBS 428.63); tinea faciei, tinea capitis ve tinea corporis etkeni olarak izole edilen granüler izolatlar ise zoofilik *T. interdigitale* (CBS 318.56) olarak tanımlanmıştır. *T. interdigitale* kökenlerinin antropofilik ve zoofilik ayrımlarının yapılması enfeksiyon kaynağının belirlenmesi ve tedavi yönünden önemlidir (1, 19, 28).

Trichophyton erinacei; diğer *T. mentagrophytes* kompleks üyelerinden inci şeklinde makrokonidyumları ve koloninin tabanında ayva sarısı pigment oluşumuyla ayırt edilebilir. Avrupa ve Afrika olmak üzere iki farklı tipe sahiptir. Afrika tipi *T. erinacei*, *Atelerix albiventris* türü kirpillerle bulaşır, üreaz olumludur ve morfolojik olarak zoofilik *A. benhamiae* veya *A. vanbreuseghemii* anamorflarından ayırt edilemez. Avrupa tipi *T. erinacei* ise *Erinaceus europaeus* türü kirpillerle yayılır ve *A. benhamiae* kompleks içerisinde yer alır. Tipik özelliği üreaz olumsuz olmasıdır (16, 22, 29).



Şekil 2.3. *T. rubrum* kompleks, varyantlar ve morfolojik olarak benzer türlerin gösterimi.

2.3. Laboratuvar Tanısı

2.3.1. Klinik Örneklerin Alınması

Klinik örneğin (saçlı deri, saçsız deri ve tırnak) hem mikroskop hem de mantar kültürü incelemesi için yeterli miktarda olması ön koşuldur. Ayrıca, klinik örnek alma işleminden önce topikal tedavi uygulanan bireylerin tercihen 4–6 gün önce, sistemik antifungal kullananların ise 15 – 30 gün öncesinde tedaviyi sonlandırdığından emin olunmalıdır. Klinik örnek alınırken cımbız, forseps, bistüri, küret veya tırnak makası kullanılacak malzemeler arasındadır. Saçlı deri, saçsız deri ve tırnak örneklerinin hemen incelenememesi durumunda taşınması ve saklanması için steril küçük zarflar kullanılabilir. Ağzı kapalı tüplerin kullanılması; (i) ortamın nemlenmesi sebebiyle,

kontaminant organizmaların aşırı üremesine neden olabileceği ayrıca (ii) plastik petri kapları elektrostatik etkileşim sebebiyle önerilmemektedir (12, 30).

Tinea capitis kuşkulu bireyin saçlı derisi, ön tanı testi olan, Wood ışığı ile incelenir. *Microsporum* cinsi dermatofitler (Örnek: *M. canis*) yeşil floresans oluşturur. Eğer klinik görünüm favus ise soluk mavi-yeşil floresans görülür. Favus etkeni *Trichophyton schoenleinii* dışında başka bir *Trichophyton* türü floresans oluşturmaz. Wood ışığı ile incelemenin ardından saçtan steril forseps veya cımbız yardımıyla, saç kökünü de kapsayacak biçimde saç örneği alınır ve saç kökleri incelenir. Klinik örneklemede saç fırçası, diş fırçası, pamuklu eküvyon veya servikal smear fırçası kullanılabilir (11, 31, 32).

Saçsız bölgeden alınacak örneklerde, lezyon %70'lik alkolle silinir, sınırı belirgin bir lezyon varsa bu sınırlardan epitel kazıntı örneği alınır. Sınırları belirgin olmayan bir lezyon ise lezyonun çeşitli bölgelerinden klinik örnek alınır ve mantar varlığı araştırılır.

Tinea pedis lezyon yerinden epitel kazıntısı alınır. Vezikül varsa vezikül sıvısının kültürü önerilmez. Onikomikoz için örnekleme yöntemi onikomikozun klinik şekline göre değişir. Örneğin; distal subungual onikomikozda subungual birikinti kazınarak örnek alınır. Proksimal subungual onikomikozda, sağlıklı üst bölge kazınır ve alt kısımdan elde edilen kazıntı örneği incelenir. Beyaz yüzeysel onikomikozda ise örnekler beyaz bölgelerin kazınmasıyla elde edilir (11, 30).

2.3.2. Doğrudan Mikroskop İncelemesi

Klinik örnekteki mantar varlığı/yokluğu hakkında en hızlı cevap, doğrudan mikroskop incelemesiyle alınır. En yaygın uygulama %10'luk potasyum hidroksit (KOH)'in kullanımındır. Kısaca, örnek içerisindeki keratin dokunun çözülüp, mantara ilişkin spor, bölmeli ve duvarları paralel hifler ve artrospor gibi yapıların açığa çıkması ve daha kolay belirlenmesi sağlanır. Ayrıca %25 KOH veya sodyum hidroksit (NaOH) ile %5'lik gliserol karışımı da kullanılabilir. KOH ile birlikte dimetil sülfoksit (DMSO) kullanılarak keratinin çözülmesi hızlandırılabilir (9). Uygulamada tırnak, saçlı deri veya deri kazıntı örneği lama yerleştirilir ve üzerine 1-2 damla sözü edilen solüsyonlardan damlatılır. Lamelle kapatılan örnek alevde kaynamasına izin verilmeden ısıtılır ve oda sıcaklığına bırakılır. İşlem için gereken süre; kullanılan solüsyonun ve örneğin

yoğunluğu ile alevde tutma süresine bağlıdır. Maliyeti düşük ve uygulaması kolay olmasına karşılık özgülüğü düşük bir yöntemdir (6, 15). Bir diğer boyama çeşidi olan Amman kloral laktofenol boyaması ise özellikle saçlı deri örneklerinin incelenmesinde önerilen bir yöntemdir. Bu yöntemde örneğin ısıtılması gerekmez (30).

Klinik örnekteki mantar elemanlarının gösterilmesine yönelik diğer bir uygulama, mantar hücre duvar yapısındaki kitin ve selülozu boyayan kalkoflor beyazı veya blankoflor gibi boyaları kullanarak yapılan floresans mikroskopisi incelemesidir. Kullanılan filtreye bağlı olarak soluk beyaz veya yeşil renkte hifler görülür. Uygulaması güvenli ve kolay; sonuçları güvenilirdir. Tecrübesi olmayan laboratuvar çalışanları bile bu yöntemi kullanarak kolay sonuç alabilir. Ancak, mikroskop ve filtre gereksinimleri nedeniyle KOH ile incelemeye göre pahalı bir yöntemdir.

Onikomikoz kuşkusunda, doğrudan mikroskop ve mantar kültürünün laboratuvar tanıya yardımcı olmadığı durumlarda, tırnak örneklerinin periyodik asit-schiff (PAS) gibi histopatolojik boyalarla incelenmesi önerilebilir (9). PAS boyasının mantar hücre duvarındaki, glikozaminoglikan gibi, polisakkaritleri boyaması özelliğinden yararlanılır ve sonuçta mantara ilişkin yapılar kırmızı renkte görülür (30).

2.3.3. Mantar Kültürü

Klinik örneklerin doğrudan mikroskop incelemesinin ardından mikoloji laboratuvarlarında kullanılan uygun besiyerlerine “yarı gömme” tekniği ile ekimleri yapılır. Dermatofitlerin üretilmesinde ve izole edilmesinde en sık kullanılan besiyeri SGA’dır. Besiyeri içerisine, bakteri üremesini engellemek amacıyla kloramfenikol ve gentamisin; saprofit küf mantarlarının üremesini baskılamak amacıyla sikloheksimit eklenir. Seçenek olarak tercih edilebilecek diğer ilk izolasyon besiyerleri dermatofit test medium (DTM) ve CEA’dır. DTM indikatör olarak fenol kırmızısı içeren bir besiyeridir. Dermatofitin besiyerinde üremesi sonucu pH yükselir ve besiyerinin sarı rengi kırmızıya döner. Bakteri ile kontamine *T. rubrum* inoküle edilmesi durumunda DTM’de *T. rubrum* üremesi baskılanır ve yalancı-olumsuz sonuç alınabilir (11). Nadiren de olsa, DTM ile bazı *Microsporum* izolatlarının üremesinde yalancı-olumsuz sonuçlar alındığı bildirilmiştir. CEA besiyeri ise *Candida* cinsi maya mantarları ile bakterilerin üremesini inhibe eder ve *T. rubrum*’un kırmızı pigment oluşturmasını uyarır.

Dermatofitler için en uygun üreme ısısı 25 °C'dir (< 30 °C). Ancak, türlere göre farklılık görülebilir (örneğin; *T. verrucosum* için en uygun üreme ısısı 30–32 °C'dir) (30). Genel olarak yavaş üreyen mikro-organizmalar olmaları nedeniyle inkübasyon süreleri 1–4 hafta arasında değişir.

Dermatofitlerin klasik laboratuvar tanımlanması, besiyerindeki koloninin yapısal ve mikroskop özelliklerinin incelemesiyle olur. Koloninin yapısal özelliklerinin incelenmesinde koloninin rengi, dokusu (pamuksu, kadifemsi, granüler, pudramsı vs.), yüzey özelliği (kabarık, basık, ortası kabarık vs.), üreme hızı ve pigment varlığı değerlendirilir. Laktofenol pamuk mavisi kullanılarak yapılan mikroskop incelemesinde ise mikrokonidyum ve makrokonidyum varlığı veya yokluğu, şekli, miktarı ve dermatofitlere özgü bölmeli ve duvarları paralel hif yapısı incelenir. Bunların dışında dermatofitlerin özel besin gereksinimleri, ısı toleransları, BCP-MS-G agarda üreme ve alkalinizasyon özellikleri, *in vitro* kıl delme ve üre kullanımı gibi fizyolojik ve biyokimyasal özellikleri de tür düzeyinde tanımlamada yararlanılan özelliklerdir (3).

Klasik laboratuvar tanısında, en sık kullanılan yöntem kültürde üreyen dermatofite ilişkin makrokonidyumların yapısal özelliklerinin incelenmesidir. Ancak, genellikle ilk izolasyonda SGA'da makrokonidya oluşumu görülmez. Bu nedenle mikro-organizmanın daha iyi sporlanacağı ve mantar elemanlarının daha iyi değerlendirilebileceği besiyerleri geliştirilmiştir. Bu amaçla kullanılacak ilk besiyeri patates dekstroz agar (PDA)'dır. Seçenek olarak tercih edilebilecek diğer besiyerleri ise Borelli laktrimel agar (BLA), Löwenstein-Jensen (LJ) agar, beyin-kalp infüzyon agar (BKİA) ve malt ekstrakt agar (MEA)'dır (4, 13, 33).

Dermatofitlerin etiyolojik ve ekolojik özellikleri ve klasik laboratuvar tanısına ilişkin bilgiler *T. rubrum* kompleks üyeleri için Tablo 2. 2.'de ve *T. mentagrophytes* kompleks üyeleri için Tablo 2. 3.'de sunulmaktadır.

Dermatofitler içerisinde 40'ı aşkın tür tanımlanmasına karşılık, insanda hemen daima 10 tür hastalık etkenidir. Bu türleri tanımlamak için kullanılan klasik yöntemlerin uzun zaman alması, yorumlamasının deneyim gerektirmesi, morfolojisi benzer olmasına karşılık genetik olarak uzak türler; genetik yakınlığı olmasına karşılık farklı morfolojilere sahip türlerin varlığı nedeniyle, daha hızlı ve güvenilir yöntemlere gereksinim duyulmaktadır. Bu amaçla; ITS1, ITS2, topoizomeraz II (34), kitin sentaz I (35), β tübülün (36) gibi belirli gen bölgelerini hedef alarak geliştirilen real-time PCR

(37, 38), nested PCR (15), PCR-RFLP (39), PCR-ELISA (40), RAPD (41), multipleks PCR (42, 43) ve genomik *in situ* hibridizasyon (44) gibi PCR temelli moleküler yöntemler mevcuttur. Bu yöntemler basit, tekrarlanabilir olmalarının yanı sıra, türlerin sahip oldukları özel nükleotid dizileri hakkında da bilgi verirler. Ancak, PCR öncesi basamaklardaki kontaminasyon riskinin yüksek olması yanlış sonuçların alınmasına neden olabilmektedir. Bu yöntemlerin dışında; akış sitometrisi (45), yansımali konfokal mikroskopisi (46), fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (47) ve MALDI-TOF-MS (48) gibi yöntemler de mevcuttur. (49, 50, 51).

Dermatofit türlerinin mikolojik tanısında, klasik ve moleküler yöntemlerin dışında bir seçenek olarak yüksek performans sıvı kromatografisi (HPLC) tekniği ön plana çıkmaktadır. Mantara ait sekonder bileşenlerden biri olan ve *T. rubrum* kompleks üyelerinde de bulunan ksantomegninin bu yöntemle belirlenmesinin, *T. rubrum* kompleksin kısa sürede tanınmasını (52) ve *T. mentagrophytes* kompleksten kolaylıkla ayırt edilmesini sağlayabileceği düşünülmüştür.

Tablo 2.2. *Trichophyton rubrum* kompleks içerisinde yer alan mikro-organizmaların genel özellikleri. BCP-MS-G, bromkrezol purple milk solid glikoz agar; #1, Trichophyton agar 1; #7, Trichophyton agar 7.

Mikro-organizma	Koloni görünüşü	Mikroskop görünüşü	Biyokimyasal reaksiyonlar	Etiyoloji ve ekoloji
<i>Trichophyton rubrum</i>	Yavaş ve orta hızlı ürer. Tüysü veya pamuksu yüzeye sahiptir. Koloni yüzeyi beyaz veya soluk pembedir. Kolonilerinin tabanı koyu kırmızıdır.	Armut şeklinde yan yana dizili mikrokonidya vardır. Kalem şeklinde makrokonidya yaygın değildir. Hif ve artrokonidya görülür.	BCP-MS-G agarda sınırlı ürer, renk değişimi olmaz. Üreaz olumsuzdur. Vitamin gereksinimi yoktur. <i>In vitro</i> kıl delme testi olumsuzdur.	Antropofiliktir. Tırnaklarda, saçsız deride ve nadiren saçlı deride hastalık etkenidir. Kıl içi (endotriks) ve kıl dışı (ektotriks) tutulum gösterebilir. Tüm dünyada en sık izole edilen dermatofittir.
<i>Trichophyton raubitschekii</i>	Orta hızlı ürer. Düz ve granüler yüzeyledir. Koloni yüzeyi beyaz veya kahverengimsi kırmızıdır.	Genellikle armut şeklinde ama çeşitli şekillerde mikrokonidya vardır. Makrokonidya silindirik şeklinde veya saphıdır.	BCP-MS-G agarda sınırlı ürer, renk değişimi olmaz. Üreaz olumludur. Vitamine gereksinimi yoktur, ancak #1 agarda kahverengi pigment oluşur. <i>In vitro</i> kıl delme testi olumsuzdur.	Antropofiliktir. Kuzey Asya, Hindistan ve Akdeniz’de yaygındır. Saçsız deriyi ve nadiren saçlı deriyi enfekte eder.
<i>Trichophyton megninii</i>	Orta hızlı ürer. Süet benzeri veya pamuksu yüzeyi vardır. Kolonide ışınal kanallar oluşur. Koloni yüzeyi beyaz ve pembe-menekşe moru rengindedir. Koloninin tabanı şarap kırmızısı veya kırmızımsı kahverengidir.	Armut şeklinde mikrokonidya vardır. Nadiren kalem şeklinde makrokonidya görülür.	BCP-MS-G agarda orta veya aşırı üreme gösterir; besiyerini alkalınleştirir. Sıvı üre besiyerinde üreaz olumlu iken; katı besiyerinde olumsuz olabilir. Üremesi için histidine gereksinim vardır (#7). <i>In vitro</i> kıl delme testi olumsuzdur.	Antropofiliktir. İspanya, Portekiz, nadiren Afrika ve Akdeniz’de görülür. Saçsız deri, saçlı deri, bıyık ve sakalda hastalık etkenidir. Ektotriks tutulum gösterir.

Tablo 2.2. (Devamı). *T. rubrum* kompleks içerisinde yer alan mikro-organizmaların genel özellikleri. BCP-MS-G, bromkrezol purple milk solid glikoz agar; #1, Trichophyton agar 1.

Mikro-organizma	Koloni görünüşü	Mikroskop görünüşü	Biyokimyasal reaksiyonlar	Etiyoloji ve ekoloji
<i>Trichophyton soudanense</i>	Yavaş ve orta hızlı ürer. 35°C’de hızlı ürer. Koloniler, kadifemsi veya katlanmalar gösterir. Koloni yüzeyi kayısı turuncusu, nadiren pembe veya kırmızı renktedir. Kültürü tekrarlanan örnekler pamuksu yüzeye ve sarı renkte koloni tabanına sahiptir.	Hifleri karşıt yönlü dallanma gösterir. Bu dallanmalar en iyi, BCP-MS-G agardan hazırlanan örneklerde görülür. Artrokonidyal parçalar ayrıdır. Nadiren armut şeklinde olan mikrokonidya tekli veya gruplar halinde BCP-MS-G agarda makrokonidya oluşabilir.	BCP-MS-G agarda alkalikleşme gösterir ve küçük hidroliz zonu oluşturur. Vitamin gereksinimi değişkendir. <i>In vitro</i> kıl delme testi olumsuzdur. Lowenstein-Jensen besiyerinde koyu kahverengi veya siyah pigment oluşur.	Antropofiliktir. Afrika’da, nadiren Kuzey Amerika’da, İngiltere’de ve Brezilya’da görülür. Saçlı deride ve vücudun, özellikle, görünen bölgelerinde hastalık etkenidir.
<i>Trichophyton kanei</i>	Yavaş ürer. Kadifemsi yüzeye sahiptir. Tallus beyazdır, zamanla kırmızıya dönüşür. Tabanı kırmızı veya kahverengi-kırmızıdır.	Mikrokonidya oluşmaz. Çok sayıda kalem şeklinde ve ucu “T” biçimli sonlanan makrokonidya görülür. Makrokonidya, artrokonidyalara ayrılır.	BCP-MS-G agarda sınırlı ürer ve değişikliğe neden olmaz. Üreaz zayıf olumludur. Vitamin gereksinimi olmamakla birlikte #1 agarda kahverengi pigment oluşturur. <i>In vitro</i> kıl delme testi olumsuzdur.	Antropofiliktir. El ve ayakta hastalık etkenidir. Nadir görülür.
<i>Trichophyton gourvilii</i>	Yavaş ürer. Koyu mor-kırmızı renkte ve kabarıktır. Tekrar kültürlerinde ise kadifemsi ve basık yüzeyli, pembe-kırmızıdır. Tabanı mor-kırmızı renklidir.	İlk kültürde konidya azdır ve <i>T. soudanense</i> ’yi andıran karşıt yönde dallanan hifler görülebilir. Tekrar kültürlerinde gözyaşı damlası şeklinde mikrokonidya ve silindirik makrokonidya görülür.	BCP-MS-G agarda orta yoğunlukta ürer, alkalikleşme gösterir ve küçük hidroliz zonu oluşturur. Üreaz olumsuzdur. Vitamin gereksinimi yoktur. <i>In vitro</i> kıl delme testi olumsuzdur.	Antropofiliktir. Saçlı deride, saçsız deride ve tırnakta hastalık etkenidir.
<i>Trichophyton yaoundei</i>	Yavaş ürer. Düz, katlanmış, nemli görümlü, başlangıçta krem, daha sonra çikolata renginde pigment oluşturur.	Mikrokonidya nadir olup makrokonidya yoktur.	Vitamine gereksinim duymaz. Üreaz olumlu, kıl delme deneyi olumsuzdur.	Antropofiliktir. Genellikle saçlı deride hastalık etkenidir.

Tablo 2. 3. *Trichophyton mentagrophytes* komplekse ilişkin farklı kolonilerin genel özellikleri. BCP-MS-G, bromkrezol purple milk solid glikoz agar.

Mikro-organizma	Koloni görünüşü	Mikroskop görünüşü	Biyokimyasal reaksiyonlar	Etiyoloji ve ekoloji
Granüler <i>Trichophyton mentagrophytes</i>	Orta hızlı ürer. Granüler ve düz görünümündedir. Koloni yüzeyi açık sarı veya ten rengidir. Koloninin arka yüzeyi soluk sarı, kırmızı-kahverengi veya ten rengindedir.	Yuvarlak ve üzüm salkımı şeklinde gruplanan mikrokonidya görülür. Spiral hif oluşturur. İnce duvarlı makrokonidyumun hife bağlandığı yerde daralma vardır. Puro şeklinde olabilir.	BCP-MS-G agarda yoğun ürer, alkalikleşme gerçekleşir. Üreaz olumludur. Vitamin gereksinimi yoktur. <i>In vitro</i> kıl delme testi olumludur.	Antropofilik ve zoofilik olabilir. Tüm dünyada yaygındır. Toprakta bulunabilir. El ve ayaklar, saçsız deride, sakal, saçlı deri, kasıkta hastalık etkenidir. Zoofilik türler ektotriks tutulum gösterirken; antropofilik türler saçlı deriyi enfekte etmez.
Kadifemsi <i>Trichophyton mentagrophytes</i>	Orta hızlı ürer. Yüzeyi kadifemsi, düz ve serpmeye toz gibi görülür. Koloni yüzeyi beyaz veya margarin sarısıdır.			
Tüysü <i>Trichophyton mentagrophytes</i>	Orta hızlı ürer. Yoğun ve pamuksu yapıdadır. Koloni yüzeyi beyazdır. Koloninin arka yüzeyi soluk sarı veya ten rengidir.	Armut şeklinde mikrokonidya ile <i>T. rubrum</i> 'dan ayırt edilemez.		
<i>Trichophyton erinacei</i>	Granüllü yapıda beyaz ve tabanı sarı renkli koloniler oluşturur.	Silindirik makrokonidya ve çok sayıda mikrokonidyum oluşturur.	Üreaz tepkimesi Avrupa tipi için olumsuz, Afrika tipi için olumludur. Kıl delme deneyi bazen olumsuzdur. Üreme için vitamene gereksinimi yoktur ve pH 4'te üremez.	Antropofilik ve zoofilik varyeteleri vardır. Yeni Zelanda ve Avrupa'da yayılım gösterir. Saçlı deri ve tırnakta hastalık etkenidir.
<i>Trichophyton quinckeanum</i>	Tipik olarak granüler yapıdaki <i>T. mentagrophytes</i> ile ilişkilidir. Koloni tabanının rengi koyu sarıdır.	Yuvarlak ve üzüm salkımı şeklinde gruplanan mikrokonidya görülür. Makrokonidya puro şeklinde olabilir.	Üreaz testi 1-7 günde olumludur. BCP-MS-G agarda besiyerini alkalikleştirir. <i>In vitro</i> kıl delme testi olumludur.	Zoofiliktir. İnsanda nadiren hastalık etkenidir. Çoğunlukla saçlı deriyi enfekte eder.

2.4. Ksantomegnin

Ksantomegnin, 1,4-naftokinon pigment ailesinin bir üyesidir. Asetat-polymalonat yoluyla sentezlenen bu pigment mutajenik bir mikotoksin olup, hepatoksik ve nefrotoksik etkilere sahiptir (53).

Ksantomegnin ilk kez *Trichophyton megninii*'den izole edilmiştir. Daha sonra, *Trichophyton violaceum*, *T. rubrum*, *Microsporum cookei*, *Aspergillus sulphureus*, *A. melleus*, *A. ochraceus*, *Penicillium cyclopium*, *P. freii* ve *P. viridicatum*'da da ksantomegninin varlığı gösterilmiştir (54). *T. rubrum* kolonilerinde görülen yoğun koyu kırmızı ve nadiren sarı pigment oluşumunun ksantomegninin farklı pH'lardaki görünümünden kaynaklandığı düşünülmüştür (52).

2.5. Kromatografi Tekniği

Kromatografi bir karışımdaki farklı maddelerin ayrıştırılması tekniğidir. *Chroma* "renk" ve *graphein* "yazmak" anlamlarına gelen kromatografiyi, ilk kez 1903'de Rus botanikçi Tswett, bitki pigmentlerini ayrıştırmak için kullanmıştır (55). Yönteme bu ismin verilmesinin nedeni, ayrıştırma işleminden sonra ortaya çıkan her bir maddeye ait farklı renk bantlarının görülmesidir.

Kromatografi tekniğinin iki amacı vardır: (i) örneğin kimyasal yapısını belirlemek ve (ii) uygun miktarda örneği saflaştırmaktır. Gerçekleştirilen tüm kromatografik ayırımlarda, destekleyici parçacıklara veya kolonun iç duvarına sabitlenen bir "durgun faz", bir de kromatografi kolonu boyunca, belirli bir yönde ilerleyen "hareketli faz" kullanılmaktadır. Kromatografinin temel sınıflandırılması hareketli fazın fiziksel durumuna göre yapılmaktadır, bunun yanı sıra kromatografik zemin biçimi ve afinitenin de dikkate alındığı sınıflandırmalar mevcuttur.

Kullanılan kromatografi tekniği ne olursa olsun, örnek molekülün katı fazla olan etkileşimini artırmak için kolonunun en yüksek etkinliği sağlayacak biçimde tasarlanması gerekir. Bunu gerçekleştirmenin bir yolu kolonu büyütme, daha etkili olan diğer yolu ise, katı faz ortam parçacıklarını olabildiğince küçültmektir. Daha etkili olmasına karşılık, bir takım sorunlar da dikkat çekicidir. Parçacık boyutu küçülünce parçacıklar arası mesafe de azalır ve kolonun geri basıncı artar. Bu nedenle pek çok katı faz, azaltılmış parçacık boyutuyla asla yüksek performans sağlayamaz ve 3.5 kPa

üzerindeki basınçta çöker (56). Ancak, böylesine yüksek basınca karşı dayanıklı ve çok daha kullanışlı organik-silika hibrit bazlı katı fazlar mevcuttur.

Boyutları 5–10 µm arasında değişen silika parçacıkları, yüksek performansta normal faz kromatografisi yapımını sağladığı gibi çeşitli kimyasal modifikasyonlarla istenilen moleküllerin büyük çoğunluğunun ayrıştırılmasını sağlar ki, bu da yüksek performans sıvı kromatografisi (HPLC) tekniğinin temelini oluşturur (56).

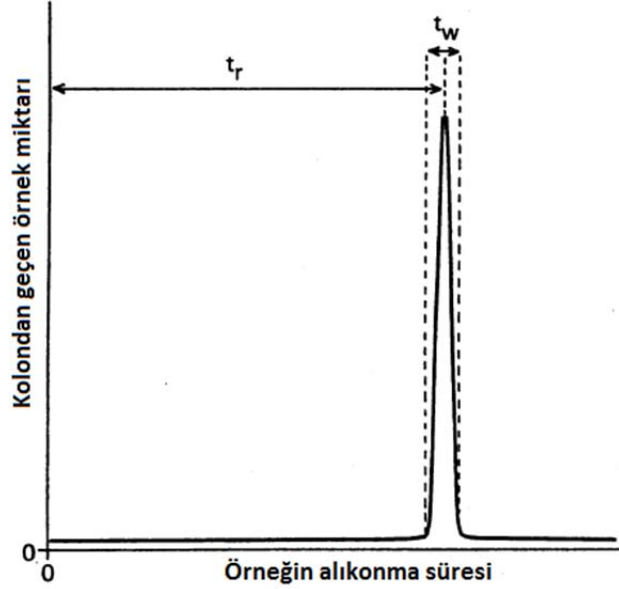
2.5.1. HPLC

HPLC, bir karışımdaki bileşenleri ayırmak ve her bir bileşeni tanımlayıp miktarını ölçmek amacıyla, özellikle kimya alanında kullanılan bir yöntemdir. Sistem, incelenecek örneği içeren yüksek basınçlı sıvı çözücünün, katı bir yüzey tutucu ile doldurulmuş kolondan geçirilmesi prensibine dayanır (57). Bu teknik 1960’lı yıllarda “yüksek basınçlı sıvı kromatografisi” olarak kullanılmaya başlanmış; 1970’lerin sonunda kolon malzemesinde ve aletlerdeki gelişmelerle, “yüksek performans sıvı kromatografisi” olarak kullanımı, 1980’lerin başında artmış ve 2006 yılı itibariyle de UPLC (ultra performance liquid chromatography), RRLC (rapid resolution liquid chromatography), UFLC (ultra fast liquid chromatograph), RSLC (rapid separation liquid chromatography) gibi çeşitli terimlerle güncelliğini sürdürmüştür (56). HPLC, (i) tıbbi tanıda [hemogloblin varyantlarının saptanması (58), kan serumunda vitamin D seviyesinin tespit edilmesi (59) veya vanil mandelik asitin belirlenmesi (60)], (ii) adli incelemelerde [idrarda performans artırıcı ilaçların aranması (61)], (iii) araştırma amaçlı [karmaşık yapıdaki biyolojik örneklerin bileşenlerine ayrılması (62)] ve (iv) biyolojik uygulamalarda [ilaç üretimi (63)] kullanılmaktadır.

Kullanım amacına göre “analitik” ve “hazırlayıcı” HPLC olmak üzere iki ayrı sistem mevcuttur. Analitik HPLC’de örnek dedektörden geçtikten sonra atılır. Amaç, örneğe ait bileşenlerin miktarının belirlenmesi ve/veya tanımlanmasıdır. Hazırlayıcı HPLC’de ise örnek dedektörden geçtikten sonra sistemdeki toplama alanına aktarılır. Amaç, bileşenlerin izole edilmesi ve saflaştırılmasıdır.

Sıvı kromatografi (LC) ve HPLC’nin çalışma mekanizması aynıdır; ancak hız, etkinlik, duyarlılık ve kullanım kolaylığı nedeniyle HPLC çok daha üstündür. Yüksek performans kolonu ile normal kolonun etkinliklerinin karşılaştırması $n=16(t_r^2)/(t_w)$ formülü ile yapılabilir. Formülde n etkinlik miktarını, t_r parçacığın kolon girişinden

dedektöre dek olan sistemi geçiş süresini (alınkonma süresi), t_w parçacığa ait pikin genişliğini gösterir (Şekil 2. 3) (56).



Şekil 2.4. Kolon etkinliği $n=16(t_r^2)/(t_w)$ formülü ile hesaplanır. Formülde n etkinlik miktarını, t_r parçacığın alıkonma süresini, t_w parçacığa ilişkin pikin genişliğini ifade eder.

2.5.1.1. HPLC Bileşenleri ve Görevleri

HPLC sistemi beş ana bileşenden oluşur: pompa, enjektör, kolon, dedektör ve bilgisayar. Pompanın sistemdeki rolü hareketli faz olarak adlandırılan sıvıyı belirli bir akış hızında pompalamaktır. Akış hızına göre tekdüze veya değişimli pompalar tercih edilebilir.

Enjektör; sıvı örneği hareketli faz akışı içine bırakır, bu yüzden sıvı sistemin basıncına karşı dayanıklı olması gerekir. Fazla sayıda örneği kolaylıkla çalışabilmeyi sağlayan otomatik enjektörler olduğu gibi, manuel çeşitleri de vardır.

Sistemde kolon “kromatografinin kalbi” olarak nitelendirilir. Kolonun durgun fazı, çeşitli fiziksel ve kimyasal parametrelere göre, örnek içerisindeki bileşenlerin ayrılmasını sağlar.

Kolondan ayrılan moleküllerin her biri dedektörle belirlenir. Belirlenen moleküllerin miktarlarının ölçülmesi ve sonuçların bir kayıt cihazı ya da bilgisayara

aktarımı da dedektörle sağlanır. Pek çok belirleme prensibi olmasına karşılık en sık kullanılanlar spektroskopik tespit, kırılma endeksi tespiti ve floresans tespitidir.

Çoğu kez, veri sistemi olarak isimlendirilen bilgisayar ise, yalnızca HPLC aletlerinin tüm modüllerini kontrol etmekle kalmaz, aynı zamanda dedektörden gelen sinyalleri alır ve örneğe ait bileşenlerin alıkonma zamanı ile örnek miktarını belirler.

Bahsedilen bileşenlerin yanı sıra sistemde bağlantıyı sağlamak amacıyla kullanılan boru malzemeler de vardır. Bunlar paslanmaz çelik, cam veya polietilen eter keton (PEEK) polimerden yapılmış olabilir. Paslanmaz çelikten olan borular yüksek basınca daha dayanıklı olmaları nedeniyle en çok kullanılanlardır ancak; biyomoleküller için cam borular tercih edilir. PEEK polimerden üretilenler ise biyo-uyumlu ve çözücülerin çoğuna tepkisizdir. HPLC sisteminde sıcaklık değişimi; tekrarlanabilirliği, çözünürlüğü ve kimyasal kararlılığı etkileyebileceği için, kontrol altında tutulmalıdır. Sıcaklık kontrolünü sağlamak amacıyla ısıtıcı blok, su banyosu veya fırın kullanılabilir (56).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Referans İzolatlar

Bu çalışmada, DNA dizi analizi ile tanımlanan ve güncel sınıflandırmaya göre isimlendirilen, Centraalbureau voor Schimmelfcultures (CBS)-KNAW Mantar Biyoçeşitlilik Merkezi, Utrecht, Hollanda'dan ve Macit İlkit çalışma koleksiyonundan temin edilen, *Arthroderma* spp. ($n=7$), *T. mentagrophytes* kompleks ($n=7$) ve *T. rubrum* kompleks ($n=18$)'e ilişkin 32 referans izolat incelendi (Tablo 3. 1.). Çalışma öncesinde izolatların tümü 100 µg/ml sikloheksimit, 100 µg/ml kloramfenikol ve 50 µg/ml gentamisin içeren SGA'ya inoküle edildi ve 28 °C'de 14 gün inkübe edildi.

3.2. Klinik Örnekler ve Klinik İzolatlar

Bu çalışmada, Çukurova Üniversitesi Dermatoloji Anabilim Dalı'na başvuran dermatofitoz ön tanılı hastalardan alınan saçsız deri ($n=9$) ve tırnak kazıntısı ($n=4$) olmak üzere toplam 13 klinik örnek ve bu örneklerin ITS dizi analizi ile *T. rubrum* s. str. ($n=9$) ve *T. interdigitale* ($n=4$) olarak tanımlanan izolatları incelendi. Çalışma öncesinde klinik örneklerin tümü 100 µg/ml sikloheksimit, 100 µg/ml kloramfenikol ve 50 µg/ml gentamisin içeren SGA'ya inoküle edildi ve 28 °C'de 14 gün inkübe edildi. Klinik izolatların üreaz aktivitesi, bromkrezol moru süt tozu glikoz agarda üreme özelliği ve kıl delme etkisi değerlendirildi.

3.2.1 Klasik Yöntemle Tanımlama Gereçleri

3.2.1.1 Besiyerleri

3.2.1.1.1 Sabouraud Glikoz Agar (SGA; Merck; Darmstadt, Almanya)

Glikoz	40 g
Pepton	10 g
Agar	15 g
Distile su	1000 mL
pH	5.6–6.0
Sikloheksimit (Sigma; Steinheim, Almanya)	0.1 g
Kloramfenikol (Sigma; Steinheim, Almanya)	0.125 g

Gentamisin (Sigma; Steinheim, Almanya) 0.2 g

Ticari olarak temin edilen besiyerinden 65 g tartıldı. 1 l distile su eklenerek, otoklavda 121 °C’de 15 dk 1 atm. basınçta steril edildi. Otoklavdan çıkarılan besiyerinin sıcaklığının düşmesi beklendikten sonra içine gentamisin, %95’lik 2 ml etil alkolde çözdürülmüş kloramfenikol ve 2 ml asetonda çözdürülmüş sikloheksimit eklendi. Steril, tek kullanımlık plastik petrilere kalınlığı 4 mm olacak şekilde 25 ml dağıtılan besiyeri katılaştıktan sonra kullanım sürelerine dek 4 °C’de muhafaza edildi.

3.2.1.1.2. Üre Besiyeri

Üre	5 g
Maya Özütü	0.025 g
KH ₂ PO ₄	2.275 g
Na ₂ HPO ₄	2.375 g
Fenol kırmızısı	0.0025 g
Distile su	250 ml

Yukarıda anılan sarf malzemeleri karıştırıldı ve besiyeri pH’sı 6.8’e ayarlandı. Sterilizasyon işlemi 0.22 µm’lik steril tek kullanımlık filtre ile steril koşullarda gerçekleştirildi. Sıvı besiyeri cam tüplere 5’er ml olacak şekilde dağıtıldı. Örneklerin üreaz etkinliği, 28°C’de, 3 – 7 ve 14. günlerde besiyerinde meydana gelen renk değişimine göre değerlendirildi. Besiyerinin sarı renginin inkübasyon sonunda pembeye dönüşmesi olumlu kabul edildi (11).

3.2.1.1.3. Bromkrezol Moru Süt Tozu Glikoz Agar

Çözelti A;

Süt tozu	80 g
Bromkrezol moru (Himedia; Mumbai, Hindistan)	2 ml
(alkol içerisinde çözdürülmüş %1.6)	
Distile su	1000 ml

Çözelti B;

Glikoz	40 g
--------	------

Distile su	200 ml
<u>Çözelti C:</u>	
Agar	30 g
Distile su	800 ml

Çözeltiler otoklavda 121 °C’de 15 dk. süre ile steril edildi, karıştırıldı ve karışımın son pH’sının 6.6 olması sağlandı. Steril petrilere 20 ml dağıtılan besiyerlerine, çalışmada kullanılan kökenler inoküle edildi ve 28 °C’de 21 gün süre ile inkübe edildi. Değerlendirme besiyerinde üreme varlığı ve pH değişimine göre yapıldı. Alkali tepkime sonucunda gri-mavi olan besiyeri renginin gri-mor renge değişmesi araştırıldı (11).

3.2.1.1.4. Kıl Delme Testi

Bu test, *T. mentagrophytes* kompleksin (4– 5 gün) saç kılını, *T. rubrum* komplekse (13–30 gün) göre daha çabuk delmesi ve bu iki kompleksin bu yöntemle ayırt edilmesi esasına dayanır. *T. violaceum*’un ise kılı 6–7 günde deldiği bildirilmiştir (26). Testin uygulanmasında beş yaşından küçük sarışın çocuk saç kılları, otoklavda 121 °C’de 15 dk. steril edildi. Ayrıca, 20–25 ml steril damıtık su içine %10’luk 0.1 ml maya özütünün milipor’dan süzülüp karıştırılmasıyla bir besiyeri hazırlandı. Bu besiyeri, içerisinde yaklaşık 20 adet saç kılı bulunan steril petrilere dağıtıldı; üzerine dermatofit kökeni eklendi ve 28 °C’de 21 gün süre ile inkübe edildi. Test edilen kökenin kılı delip delmediği; laktofenol pamuk mavisi ile her gün ışık mikroskopunda kontrol edildi (11).

Tablo 3.1. Çalışmada incelenen *Arthroderma* ve *Trichophyton* türlerine ilişkin referans izolatlar.

Türler	CBS No.	MI No.	Kaynak	Ülke
<i>Arthroderma</i> kökenleri				
(n=7)				
<i>A. simii</i>	417.65		Tavuk	Hindistan
<i>A. simii</i>	132352		<i>Tinea inguinalis</i>	Mersin, Türkiye
<i>A. simii</i>	448.65		Kümes hayvanı	Hindistan
<i>A. vanbreuseghemii</i>	428.63		Deri, ayak tabanı	Hollanda
<i>A. vanbreuseghemii</i>	132252	19654	İnsan, kasık	Adana, Türkiye
<i>A. vanbreuseghemii</i>	117724		İnsan	Fransa
<i>A. vanbreuseghemii</i>	138553	19761	İnsan, folikülit	Adana, Türkiye
<i>T. mentagrophytes</i> kompleksi (n=7)				
<i>T. erinacei</i>	344.79		İnsan, saçsız deri	Hollanda
<i>T. erinacei</i>	511.73		<i>Erinaceus europaeus</i> (kirpi)	Yeni Zelanda
<i>T. erinacei</i>	677.86		İnsan, tırnak	Almanya
<i>T. interdigitale</i>	-	19670	<i>Tinea pedis</i>	Adana, Türkiye
<i>T. interdigitale</i>	-	19671	<i>Tinea unguium</i>	Adana, Türkiye
<i>T. interdigitale</i>	-	19672	<i>Tinea unguium</i>	Adana, Türkiye
<i>T. m. var. mentagrophytes</i>	110.65		İnsan, kasık	Hollanda
<i>T. rubrum</i> kompleksi (n=18)				
<i>T. kuryangei</i>	518.63		-	-
<i>T. megninii</i>	389.58		İnsan, tırnak	Utrecht, Hollanda
<i>T. raubitschekii</i>	102856		İnsan, el tırnağı	İtalya (Kamerun'dan bir hasta)
<i>T. raubitschekii</i>	287.86		İnsan, saçsız deri	Toronto, Kanada
<i>T. raubitschekii</i>	125604		İnsan, saçsız deri	Adana, Türkiye
<i>T. raubitschekii</i>	125605		İnsan, saçsız deri	Adana, Türkiye
<i>T. rubrum</i>	392.58		İnsan, tinea pedis	Rotterdam, Hollanda
<i>T. rubrum</i>	138551	19762	İnsan, folikülit	Adana, Türkiye
<i>T. rubrum</i>	132251	19651	İnsan, kasık	Adana, Türkiye
<i>T. rubrum</i>	132249	19652	İnsan, kasık	Adana, Türkiye
<i>T. rubrum</i>	132250	19653	İnsan, kasık	Adana, Türkiye
<i>T. rubrum</i>	138550	19763	İnsan, folikülit	Adana, Türkiye
<i>T. rubrum</i>	138552	19764	İnsan, folikülit	Adana, Türkiye
<i>T. soudanense</i>	436.63		Saçsız deri ve saç	Afrika (Ülke bilinmiyor)
<i>T. violaceum</i>	-	20141	<i>Tinea capitis</i>	Adana, Türkiye
<i>T. violaceum</i>	119446		<i>Tinea capitis</i>	Gabon
<i>T. violaceum</i>	120322		<i>Tinea capitis</i>	İsviçre
<i>T. yaoundei</i>	677.82		Saçlı deri	Hollanda (Fas'tan bir hasta)

CBS, Centraalbureau voor Schimmelcultures koleksiyonu; MI, Macit Ilkit koleksiyonu.

3.2.1.2. Laktofenol Pamuk Mavisi (Merck; Darmstadt, Almanya)

Ticari olarak temin edilen laktofenol pamuk mavisi, 28 °C'de iki hafta inkübe edilen dermatofitlerin selofan bant yöntemi ile incelenmesinde kullanıldı. Kısaca, koloni yüzeyine selofan bant hafifçe yapıştırılıp çekildikten sonra, üzerine laktofenol pamuk mavisi damlatılmış temiz bir lam üzerine yapıştırıldı. Mantara ilişkin hif, klamidospor, mikrokonidyum ve makrokonidyum yapıları önce x10'luk ardından x40'luk objektifte incelendi.

3.3. HPLC Yöntemi İle Tanımlama Gereçleri

Tüm örneklerin ekstraksiyonunda HPLC kullanımına uygun özellikteki solüsyonlar hazırlandı ve kullanıldı.

3.3.1. Solüsyonlar

Hazırlanan tüm solüsyonlar oda ısısında ve ağzı kapalı şekilde muhafaza edildi.

3.3.1.1. Metanol-Kloroform-Asetik Asit (50: 50: 1)

Metanol (Merck; 1.06009) 100 ml

Kloroform (Merck; 1.02445) 100 ml

Asetik asit (Merck; 1.00063) 2 ml

3.3.1.2. Asetonitril-Su-KH₂PO₄ (55: 45: 0.14)

Asetonitril (Merck; 1.00003) 550 ml

Saf su 450 ml

KH₂PO₄ 1.4 g

3.3.2. Ekstraksiyon

Referans izolatların ve klinik örneklerin ekstraksiyonu Gupta *et al.* (52) daha önce tanımladığı yöntemde küçük bazı değişiklikler yapılarak gerçekleştirildi. Kısaca, petri plağında üretilen izolatlardan yaklaşık olarak 2,5 cm² bir parça kesildi ve temiz bir mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı. Tüp içinde ezilen parça 1 ml metanol-kloroform-asetik asit karışımı ile 10 dakika muamele edildi. Cam yününden süzülen ekstraktın çözücüsü 40 °C'de buharlaştırıldı. Kalıntı üzerine 500 µl asetonitril eklenerek 5 dakika bekletildi.

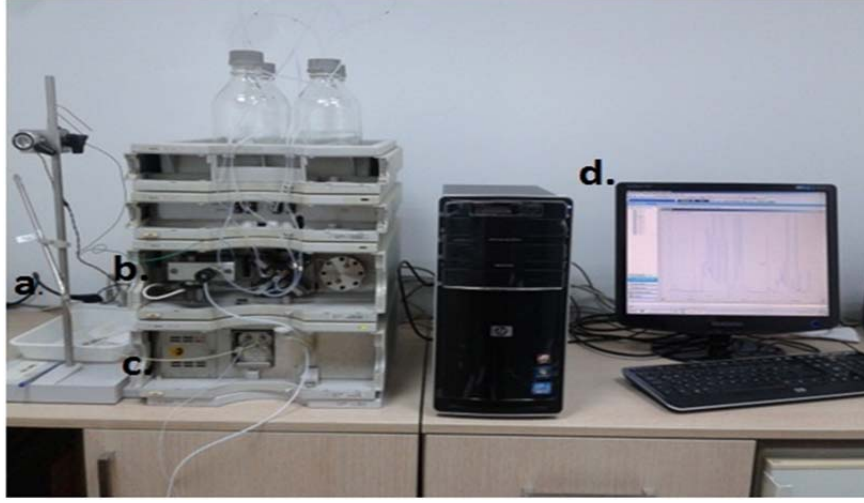
Cam yünü ile süzme ve 40 °C’de buharlaştırma işlemleri tekrarlandı. Tüpe 50 µl asetonitril eklenerek vorteks cihazında karışması sağlandı. 13.000 rpm’de 10 dakika santrifüj edilen tüplerin üst kısmındaki sıvı, çevresi alüminyum folyo ile sarılı temiz bir tüpe aktarıldı. Toplam işlem süresi en fazla 3 saat olarak belirlendi.

Klinik örneklerin ekstraksiyonunda, alınan örnekler temiz bir mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı ve 500 µl metanol-kloroform-asetik asit karışımı ile 10 dakika muamele edildi. Cam yününden süzülen ekstraktın çözücüsü 40 °C’de buharlaştırıldı. Kalıntı üzerine 100 µl asetonitril eklenerek vorteks cihazında karıştırıldı. 13.000 rpm’de 10 dakika santrifüj edilen tüplerin üst kısmındaki sıvı, çevresi alüminyum folyo ile sarılı temiz bir tüpe aktarıldı. İşlemler sırasında örneklerin ışığa maruz kalması önlendi ve toplam ekstraksiyon süresi 2 saat olarak belirlendi.

3.3.3. HPLC

HPLC işlemi manuel enjektör (G1328B), pompa (G1311A), gaz giderici (G1379A) ve ACE 4,6 mm x 25 cm C₈ (seri numarası: A137853) ters faz kolonundan oluşan dörtlü çözücü dağıtım sistemi (Agilent Technologies; Tokyo, Japonya) ile gerçekleştirildi. Tespit için ChemStation integratörü ile VWD (G1314A) değişken dalga boylu dedektör kullanıldı. Örnekler 405 nm dalga boyunda görüntülendi. Kolon, dakikada 1 ml asetonitril-su-KH₂PO₄ hareketli fazı ile dengelendi. Tüm ayrıştırılmalar tek kanallı olarak gerçekleştirildi. Ksantomegnin standart çözeltisi HPLC analizinden önce toz haldeki saf ksantomegninin asetonitril içinde 30 dakika çözdürülmesi ile elde edildi. Örneklerde tanımlanan ksantomegnin; standart çözeltinin elde edilen son kromatogramındaki alıkonma süresi ile uyumuna göre değerlendirildi (52).

Çalışmada kullanılan sistem ve bileşenleri Şekil 3. 1.’de gösterilmektedir.



Şekil 3.1. HPLC sistemi ve bileşenleri. a. Kolon, b. Pompa, c. Dedektör ve d. Bilgisayar sistemi.

4. BULGULAR

4.1. Referans Kökenler

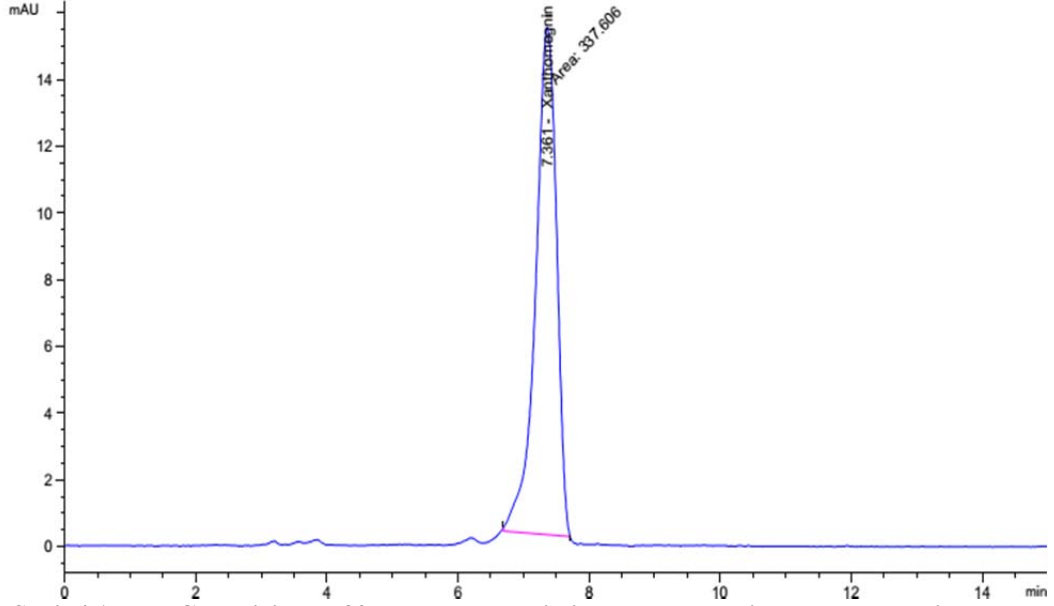
Tüm kökenler Çukurova Üniversitesi Teknokent'te aynı anda analiz edildi. HPLC ile ksantomegninin saflaştırılması, saptanması ve ölçülmesi başarılı şekilde gerçekleştirildi. Ksantomegnin standart maddesine ilişkin HPLC kromatogramı Şekil 4. 1.'de sunuldu. Çalışmada ksantomegnin aktivitesi, her bir köken için hazırlanan 500 µl ekstraktan sisteme 20 µl enjekte edilerek ölçüldü. Araştırmada 12 *T. rubrum* kompleks kökeninde saptanan ksantomegnin değerleri 0.03–106.18 µg/ml aralığında belirlendi. Geriye kalan 6 *T. rubrum* kompleks kökeninde ksantomegnin saptanmadı. Ayrıca, beklenildiği gibi, 7 *T. mentagrophytes* kompleks kökeninin 6'sında ve 7 *Arthroderma* kökeninin 5'inde, ksantomegnin saptanmadı. Ek olarak, 1 *T. interdigitale* (0.14 µg/ml) ve 2 *A. vanbreuseghemii* (1.14 ve 2.07 µg/ml) kökeninde saptanan ksantomegnin değerleri *T. rubrum* kompleks için belirlenen değer aralığı ile uyumlu bulundu (Tablo 4. 1.). Ksantomegnin saptanan bazı *T. rubrum* kompleks üyelerine ilişkin kromatogramlar Şekil 4. 2.'de, ksantomegnin saptanan *T. rubrum* kompleks dışı kökenlere ve ksantomegnin saptanmayan bazı *T. mentagrophytes* kompleks üyeleri ile bazı *Arthroderma* kökenlerine ilişkin kromatogramlar Şekil 4. 3.'de gösterildi.

4.2. Klinik Örnekler ve İzolatlar

Toplam 13 klinik izolatın üreaz aktivitesi, bromkrezol moru süt tozu glikoz agarda üreme özelliği ve pH değişimi ve kıl delme testlerinin değerlendirilmesi ile elde edilen bulgular (4), izolatlarla ilişkin ITS dizi analizi verileriyle uyumlu bulundu. Toplam 9 klinik izolat *T. rubrum s. str.*, 4 izolat ise *T. interdigitale* olarak tanımlandı.

HPLC analizi sonunda, 13 klinik örneğin ve bu örneklerle ilişkin izolatların 11'ünde, sırasıyla 0.004–0.27 µg/ml ve 0.21–14.43 µg/ml aralık değerlerinde ksantomegnin saptandı. Tinea pedis ve tinea unguium ön tanılı iki hasta örneğine ilişkin klinik izolatlarda ksantomegnin aktivitesi sırasıyla 0,31 ve 8.90 µg/ml olarak saptanmasına karşı, bahsedilen klinik örneklerin doğrudan analizinde ksantomegnin saptanmadı. Ksantomegnin aktivitesinde, klinik örneğin ve izolatların anatomik bölgesine ve hastaların yaş veya cinsiyet özelliklerine göre farklılık görülmedi. Bununla

birlikte klinik örneklerde saptanan ksantomegnin miktarları klinik izolatlarda saptananlara kıyasla daha düşük bulundu (Tablo 4. 2.) Bazı klinik örneklere ve bu örneklerden elde edilen izolatlarla ilişkin kromatogramlar Şekil 4. 4'te gösterildi.

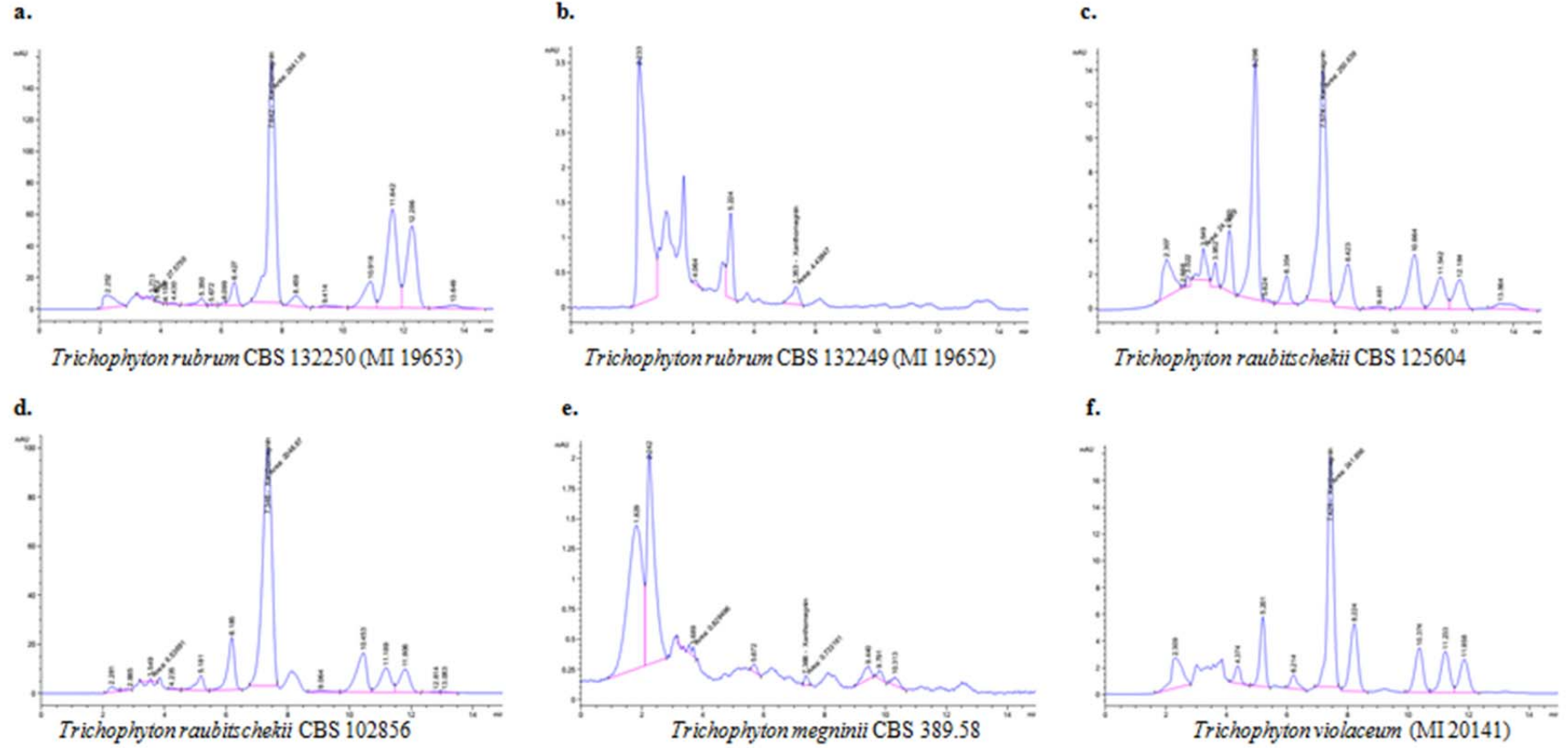


Şekil 4.1. HPLC analizinden 30 dk önce asetonitrille muamele edilen ksantomegnin standart maddesine ilişkin HPLC kromatogramı. Geliş süresi: 7.361 dakika, alanı: 337.61 mAU/s, miktarı: 13.57 µg/ml.

Tablo 4.1. Çalışmada kullanılan *Arthroderma* ve *Trichophyton* türlerine ilişkin izolatların HPLC sonuçları.

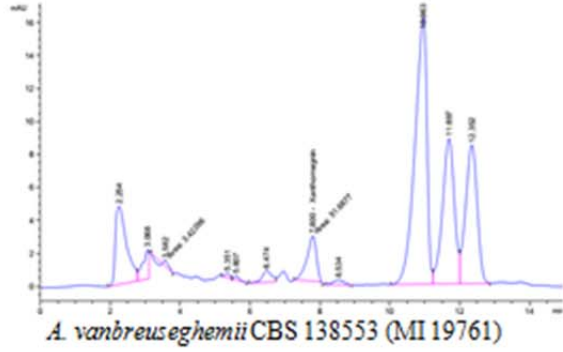
Türler	CBS Nu.	MI Nu.	Ksantomegnin miktarı (µg/ml)	Pik alanı (mAU/ s)
Arthroderma izolatları (n=7)				
<i>A. simii</i>	417.65		-	-
<i>A. simii</i>	132352		-	-
<i>A. simii</i>	448.65		-	-
<i>A. vanbreuseghemii</i>	428.63		-	-
<i>A. vanbreuseghemii</i>	132252	19654	1.14	28.32
<i>A. vanbreuseghemii</i>	117724		-	-
<i>A. vanbreuseghemii</i>	138553	19761	2.07	51.69
T. mentagrophytes kompleksi (n=7)				
<i>T. erinacei</i>	344.79		-	-
<i>T. erinacei</i>	511.73		-	-
<i>T. erinacei</i>	677.86		-	-
<i>T. interdigitale</i>	-	19670	-	-
<i>T. interdigitale</i>	-	19671	-	-
<i>T. interdigitale</i>	-	19672	0.14	3.57
<i>T. m. var. mentagrophytes</i>	110.65		-	-
T. rubrum kompleksi (n=18)				
<i>T. kuryangei</i>	518.63		-	-
<i>T. megninii</i>	389.58		0.03	0.73
<i>T. raubitschekii</i>	102856		82.36	2048.87
<i>T. raubitschekii</i>	287.86		13.01	323.55
<i>T. raubitschekii</i>	125604		10.07	250.64
<i>T. raubitschekii</i>	125605		42.79	1064.57
<i>T. rubrum</i>	392.58		-	-
<i>T. rubrum</i>	138551	19762	8.25	205.29
<i>T. rubrum</i>	132251	19651	16.07	399.86
<i>T. rubrum</i>	132249	19652	0.18	4.44
<i>T. rubrum</i>	132250	19653	106.19	2641.55
<i>T. rubrum</i>	138550	19763	15.85	394.20
<i>T. rubrum</i>	138552	19764	4.26	105.95
<i>T. soudanense</i>	436.63		-	-
<i>T. violaceum</i>	-	20141	9.72	241.86
<i>T. violaceum</i>	119446		-	-
<i>T. violaceum</i>	120322		-	-
<i>T. yaoundei</i>	677.82		-	-

CBS, Centraalbureau voor Schimmelcultures koleksiyonu; MI, Macit Ilkit koleksiyonu.

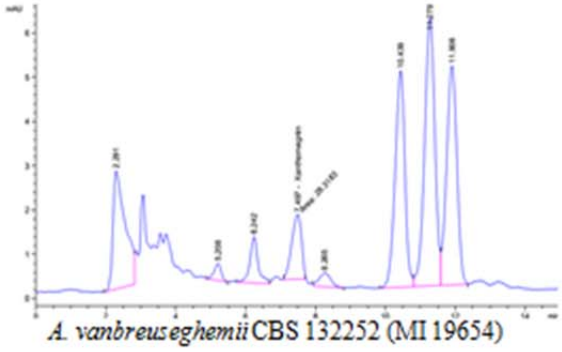


Şekil 4.2. Çalışmada kullanılan bazı *Trichophyton rubrum* kompleks üyelerinin (a-f), HPLC analizleri sonunda elde edilen kromatogramları. *Trichophyton* kökenlerinin ksantomegnin miktarları ve ilişkili pik aralıkları Tablo 4. 1.'de verilmiştir.

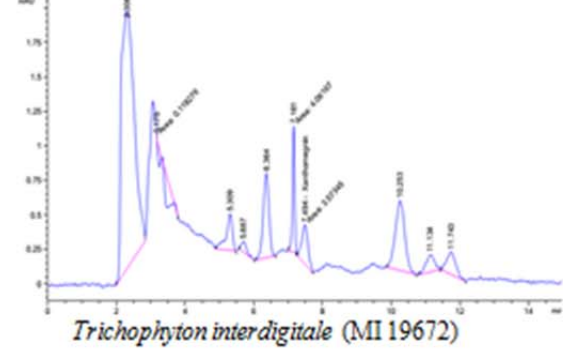
a.



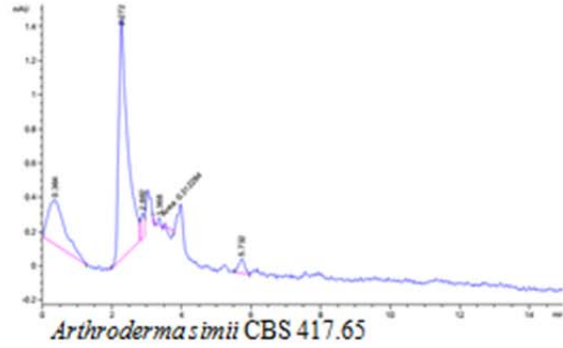
b.



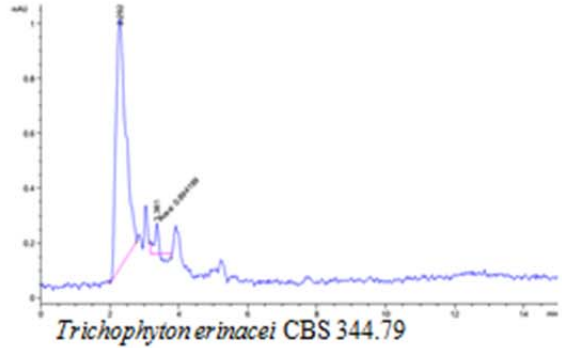
c.



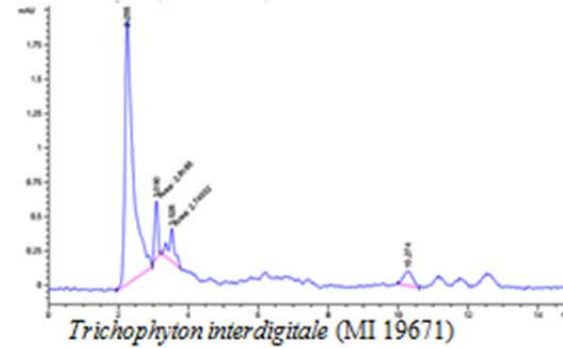
d.



e.



f.

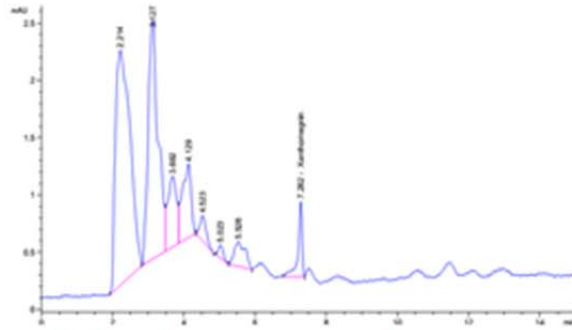


Şekil 4.3. Ksantomegnin belirlenen *A. vanbreuseghemii* (a ve b) ve *T. interdigitale* (c) ile ksantomegnin belirlenmeyen *A. simii* ve bazı *T. mentagrophytes* kompleks üyesi kökenlere ilişkin (e ve f) HPLC kromatogramları.

Tablo 4.2. Çalışmada kullanılan klinik örneklerde ve *T. rubrum sensu stricto* ve *T. interdigitale* olarak tanımlanan klinik izolatlarda saptanan ksantomegnin miktarları. T, Tinea; E, Erkek; K, Kadın; §, *T. interdigitale* izolatları.

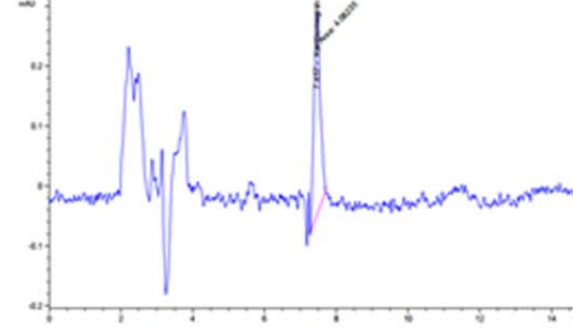
HPLC							
Klinik Örnekler				Klinik İzolatlar			
Örnek Nu.	Klinik Şekil	Cinsiyet	Yaş	Miktar (µg/ml)	Pik Alanı (mAU/s)	Miktar (µg/ml)	Pik Alanı (mAU/s)
1	T. unguium [§]	E	48	0.21	5.25	1.09	27.09
2	T. pedis [§]	K	44	0.05	1.16	0.55	13.68
3	T. pedis	E	63	0.004	0.11	-	-
4	T. cruris	E	17	0.02	0.48	14.43	359.00
5	T. pedis	E	67	-	-	0.31	7.76
6	T. pedis	E	55	0.16	4.08	0.21	5.25
7	T. pedis [§]	E	40	0.20	4.89	1.23	30.59
8	T. unguium	E	58	0.23	5.74	1.02	25.44
9	T. unguium	K	36	-	-	8.90	221.41
10	T. pedis	K	63	0.27	6.66	5.45	135.59
11	T. unguium	E	53	0.16	4.08	2.05	51.01
12	T. pedis [§]	K	44	0.07	1.70	-	-
13	T. pedis	K	47	0.26	6.59	4.02	100.12

a.



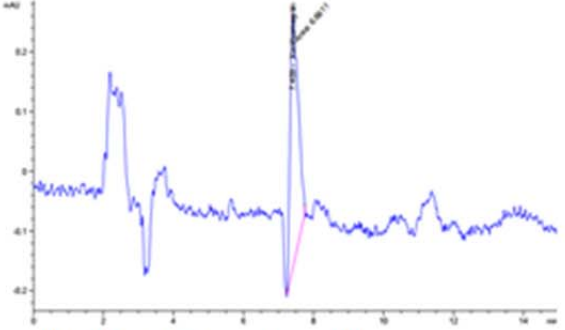
Klinik örnek; tinea unguium, no:1.

b.



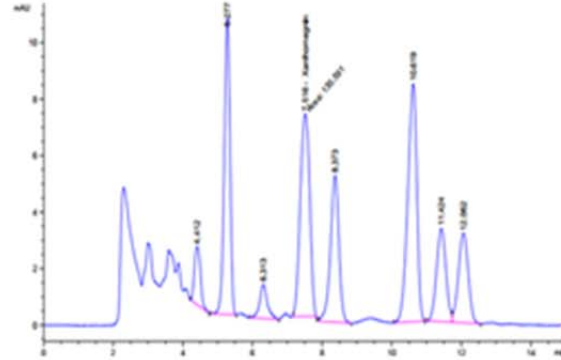
Klinik örnek; tinea pedis, no:10.

c.



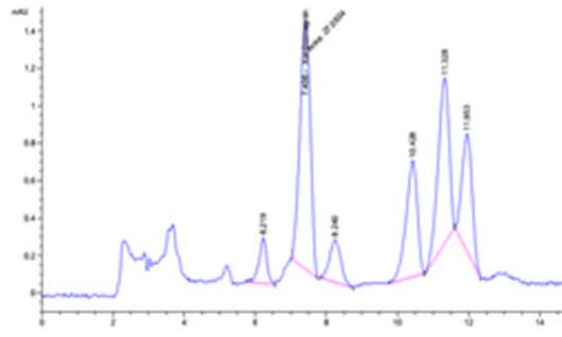
Klinik örnek; tinea pedis, no:14.

d.



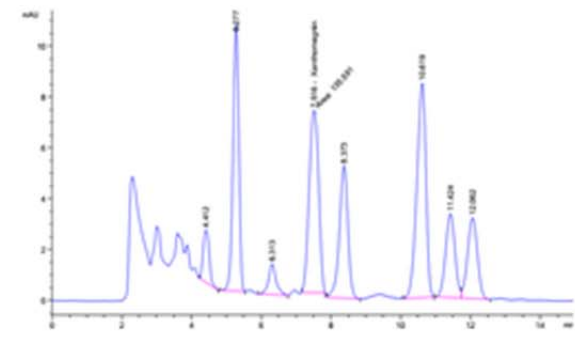
Klinik izolat; tinea unguium, no:1.

e.



Klinik izolat; tinea pedis, no:10.

f.



Klinik izolat; tinea pedis, no:14.

Şekil 4.4. Dermatofitoz ön tanı klinik örneklerin (a-c) ve bu örneklerden izole edilen *T. rubrum* izolatlarının (d-f) analiz sonucu elde edilen HPLC kromatogramları. Klinik örneklerin ve izolatların ksantomegnin miktarları ve ilişkili pik aralıkları Tablo 4. 2.'de verilmiştir.

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada, *T. rubrum* ve *T. mentagrophytes* (ve telemorfu *Arthroderma* spp.) komplekslerinin ayırt edilmesi amaçlandı. Referans kökenler, klinik örnekler ve klinik izolatlar HPLC yöntemi ile incelendi. HPLC analizi, Gupta *et al.* (52) tarafından daha önce tanımlanan ve ksantomegnin miktarını mikrogram düzeyinde ölçmeyi sağlayan yöntemde küçük bazı değişiklikler yapılarak gerçekleştirildi. Çalışma verilerine göre, referans *T. rubrum* kökenlerinin 2/3'sinde ve bu kökenlerle uyumlu olarak 1 *T. interdigitale* (MI 19672) ve 2 *A. vanbreuseghemii* (CBS 132252 ve CBS 138553) kökenlerinde ksantomegnin saptandı. Bu nedenle, HPLC yönteminin *T. rubrum* kompleks ve *T. mentagrophytes* kompleks (ve telemorfu *Arthroderma* spp.)'i ayırt etmede güvenilir bir yöntem olmadığı düşünüldü.

Gupta *et al.* (52), *T. rubrum* enfeksiyonlarında hastanın ksantomegnine maruz kalabileceğini ve ksantomegninin tanıda bir belirteç olabileceğini önermişlerdir. Ancak, *T. rubrum* lezyonlarının tümünde ksantomegnin varlığına dair bir verinin de bulunmadığını bildirmişlerdir (52). Çalışmamızda, *T. rubrum* enfeksiyonu tanılı 2 hastanın klinik örneklerinde ksantomegnin tespit edilemedi, ancak örneklere ilişkin izolatlarda belirlendi. Bu sebeple çalışmamızda elde edilen sonuçlar Gupta *et al.* (52) tarafından elde edilen bulguları doğrular özellikte idi. Klinik örnekler hastalardan 2 ay önce toplandı ve çok az miktarda ksantomegnin içerdikleri belirlendi. Buna gerekçe olarak da *T. rubrum*'un artrokonidya yapılarının dış ortamda 18 ay üremeden canlı kalabileceğinin bilinmesi gösterilebilir (1).

HPLC, kesin bir taksonomik tanımlama sağlamasa da, Gupta *et al.* (52) tarafından yapılan çalışmada ve sunulan bu çalışmada, *T. rubrum* içeren referans izolatların, klinik örneklerin ve bunların klinik izolatlarının HPLC ile incelenmesinin yararlı olabileceği görüldü. Nitekim, HPLC, tıbbi mikoloji alanında, klinik örneklerin rutin laboratuvar tanısında kolaylıkla önerilebilecek bir yöntemdir. ITS dizi analizi (64) veya MALDI-TOF MS (65) yöntemlerinin aksine ve onlardan avantajlı olarak veri tabanı gereksinimi olmadan *T. rubrum* kompleksi tanımlamada kullanılabilir. Bu sebeple *T. rubrum* kompleksin tanımlanmasında yalnızca tamamlayıcı bir test olarak kullanımı önerilebilir. HPLC yönteminin tıbbi mikolojide kullanımının yaygın

olmaması ve tıbbi mikologların yöntemi uygulamada deneyimsiz olmaları çalışmayı sınırlayan faktörlerdendir. Bu yüzden mevcut çalışma deneyimli bir biyokimyacı ile gerçekleştirildi.

T. rubrum sensu stricto 20. y.y.'ın ikinci yarısında olduğu gibi 21. y.y.'da da tüm dünyada saçsız deri ve tırnak dermatofitozlarının en sık etkenidir (2, 20). *T. rubrum s. str.*'nin görülme sıklığındaki bu artışta kentleşme ile birlikte spor alanlarının ortak kullanımının, obezitenin ve yaşlanan nüfusun artmasının da etkisi vardır (1). *T. rubrum s. str.* diğer pek çok antropofilik tür gibi uzun seyirli, kronik ancak sınırlı hastalık ve doku hasarı etkenidir (66). Bu yüzden klinik mikologlar bu insan patojeninin tanısına ve *T. mentagrophytes* kompleksten ayırt edilmesine yönelik hızlı ve güvenilir yöntemler geliştirme çabasıdadır. Bu iki komplekste yer alan izolatların değişken veya atipik morfolojide olabilmeleri sebebiyle fenotipik özelliklerin iki kompleksi ayırt etmede yetersiz olması ve *T. rubrum* kompleks içerisinde, *T. raubitschekii* morfolotipi (67) dışında, az spor oluşturan klinik izolatların yer alması gibi nedenlerle iki kompleksin birbirinden ayırt edilmesi güçtür (4).

Literatürde, *T. rubrum* ve *T. mentagrophytes* kompleksleri birbirinden ayırt etmeye yönelik pek çok çalışma mevcuttur. Doğrudan klinik örnekten ya da bir dermatofit kolonisinden gerçekleştirilen real-time PCR (68) veya MALDI-TOF MS (65) gibi teknikler bu iki kompleksi başarı ile ayırt etmişlerdir. Nested-PCR (69), PCR-ELISA (40) ve multiplex-PCR (42) gibi PCR temelli bazı teknikler ile duyarlılığı ve özgüllüğü yüksek sonuçlar elde edilmiştir. Yine bu iki kompleksi ayırt etmeye yönelik yakın geçmişte yapılan çalışmalarımızda; FT-IR spektrometresi (47) ve çeşitli besiyerlerinde yoğun makrokonidya oluşturma özellikleri (70) değerlendirilerek başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Ayrıca, önemle belirtmek gerekir ki, *T. mentagrophytes* kompleksin aksine *T. rubrum* kompleks içerisinde yer alan türler genetik olarak ITS dizi analizi ile ayırt edilemez iken; morfolojik ve fizyolojik özelliklerine göre ayırt edilebilir özelliktedir (1, 5, 67).

Çalışmanın literatüre katkılarından birisi de, bazı *T. rubrum* kompleks referans kökenleri ile klinik örneklerde ksantomegnin tespit edilmemesi ve 2 *A. vanbreuseghemii* ile 1 *T. interdigitale* kökeninde tespit edilmesi sonucu ksantomegnin aktivitesinin dermatofit türleri içerisinde yalnızca *T. rubrum* komplekse ilişkin bir özellik olmadığını ortaya konulmasıdır. Özellikle onikomikozlu hastalardan izole edilecek

dermatofit dışı keratinofilik mantarların (*Fusarium*, *Syctalidium* vb.) ksantomegnin aktivitesinin bundan sonraki çalışmalarda ortaya konulması bu alandaki bilgilerimizin derinleşmesine yardımcı olacaktır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

1. Literatürden farklı olarak ksantomegnin aktivitesinin dermatofitler arasında yalnızca *T. rubrum* komplekse ilişkin bir özellik olmadığı ortaya konuldu.
2. *A. vanbreuseghemii* kökenlerinden 2'sinde ve *T.interdigitale* kökenlerinden 1'inde, *T. rubrum* kompleks için belirlenen ksantomegnin düzeyi aralığında aktivite saptandı.
3. Ksantomegnin aktivitesi; klinik örneğin anatomik bölgesine veya hastanın yaş ve cinsiyetine bağlı bulunmadı.
4. Klinik örneklerde saptanan ksantomegnin miktarı klinik izolatlarla oranla düşük olduğu belirlendi.
5. HPLC yöntemi ile gerek referans gerekse klinik izolatlarda ksantomegnin belirlenmesinin taksonomik veya identifikasyon temelli araştırmalar için uygun bir hedef olmadığı ortaya koyuldu.
6. HPLC ile ksantomegnin saptanması hızlı ve düşük maliyetli bir yöntemdir.
7. HPLC ile ksantomegnin saptanması, *T. rubrum* kompleksin tanımlanmasında yalnızca tamamlayıcı bir test olarak önerilebilir.

KAYNAKLAR

1. **İlkit M, Durdu M.** Tinea pedis: The etiology and global epidemiology of a common fungal infection. *Crit Rev Microbiol*, **2015** (in press).
2. **Taylor C, Gurr S.** Fungal pathogenesis: Past, present and future. *Fungal Biol Rev*, **2014**; 28:24-28.
3. **Shehata AS, Mukherjee PK, Aboulatta HN, el-Akhras AI, Abbadi SH, Ghannoum MA.** Single-step PCR using (GACA)₄ primer: utility for rapid identification of dermatophyte species and strains. *J Clin Microbiol*, **2008**;46(8):2641-2645.
4. **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):811-822.
5. **Gräser Y, Kuijpers AFA, Presber W, de Hoog GS.** Molecular taxonomy of the *Trichophyton rubrum* komplex. *J Clin Microbiol*, **2000**; 38:3329-3336.
6. **Summerbell RC, Weitzman I, Padhye AA.** *Trichophyton, Microsporum, Epidermophyton* and Agents of Superficial Mycoses. In: Murray PR, Baro EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA. Eds. Manual of Clinical Microbiology, 9th Ed., Washington: ASM Press; **2007**; 1874-1897.
7. **Mythrey RC, Madhu HM, Gajanana H.** Conceptual analysis of dadru *vis-a-vis* tinea. *JBSO*, **2014**; 2(5):332-334.
8. **İlkit M.** Favus of the scalp: An overview and update. *Mycopathologia*, **2010**; 170: 143–154.
9. **Welsh O, Vera-Cabrera L, Welsh E.** Onychomycosis. *Clin Dermatol*, **2010**; 28:151–159.
10. **Summerbell R, Weitzman I.** The dermatophytes. *Clin Microbiol Rev*, **1995**; 8(2):240-259.
11. **Kane J, Summerbell R, Sigler L, Krajden S, Land G.** Laboratory Handbook of Dermatophytes: A Clinical Guide and Laboratory Manual of Dermatophytes and Other Filamentous Fungi from Skin, Hair, and Nails. Belmont, CA: Star Publishing Co; 1997.
12. **Tchernev G, Penev PK, Nenoff P, Zisova LG, Cardoso JC, Taneva T, Ginter-Hanselmayer G, Ananiev J, Gulubova M, Hristova R, Nocheva D, Guarneri C, Martino G, Kanazawa N.** Onychomycosis: modern diagnostic and treatment approaches. *Wien Med Wochenschr* **2013**; 163(1-2):1-12.
13. **Döğen A, Gümral R, Öksüz Z, Kaplan E, Serin MS, İlkit M.** Epidemiology of dermatophytosis in junior combat and non-combat sports participants. *Mycoses*, **2013**; 56(2):95-100.
14. **Baldo A, Monod M, Mathy A, Cambier L, Bagut ET, Defaweux V, Symoens F, Antoine N, Mignon B.** Mechanisms of skin adherence and invasion by dermatophytes. *Mycoses*, **2012**; 55:218-223.
15. **Garg J, Tilak R, Garg A, Prakash P, Gulati AK, Nath G.** Rapid detection of dermatophytes from skin and hair. *BMC Res Notes*, **2009**; 18(2):60.
16. **Gräser Y, Scott J, Summerbell R.** The new species concept in dermatophytes-a polyphasic approach. *Mycopathologia*, **2008**; 166:239-256.

17. **Symoens F, Jousson O, Planard C, Fratti M, Staib P, Mignon B, Monod M.** Molecular analysis and mating behaviour of the *Trichophyton mentagrophytes* species complex. *Int J Med Microbiol*, **2011**; 301:260-266.
18. **Dukik K.** Kişisel görüşme.
19. **Heidemann S, Monod M, Gräser Y.** Signature polymorphisms in the internal transcribed spacer region relevant for the differentiation of zoophilic and anthropophilic strains of *Trichophyton interdigitale* and other species of *T. mentagrophytes sensu lato*. *Br J Dermatol*, **2010**; 162(2):282-295.
20. **Borman AM, Campbell CK, Fraser M, Johnson EM.** Analysis of the dermatophyte species isolated in the British Isles between 1980 and 2005 and review of worldwide dermatophyte trends over the last three decades. *Med Mycol*, **2007**; 45(2):131-141.
21. **Rippon JW.** Dermatophytosis and dermatomycosis. In: Rippon JW. Ed. *Medical Mycology: The Pathogenic Fungi and the Pathogenic Actinomycetes*, 3rd Ed., Philadelphia. Saunders; **1988**.
22. **Summerbell RC.** Kişisel görüşme.
23. **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(10):4444-4448.
24. **Kwon-Chung KJ, Bennett JE.** *Medical Mycology*. Philadelphia. Lea and Febiger; **1992**; 105-170.
25. **Kane J.** *Trichophyton fischeri* sp. nov.: a saprophyte resembling *Trichophyton rubrum*. *Sabouraudia*, **1977**; 15(3):231-41.
26. **Gümrall R, Döğen A, Durdu M, İlkit M.** The use of albino adult hair and blond prepubertal hair yields equivalent results in an *in vitro* hair perforation test to differentiate between different dermatophytic fungi. *Mycopathologia*, **2013**; 176(1-2):23-31.
27. **Lacaz CS, Zaitz C, Ruiz LR, de Souza VM, Santos AR, Muramatu LH, de Melo NT, Heins-Vaccari EM, Hernandez-Arriagada GL, de Freitas-Leite RS.** Dermatophytosis caused by *Trichophyton raubitschekii*. Report of the first case in São Paulo, Brazil *Rev Inst Med Trop S Paulo*, **1999**; 41(5):313-317.
28. **Sun PL, Hsieh HM, Ju YM, Jee SH.** Molecular characterization of dermatophytes of the *Trichophyton mentagrophytes* complex found in Taiwan with emphasis on their correlation with clinical observations. *Br J Dermatol*, **2010**; 163: 1312-1318.
29. **Nenoff P, Herrmann J, Gräser Y.** *Trichophyton mentagrophytes* sive interdigitale? A dermatophyte in the course of time. *J Dtsch Dermatol Ges*, **2007**; 5:198-202.
30. **Robert R, Pihet M.** Conventional methods for the diagnosis of dermatophytosis. *Mycopathologia*, **2008**; 166(5-6):295-306.
31. **Akbaba M, İlkit M, Sütölk Z, Ateş A, Zorba H.** Comparison of hairbrush, toothbrush and cotton swab methods for diagnosing asymptomatic dermatophyte scalp carriage. *Eur Acad Dermatol Venereol*, **2008**; 22(3):356-362.
32. **Toksöz L, Güzel AB, İlkit M, Akar T, Saraçlı MA.** Scalp dermatophyte carriage in pregnant, pre-, and postmenopausal women, comparison of hairbrush, tooth brush and cotton swab methods. *Mycopathologia*, **2011**; 171(5):339-344.
33. **İlkit M, Gümrall R, Döğen A.** Borelli's lactrimel agar induces conidiation in rare-macroconidia producing dermatophytic fungi. *Med Mycol*, **2012**; 50(7):735-739.

34. Winter I, Uhrlaß S, Krüger C, Herrmann J, Bezold G, Winter A, Barth S, Simon JC, Gräser Y, Nenoff P. Molecular biological detection of dermatophytes in clinical samples when onychomycosis or tinea pedis is suspected. A prospective study comparing conventional dermatomycological diagnostics and polymerase chain reaction. *Hautarzt*, **2013**; 64(4):283-289.
35. Dhib I, Fathallah A, Charfeddine IB, Meksi SG, Said MB, Slama F, Zemni R. Evaluation of chitine synthase (CHS1) polymerase chain reaction assay in diagnosis of dermatophyte onychomycosis. *J Mycol Med*, **2012**; 22(3):249-255.
36. Abastabar M, Mirhendi H, Rezaei-Mathkolaei A, Shidfar MR, Kordbacheh P, Makimura K. Restriction analysis of β -tubulin gene for differentiation of the common pathogenic dermatophytes. *J Clin Lab Anal*, **2014**; 28(2):91-96.
37. Yüksel T, İlkit M. Identification of rare macroconidia-producing dermatophytic fungi by real-time PCR. *Med Mycol*, **2012**; 50(4):346-352.
38. Bergman A, Heimer D, Kondori N, Enroth H. Fast and specific dermatophyte detection by automated DNA extraction and real-time PCR. *Clin Microbiol Infect*, **2013**; 19(4):E205-211.
39. De Baere T, Summerbell R, Theelen B, Boekhout T, Vanechoutte M. Evaluation of internal transcribed spacer 2-RFLP analysis for the identification of dermatophytes. *J Med Microbiol*, **2010**; 59(Pt 1): 48-54.
40. Beifuss B, Bezold G, Gottlöber P, Borelli C, Wagener J, Schaller M, Kortling HC. Direct detection of five common dermatophyte species in clinical samples using a rapid and sensitive 24-h PCR-ELISA technique open to protocol transfer. *Mycoses*, **2011**; 54(2):137-145.
41. Santos DA, Araújo RA, Hamdan JS, Cisalpino PS. *Trichophyton rubrum* and *Trichophyton interdigitale*: genetic diversity among species and strains by random amplified polymorphic DNA method. *Mycopathologia*, **2010**; 169(4):247-255.
42. Mehlig L, Garve C, Ritschel A, Zeiler A, Brabetz W, Weber C, Bauer A. Clinical evaluation of a novel commercial multiplex-based PCR diagnostic test for differential diagnosis of dermatomycoses. *Mycoses*, **2014**; 57(1):27-34.
43. Dhib I, Fathallah A, Yaacoub A, Hadj Slama F, Said MB, Zemni R. Multiplex PCR assay for the detection of common dermatophyte nail infections. *Mycoses*, **2014**; 57(1):19-26.
44. Worek M, Kwiatkowska A, Ciesielska A, Jaworski A, Kaplan J, Miedziak B, Deregowska A, Lewinska A, Wnuk M. Identification of dermatophyte species using genomic in situ hybridization (GISH). *J Microbiol Methods*, **2014**; 100:32-41.
45. Piérard GE, Arrese JE, De Doncker P, Piérard-Franchimont C. Present and potential diagnostic techniques in onychomycosis. *J Am Acad Dermatol*, **1996**; 34(2 Pt 1):273-277.
46. Hui D, Xue-Cheng S, Ai-e X. Evaluation of reflectance confocal microscopy in dermatophytosis. *Mycoses*, **2013**; 56(2):130-133.
47. Ergin Ç, İlkit M, Gök Y, Çon AH, Özel MZ, Kabay N, Dögen A, Baygu Y. The effect of Tween-80 on the differentiation of *Trichophyton mentagrophytes* and *Trichophyton rubrum* strains with FT-IR spectroscopy. *Mikrobiyol Bul*, **2014**; 48(3):448-460.
48. Nenoff P, Erhard M, Simon JC, Muylowa GK, Herrmann J, Rataj W, Gräser Y. MALDI-TOF mass spectrometry- a rapid method for the identification of dermatophyte species. *Med Mycol*, **2013**; 51(1):17-24.
49. Faggi E, Pini G, Campisi E, Bertellini C, Difonzo E, Mancianti F. Application of PCR to distinguish common species of dermatophytes. *J Clin Microbiol*, **2001**; 39(9):3382-3385.

50. Bergmans AMC, Schouls LM, van der Ent M, Klaassen A, Bohm N, Wintermans RGF. Validation of PCR–reverse line blot, a method for rapid detection and identification of nine dermatophyte species in nail, skin and hair samples. *Clin Microbiol Infect*, **2008**; 14:778-788.
51. Yang G, Zhang M, Li W. Direct species identification of common pathogenic dermatophyte fungi in clinical specimens by semi-nested PCR and restriction fragment length polymorphism. *Mycopathologia*, **2008**; 166:203-208.
52. Gupta AK, Ahmad I, Borst I, Summerbell RC. Detection of xanthomegnin in epidermal materials infected with *Trichophyton rubrum*. *J Invest Dermatol*, **2000**; 115(5):901-905.
53. Peterson RE, Grove MD. Isolation of xanthomegnin from *Penicillium viridicatum* by preparative high-pressure liquid chromatography. *Appl Environ Microbiol*, **1983**; 45(6):1937-1938.
54. Himes VL, Mighella AD, Page SW, Stack ME. Structure of xanthomegnin. *Acta Cryst*, **1981**; B37:1932-1935.
55. Scott RPW. Principles and practice of chromatography. Book 1, Chrom-Ed Book Series. **2003**.
56. Ian M Bird. High performance liquid chromatography: principles and clinical applications. *Br Med J*, **1989**; 299:783-787.
57. Gerber F, Krummen M, Potgeter H, Roth A, Siffrin C, Spöndlin C. Practical aspects of fast reversed-phase high performance liquid chromatography using 3 microm particle packed columns and monolithic columns in pharmaceutical development and production working under current good manufacturing practise. *J Chromatogr A*, **2004**; 1036:127-133.
58. Çürük MA, Dimovski AJ, Baysal E, Gu LH, Kutlar F, Molchanova TP, Webber BB, Altay C, Gürgey A, Huisman TH. Hb Adana or alpha 2(59)(E8) Gly>Asp beta 2, a severely unstable alpha 1-globin variant, observed in combination with the –(alpha) 20.5 Kb alpha-thal-1 deletion in two Turkish patients. *Am J Hematol*, **1993**; 44:270-275.
59. Ford L. Measurement of vitamin D. *Methods Mol Biol*, **2013**; 1065:245-257.
60. Lionetto L, Lostia AM, Stigliano A, Cardelli P, Simmaco M. HPLC-mass spectrometry method for quantitative detection of neuroendocrine tumor markers: vanillylmandelic acid, homovanilic acid and 5-hydroxyindolacetic acid. *Clin Chim Acta*, **2008**; 398:53-56.
61. Boccard J, Badoud F, Grata E, Ouertani S, Hanafi M, Mazerolles G, Lantéri P, Veuthey JL, Saugy M, Rudaz S. A steroidomic approach for biomarkers discovery in doping control. *Forensic Sci Int*, **2011**; 213:85-94.
62. Kutlar F, Kutlar A, Huisman TH. Separation of normal and abnormal hemoglobin chains by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr*, **1986**; 357:147-153.
63. Pang YN, Liang YW, Feng TS, Zhao S, Wu H, Chai YS, Lei F, Ding Y, Xing DM, Du LJ. Transportation of Berberine into HepG2, HeLa and SY5Y Cells: a correlation to its anti-cancer effect. *PLoS One*, **2014**; 9:e112937.
64. Nilsson RH, Ryberg M, Kristiansson E, Abarenkov K, Larsson KH, Kõljalg U. Taxonomic reliability of DNA sequences in public sequence databases: a fungal perspective. *PLoS One*, **2006**; 1:e59.
65. Erhard M, Hipler UC, Burmester A, Brakhage AA, Wöstemeyer J. Identification of dermatophyte species causing onychomycosis and tinea pedis by MALDI-TOF mass spectrometry. *Exp Dermatol*, **2008**; 17: 356-361.

66. White TC, Findley K, Dawson TL, Jr Scheynius A, Boekhout T, Cuomo CA, Xu J, Saunders CW. Fungi on the skin: dermatophytes and *Malassezia*. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2014; 4(8): a019802.
67. İlkit M, Saraçlı MA, Yüksel T. *Trichophyton rubrum* with the 'raubitschekii' morphotype: the first report from Turkey. *Mycopathologia*, 2011; 171:119-122.
68. Arabatzis M, Bruijnestein van Coppenraet LE, Kuijper EJ, de Hoog GS, Lavrijsen AP, Templeton K, van der Raaij-Helmer EM, Velegraki a, Gräser Y, Summerbell RC. Diagnosis of common dermatophyte infections by a novel multiplex real-time polymerase chain reaction detection/identification scheme. *Br J Dermatol*, 2007; 157:681-689.
69. Verrier J, Krähenbühl L, Bontems O, Fratti M, Salamin K, Monod M. Dermatophyte identification in skin and hair samples using a simple and reliable nested polymerase chain reaction assay. *Br J Dermatol*, 2013; 168:295-301.
70. Döğen A, İlkit M. Comparative evaluation of Borelli's lactrimel agar and Lowenstein-Jensen agar for conidiation in the *Trichophyton mentagrophytes* and *Trichophyton rubrum* complexes. *Mycopathologia*, 2013; 175:135-140.

ÖZGEÇMİŞ

Acıpayam, Denizli’de 1989’da doğdu. İlk, orta ve lise eğitimini Acıpayam’da tamamladı. Lisans eğitimine 2007’de Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü’nde başladı ve 2011’de mezun oldu. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı’nda 2011’de başladığı yüksek lisans eğitimine, 2012 itibariyle Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı’nda araştırma görevlisi olarak devam etmektedir.