

ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
2013-YL-040

TOPRAKTAN VE İNSANDAN İZOLE EDİLEN BAZI
DERMATOFİTLERİN MOLEKÜLER TANISI

Merve YAVUZ

Tez Danışmanı:

Doç. Dr. H. Halil BIYIK

Prof. Dr. Fevzi BARDAKÇI

AYDIN

ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE
AYDIN

Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı öğrencisi Merve YAVUZ tarafından hazırlanan “Topraktan ve İnsandan İzole Edilen Bazı Dermatofitlerin Moleküler Tanısı” başlıklı tez, tarihinde yapılan savunma sonucunda aşağıda isimleri bulunan jüri üyelerince kabul edilmiştir.

Jüri üyeleri tarafından kabul edilen bu Yüksek Lisans Tezi, Enstitü Yönetim Kurulunun Sayılı kararıyla tarihinde onaylanmıştır.

Prof. Dr. Cengiz ÖZARSLAN
Enstitü Müdürü

ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE
AYDIN

Bu tezde sunulan tüm bilgi ve sonuçların, bilimsel yöntemlerle yürütülen gerçek deney ve gözlemler çerçevesinde tarafımdan elde edildiğini, çalışmada bana ait olmayan tüm veri, düşünce, sonuç ve bilgilere bilimsel etik kuralların gereği olarak eksiksiz şekilde uygun atıf yaptığımı ve kaynak göstererek belirttiğimi beyan ederim.

Merve YAVUZ

ÖZET
TOPRAKTAN VE İNSANDAN İZOLE EDİLEN BAZI
DERMATOFİTLERİN MOLEKÜLER TANISI

Merve YAVUZ

Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. H. Halil BIYIK

II. Danışman: Prof. Dr. Fevzi BARDAKÇI

2013, 59 sayfa

Dermatofitler; keratin substratı parçalayabilen funguslardır. Keratin gibi güçlü bir materyali istila edebilmeleri keratinolitik aktiviteleri sayesinde. *Microsporum*, *Trichophyton* ve *Epidermophyton* genuslarını içeren bu funguslar hayvanlarda ve insanlarda deri infeksiyonlarına sebep olabilmektedir. Anthropofilik (insan), zoofilik (hayvan) ve geofilik (toprak) olmak üzere 3 ekolojik nişe ayrılırlar. Ülkemizde insan ve hayvanlardan dermatofit izolasyon çalışmalarına birçok örnek vardır. Ancak topraktaki dermatofit florasına dair çalışma azdır. Bu çalışmada topraktan ve insandan izole edilen dermatofitlerin moleküler tanısı ve enzim potansiyellerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Çalışma kapsamında 50 toprak örneği alınmıştır. Toprak örnekleri saç tuzağı tekniği ile incelenmiştir. Deride kaşıntı, kızarıklık, tırnakta kalınlaşma ve renk değişikliği olan 20 gönüllüden sürüntü alınmıştır. Topraktan 41, insanlardan 7 adet olmak üzere 48 adet fungus izole edilmiştir. Bu funguslardan genomik DNA izolasyonu yapılmıştır. Tanılamada belirteç olarak ITS tercih edilmiştir. PCR ürünlerinin sekansları CLUSTALW, BLAST programlarıyla analiz edilmiştir. İzole edilen keratinofilik ve dermatofit genusları; *Debaryomyces*, *Chrysosporium*, *Arthroderma*, *Galactomyces*, *Paecilomyces*, *Trichophyton*, *Microsporum*, *Aphanoascus*, *Geotrichum*, *Lecanicillium*, *Beauveria*, *Penicillium*, *Scedesporium*, *Purpureocillium*, *Uncinocarpus*, *Acremonium*, *Pseudallescheria*'dır. Elde edilen fungusların % 23'ü dermatofittir. 48 izolattan; 7 adet *Arthroderma fulvum*, 2 adet *Microsporum gypseum*, 2 adet *Trichophyton rubrum* olmak üzere 11 adet dermatofit elde edilmiştir. Funguslardan 25 tanesi katı besiyerinde proteaz, lipaz, fosfolipaz, elastaz ve keratinaz üretimi açısından incelenmiştir. Fungusun büyüme çapı ve oluşturduğu zon çapı esas alınarak Pz değeri hesaplanmıştır. Dermatofitler

yüksek fosfolipaz ve lipaz üretimi göstermişlerdir. *B. bassiana* ve *P. lilacinus* türleri yüksek elastaz ve keratinaz aktiviteleriyle dikkat çekmiştir.

Anahtar sözcükler: Dermatofit, ITS, keratinofilik

ABSTRACT

MOLECULAR IDENTIFICATION OF SOME DERMATOPHYTES ISOLATED FROM SOIL AND MAN

Merve YAVUZ

M.Sc. Thesis, Department of Biology

Supervisor: Assist. Doç. Dr. H. Halil BIYIK

Co-Supervisor: Prof. Dr. Fevzi BARDAKCI

2013, 59 sayfa

Dermatophytes are fungi which can break down the keratin substrate. Invasion of a strong material such as keratin is due to their keratinolytic activity. These fungi including genera *Microsporum*, *Trichophyton* and *Epidermophyton* can cause skin infections in animals and human.

It is divided into three ecological niches such as antropophilic (human), zoophilic (animal) and geophilic (ground). In our country, there are many examples of dermatophytes isolation studies from human beings and animals. But there is relatively less studies on the flora of dermatophytes in soil. In this study, the molecular diagnosis and enzyme potential of dermatophytes isolated from soil and human were aimed. Fifty soil samples were collected for the purpose of this study. Soil samples were examined with hair trap technique. Swab was taken from 20 volunteers who have skin itching, redness, thickening and discoloration of the nail. A total of 48 fungi, 41 from soil and 7 from human, were isolated. Genomic DNA was isolated from these fungi. ITS has been preferred as a marker for identification. Sequences of the PCR products have been analyzed by ClustalW, BLAST programs. Isolated keratinophilic and dermatophytes genera were *Debaryomyces*, *Chrysosporium*, *Arthroderma*, *Galactomyces*, *Paecilomyces*, *Trichophyton*, *Microsporum*, *Aphanoascus*, *Geotrichum*, *Lecanicillium*, *Beauveria*, *Penicillium*, *Scedesporium*, *Purpureocillium*, *Uncinocarpus*, *Acremonium*, *Pseudallescheria*. Twenty three per cent of fungi obtained were dermatophyte. Eleven dermatophytes were obtained from 48 isolates of which 7 *Arthroderma fulvum*, 2 *Microsporum gypseum* and 2 *Trichophyton rubrum*. 25 of fungi were examined for production of protease, lipase, phospholipase, elastase and keratinase. Pz value was calculated based on the diameter of the zone formed and the growth

diameter of fungus. Dermatophytes displayed high production of phospholipase and lipase. *B. bassiana* and *P. lilacinus* species drew attention with high elastase and keratinase activities.

Key words: Dermatophytes, ITS, keratinophilic

ÖNSÖZ

Çalışmanın en başından beri yardımlarını esirgemeyen, her zaman destek olan değerli danışmanım Doç. Dr. Halil BIYIK'a, moleküler çalışmalarda katkı ve önerilerde bulunan II. danışmanım Prof. Dr. Fevzi BARDAKÇI'ya, keratin saflaştırmasında yardımcı olan Doç. Dr. Kubilay METİN'e, her konuda desteklerini hissettiğim Yrd. Doç. Dr. Gamze BAŞBÜLBÜL ve Dr. Esin POYRAZOĞLU'na, kişiliği ve bilimsel duruşuyla örnek aldığım Prof. Dr. Selçuk HAZIR'a, tez çalışmamı FEF-12025 numaralı proje ile destekleyen ADÜ BAP Başkanlığı'na, bilgi birikim ve deneyimlerini benimle paylaşan, her başım sıkıştığında yardımına koşan laboratuvar arkadaşlarım Melihcan ÖZTEBER ve Gamze Sevri EKREN'e, maddi ve manevi destekleri için annem Sevim YAVUZ, babam Müjdat YAVUZ, kardeşim Işıl YAVUZ'a teşekkür ederim.

Bu süreçte uzakta olmalarına rağmen her fırsatta zaman ayıran, motive eden arkadaşlarım Cahit ŞAHİN ve Hüseyin BİÇER'e teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

KABUL ONAY SAYFASI.....	iii
BİLİMSEL ETİK BİLDİRİM SAYFASI	v
ÖZET	vii
ABSTRACT	ix
ÖNSÖZ	xi
SİMGELER DİZİNİ.....	xv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xvii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xvix
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	3
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	17
3.1. MATERYAL	17
3.1.1. Toprak Örnekleri.....	17
3.1.2. İnsanlardan Alınan Örnekler	18
3.1.3. Kullanılan Besiyerleri ve Çözeltiler.....	19
3.2. YÖNTEM.....	25
3.2.1. Elde Edilen Funguslardan Genomik DNA İzolasyonu	26
3.2.2. Toplam Genomik DNA' nın Kantitatif ve Kalitatif Tayini.....	26
3.2.3. İzole Edilen Fungusların Moleküler Tanılanması	27
3.2.4.Katı Besiyerinde Enzim Görüntüleme	28
4. BULGULAR/TARTIŞMA	29
4.1. İzole Edilen Fungusların Moleküler Tanı Sonuçları	29
4.2. Enzim Görüntüleme Denemesinin Sonuçları	37
5. SONUÇ	46
KAYNAKLAR	48
ÖZGEÇMİŞ	59

SİMGELER DİZİNİ

AT	Aseptomatik taşıyıcılık
rRNA	Ribozomal ribonükleik asit
ITS	Internal Transcribed Spacer
IGS	Intergenic Spacer
CHS	Kitin sentaz geni
SDA	Sabouraud dekstroz agar
ESA	Elastaz screening agar
TSA	Tyriptic soy agar
LSA	Lipaz screening agar
PhSA	Fosfolipaz screening agar
KSA	Keratinaz screening agar
CBB	Coomassie Brilliant Blue
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
TBE	Tris-Borik Asit EDTA
μ l	Mikrolitre
Bp	Baz çifti
DNA	Deoksiribonükleik Asit
dNTP	Deoksiribonükleotid trifosfat
EDTA	Etilendiamin tetra asetik asit
Nm	Nanometre
OD	Optik dansite
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RAPD	Rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA
SK	Sulandırma katsayısı

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. ITS ve alt birimler (Mochizuki vd., 2003)	12
Şekil 4.1. Saç tuzaklarından binoküler mikroskop görüntüleri	33
Şekil 4.2. A. fulvum izolatının sırasıyla petri, binoküler ve mikroskop görüntüsü	34
Şekil 4.3. Fungusların petri görüntüleri	35
Şekil 4.4. Fungusların binoküler mikroskop görüntüleri	36
Şekil 4.5. ITS-PCR sonuçlarının elektroforez görüntüsü	37
Şekil 4.6. 1) PSA -, 2,3) PSA +, 4,5) LSA + petri görüntüleri.....	40
Şekil 4.7. 1,2) KSA pozitif, 3) ESA pozitif, 4) ESA negatif, 5,6) PhSA pozitif petri görüntüleri	41

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Anamorf ve telemorf türler (Weitzman ve Summerbell, 1995).....	5
Çizelge 2.2. Microsporum, Trichophyton, Epidermophyton cinslerinin genel morfolojik özellikleri (Tümbay, 1999).	7
Çizelge 2.3. Dermatofitlerin ekolojik açıdan sınıflandırılması (Tümbay, 1999; Özkütük, 1999).	10
Çizelge 3.1. Toprak örneklerinin alındığı lokaliteler	17
Çizelge 3.2. İnsanlardan alınan örnekler	18
Çizelge 3.3. ITS bölgesini çoğaltmak için kullanılan PCR karışımı	27
Çizelge 4.1. İzole edilen fungusların moleküler tanı sonuçları	30
Çizelge 4.2. Enzim görüntüleme denemesinin sonuçları	38
Çizelge 4.3. Enzim görüntüleme denemesinin Pz değerleri.....	42
Çizelge 4.4. Enzim aktivite değerlendirmesi	43

1. GİRİŞ

Keratin, dayanıklı bir materyal olması sebebiyle doğada çok az canlı tarafından parçalanabilmektedir. Bazı böcek, bakteri ve mantar türleri keratini degrade edebilmektedir. Keratinofilik ve keratinolitik olarak adlandırılan bu türlerin keratini parçalıyor olabilmesinin altında fizyolojik ve biyokimyasal sebepler vardır. Dermatofitler; keratine afinite gösteren ve keratinofilik olarak adlandırılan funguslardır. Dermatofitlerin; deri ve tırnak gibi keratin yapılarında oluşturduğu enfeksiyon dermatofitoz olarak adlandırılır. İnsanlarda ve hayvanlarda dermatofitoza sebep olan bu funguslar toprakta da bulunmaktadır (Ergin, 2007).

Dermatofitoz vücutta oluştuğu bölgeye göre “tinea” ön ekiyle adlandırılır. Tinea pedis; ayak, Tinea unguium; tırnak, Tinea corporis; vücut (omuz, kol, bacak), Tinea barbae; sakal, Tinea capitis; baş saçlı derisi ve saç köklerinin dermatofitozunu nitelemektedir (Weitzman ve Summerbell, 1995). Ülkemizde en çok görülen klinik form Tinea pedis, en çok görülen dermatofit ise *Trichophyton rubrum*'dur (Dilek vd., 2009). Dünyanın değişik bölgelerinde coğrafi ve mevsimsel özelliklere bağlı olarak farklı dermatofit florası bulunur ve zamanla bu flora değişkenlik gösterebilir. Türkiye’de yapılan son çalışmalarda dermatofitoz prevalansı % 3,6-34,5 arasında bildirilmektedir (Gürcan, 2007).

Birçok ülkeden topraktaki dermatofit ve keratinofilik florasına ait araştırmalar vardır. Ancak Türkiye’de bu tür çalışmalar yok denecek kadar azdır. Denizli’de arkeolojik çalışma atölyesinden alınan toprak örneklerinden saç tuzağı tekniği ile keratinofilik fungusların izolasyonu yapılmıştır (Ergin vd., 2008). Bu, ülkemizde çevresel keratinofilik fungusların varlığına dair yapılan tek araştırmadır. Çalışmanın sonunda geleneksel yöntemlerle tanılanan türler *Chrysosporium sp.*, *Aphanoascus sp.*, *Auxarthron sp.* ve *Trichophyton rubrum* olarak belirtilmiştir. Bizim yaptığımız çalışma, Türkiye’deki çevresel keratinofiliklerle ilgili veri seti oluşturmaktadır.

Keratinofilik funguslar; insanlarda ve hayvanlarda oluşturdukları enfeksiyonların yanı sıra dericilik-tekstil sektöründe de ekonomik kayıplara sebep olmaktadır. Toprak-hayvan-insan etkileşimli keratinofilik fungusların bu kadar yaygın olmasının sebebi iyi birer enzim üreticisi olmalarından

kaynaklanmaktadır. Virulans faktörü olan bu enzimler endüstriyel anlamda üretilip farklı sektörlerde kullanılmaktadır (Gawad, 1997).

Çalışmamızın amacı keratine afinite gösteren bu fungusların izolasyonu, moleküler tanısı ve enzim potansiyelerinin belirlenmesidir. Toprakta dermatofit izolasyonu için Vanbreuseghem'in saç tuzağı tekniği tercih edilmiştir. Deri ve tırnak gibi bölgelerinde dermatofitoz semptomu gözlemlenen kişilerden sürüntü-kazıntı alınmıştır. Sonuç olarak topraktan ve insanlardan elde edilen fungusların tanısı için ITS (Internal Transcribed Spacer) bölgesi kullanılmıştır. Katı besiyerine substrat eklenerek; proteaz, lipaz, elastaz, fosfolipaz ve keratinaz üretimi açısından aktif olup olmadıkları belirlenmiştir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Dermatofitler; kutanöz mikoza sebep olan filamentli funguslardır. Bu fungusların sebep olduğu enfeksiyonların genel adı dermatomikozdur. Dünya Sağlık Örgütü; dermatomikozun küresel prevalansını % 20 olarak tahmin etmektedir (Achterman ve White, 2012). Patojenik funguslar arasında keratini en iyi parçalayan gruplar arasında yer alan dermatofitler eski çağlardan beri insanların ilgisini çeken bir gruptur. Dermatofitlerle ilgili ilk kayıtlara MÖ 2000-1000 yılları arasında rastlanmaktadır. Samhita adlı Hindu yazıtı ayakta oluşmuş olan bir mantar enfeksiyonundan bahsetmektedir (Yücel, 1999). Yunanlılar ilk kez dermatofit enfeksiyonlarını “herpes” olarak tanımlamışlardır. Romalılar ise lezyonları böceğe benzettiği için “tinea” olarak adlandırmışlardır. Günümüzde Yunan ve Latince kelimelerden oluşan “ringworm” ve “tinea” kullanılmaktadır (Bıyık, 2008). Enfeksiyona neden olan mantarlara dair yazılan ilk kitaplar arasında ise “*Nova Plantarum Genera*” (Micheli, 1729), “*Synopsis Methodica Fungorum*” (Peroson, 1801), “*Historia Naturelle des Vegetaux Parasites*” (Robin, 1847)’ler vardır (Tel, 2005; Ateş, 2007). Gruby, 1841 yılında dermatofitoza neden olan mantarı izole etmiş; patates dilimi üzerinde kültürünü yaptığı mantarı, sağlıklı deriye inoküle ederek hastalık yaptığını kanıtlamıştır. Daha sonra bu mantara *Microsporum audouinii* adını vermiştir. Gruby yaptığı çalışmalarla mikolojinin kurucusu olarak adından söz ettirmektedir. Charles Robin’in 1847 yılında yayınladığı “*Histoire Naturelle des Végétaux Parasites*” kitabı dermatofitlerin topikal tedavisini içeren ilk kitaptır (Bıyık, 2008). Raimond Sabouraud yaptığı 50 yıllık çalışmaları “*Les Teignes*” adlı kitapta toplamıştır. Sabouraud’un yaptığı çalışmalar mikoloji tarihinde dönüm noktası olarak kabul edilmektedir. “*Les Teignes*” dermatofitlerin taksonomisini aydınlatan kitaplardan biri olarak görülmektedir (Kwon–Chung ve Bennet, 1992). Sabouraud, günümüzde hala kullanılan ve kendi adıyla geçen, dermatofitlerin aktif olarak gelişebileceği besiyerini tasarlamıştır (Yücel, 1999).

Sabouraud, dermatofitleri, kültürel ve mikroskopik yapılarını, dermatofitozlu vakaları göz önüne alarak *Achorion*, *Epidermophyton*, *Microsporum* ve *Tricophyton* olarak sınıflandırmıştır (Weitzman vd., 1995). Ajello vd. (1962) dermatofitlerin tanısı için 5 önemli koloni karakteristiği belirlemiştir. Bunlar büyüme oranı, genel topografı (yüzey, kümelenme, düzen ya da düzensizliği), tekstür (maya benzeri, pürüzsüz, tozumsu, granüler, kadifemsi, pamuksu),

yüzey pigmentasyonu ve fungusun arka yüzeyinin pigmentasyonudur. Chester Emmons 1934 yılında dermatofitleri botanik adlandırma kuralları ve taksonomisine göre tekrar sınıflandırdığında, konidyum morfolojisi ve mikroskopik özelliklerine göre *Epidermophyton*, *Microsporum* ve *Trichophyton* olmak üzere üç cins altında toplamıştır.

2012 yılında yayınlanan ve ökaryot sistematliğini güncelleyen “*The Revised Classification of Eukaryotes*” (Adl vd., 2012) isimli çalışmaya göre dermatofitlerin Fungi alemi içerisindeki yeri şöyledir;

Ascomycota

Pezizomycotina

Eurotiomycetes

Eurotiomycetidae

Onygenales

Epidermophyton, *Microsporum* ve *Trichophyton* genuslarına ek olarak telemorf türler *Arthroderma* genusunda sınıflandırılmıştır. Anamorf ve telemorf türler Çizelge 2.1’de verilmiştir.

Funguslarda üreme eşeyli ve eşeysiz olmak üzere ikiye ayrılır. Eşeyli üreme zigospor, askospor, oospor, basidiospor ile gerçekleşir. Eşeysiz spor tipleri; arthrospor, blastospor, chlamydiospor, conidiospor ve sporangiospor (Kaşık, 2010). Dermatofitler, arthrokonidia, mikrokonidia, makrokonidia, nodular organ, pektinat organ, raket ve spiral hif gibi birçok vejetatif yapı sergiler. Hem eşeysiz hem de eşeyli fazı bulunan dermatofitler de vardır. Örneğin aseksüel üreme döneminde *T. mentagrophytes* olarak adlandırılan dermatofit, seksüel döneminde *A. benhamiae* olarak adlandırılmaktadır (Simpanya, 2000).

Çizelge 2.1. Anamorf ve telemorf türler (Weitzman ve Summerbell, 1995)

Teleomorf	Anamorf
<i>Arthroderma</i>	<i>Microsporium, Trichophyton</i>
<i>A. benhamiae</i>	<i>T. mentagrophytes</i>
<i>A. fulvum</i>	<i>M. fulvum</i>
<i>A. gruby</i>	<i>M. vanbreuseghemii</i>
<i>A. gypseum</i>	<i>M. gypseum</i>
<i>A. incurvatum</i>	<i>M. gypseum</i>
<i>A. obtusum</i>	<i>M. nanum</i>
<i>A. otae</i>	<i>M. canis var. canis,</i> <i>M. canis var. distortum</i>
<i>A. persicolor</i>	<i>M. persicolor</i>
<i>A. simi</i>	<i>T. simi</i>
<i>A. racemosum</i>	<i>M. racemosum</i>
<i>A. vanbreuseghemii</i>	<i>T. mentagrophytes</i>

Epidermophyton

Bu cinse ait iki tür bilinmektedir. *E. floccosum* ve *E. stockdaleae* olarak adlandırılan türlerden sadece *E. floccosum* patojeniktir (Weitzman ve Summerbell, 1995). Mikrokonidium üretmezler. Demetler halinde kümelenmiş olan makrokonidiumlar tenis raketi ya da lobut biçimindedir. Makrokonidyumlar 0-9 bölmeli ve 20-60 x 4-13 µm büyüklüğündedir. İnce ya da kalın duvarlı olabilirler. Antropofilik olan *E. floccosum* saçsız deriyi ve tırnağı infekte edebilmektedir. Üreme süresi 10 gündür. Koloni yüzeyi

süetimsi, sarı ve yeşil renkte, taban ise kahverengidir (Hocaoğlu, 2007; Tel, 2005; Simpanya, 2000).

Microsporum

Bu genus hem mikrokonidia hem de makrokonidia üretir. Makrokonidialar; multiseptat, ince ya da kalın duvarlı ve iğ biçimlidir. Bu genusun ayırt edici özelliği hücre duvarının ekinulat (dikenli, pürtüklü) yapıda olmasıdır. Hücre duvarının kalınlığı ve şeklindeki çeşitlenme türlere bağlıdır. Mikrokonidia pyriformdur, 2-3 µm'dir. Bu genus üyeleri arasında 3 ayrı nişten türler vardır (Simpanya, 2000). Üreme süresi 6-10 gündür. Koloni yüzeyi krem-sarı tonlarında, yünsü yapıdadır. Tabanı sarı-kahverengi, turuncu renktedir (Hocaoğlu, 2007).

Çizelge 2.2. *Microsporum*, *Trichophyton*, *Epidermophyton* cinslerinin genel morfolojik özellikleri (Tümbay, 1999).

Cins	Koloni yapısı	Mikrokonidiyum	Makrokonidiyum
<i>Microsporum</i>	Gevşek, yün görünümünde küf kolonileri yapar.	Hifin kenarları boyunca teker teker dizilmiştir. Armut veya lobut şeklindedir. Az sayıda bulunmakla beraber ayırıcı tanıda önemleri yoktur.	Makrokonidiyumları ayırt edici karakterdedir. Mekik formunda olup kalın, tüberkülu geniş hücre duvarlarına sahiptir. Uçları sivridir. Hücre sayısı 1-15 arasında değişir. Büyüklükleri 6-16 x 6-25 µm arasında değişir. Çok sayıda makrokonidiyuma sahiptir.
<i>Trichophyton</i>	Pamuğumsu örgüde küf kolonileri oluşturur. Pigment üretimi tür ayırımında önemlidir.	Genellikle çok sayıda mikrokonidiyum bulunur. Yapısı tür için karakteristiktir. Yuvarlak, armut veya lobut şeklindedir.	Genellikle ince duvarlı olmakla beraber kalın duvarlıda olabilir. Hücre sayısı 1-12 arasında değişir. Genellikle, silindir uçları, bazen fusiform şekildedir. Tek veya demetler halinde olabilir. Büyüklükleri 8-86x 4-14 µm arasındadır. Makrokonidiyumları yok ya da az sayıdadır.
<i>Epidermophyton</i>	Kıvrımlı küf kolonileri yapar. Ortası tümsek, yüzeyi ışımsal olukludur.	Mikrokonidiyum oluşturmaz.	Çok sayıda makrokonidiyuma sahiptir. Makrokonidiyumları düz duvarlı, lobut şeklindedir. İkili üçlü kümeler yapabilir. 1-9 bölmelidir. 20-60x4-13 µm boyundadır. <i>Epidermophyton floccosum</i> cinsin tek patojenidir.

Trichophyton

Duvarları pürüzsüz, makrokonidia ve mikrokonidialar üretirler. Makrokonidialar ince duvarlı ve fuziform, iğ biçimlidir. Mikrokonidia pyriform, 2-3 µm'dir. Bazı türler nadiren makrokonidia üretir. Tek ya da üzüm salkımı şeklinde taşınırlar. Saçlı deri, saçsız deri ve tırnakları infekte edebilmektedirler (Simpanya, 2000). Üreme süresi 7-10 gündür. Koloni yüzeyi beyaz-krem, tüyümsü yapıda olabilir. Koloni tabanı sarı, kırmızı-kahve renktedir. (Tel, 2005; Simpanya, 2000). Dermatofitlerin morfolojik özellikleri Çizelge 2.2'de verilmiştir.

Dermatofitler geofilik, zoofilik ve anthropofilik olmak üzere 3 ekolojik niş ayrılmaktadır (White, 2008). Ekolojik sınıflandırma Çizelge 2.3'de verilmiştir. Dermatofitlerin doğal habitatları olan topraktan hayvan ve insanlara bulaşması, konak spesifitesi geliştirmesi sonucu bu 3 grubun oluşması muhtemeldir (Simpanya, 2000).

Geofilik Dermatofitler

Bu grup topraktaki keratinize substrat üzerinde kolonize olma yeteneğindedir. Bölgedeki keratin kaynağının dağılımına göre yerleşirler (De Vroey, 1984). Dağılımlarını toprak pH'sı da etkilemektedir. Genellikle nötral pH'yı tercih ederler (Böhme ve Ziegler, 1969). Birkaç geofil insanlar ve bazı hayvan türlerinde dermatomikoz'a sebep olmaktadır. Örneğin, *M. nanum*, hayvanlarda özellikle domuzlarda dermatomikoz'a sebep olmaktadır (Connole, 1990). Birçok araştırmacı toprakta dermatofit varlığını araştırmıştır. Kore'de kumsallarda yapılan çalışmada 132 örnekten; 6 tane *M. gypseum* suşu, 1 tane *T. ajelloi* ve 36 tane *Chrysosporium sp.* olmak üzere toplamda 43 suş izole edilmiştir (Lee vd., 2011). Ürdünde yapılan bir çalışmada topraktan *M. gypseum*, *M. cookei*, *T. terrestre*, *M. nanum*, *M. fulvum* gibi geofiliklerin yanı sıra zoofilik bir dermatofit olan *T. mentagrophytes*'te izole edilmiştir (Shaqra vd., 2011). Geofilik olup da patojen olan dermatofitler genellikle *M. gypseum-M.fulvum* kompleksinin üyeleridir. Bu kompleks hayvan ve insanlarda patojendir. Geofilik dermatofitlerden orjinlenen enfektif propagüllerin direkt ya da dolaylı olarak insan ve hayvanlara geçmesiyle oluşan enfeksiyon saprobik-parazitik (S-P) enfeksiyon olarak adlandırılır (De Vroey 1984,1985).

Zoofilik Dermatofitler

Zoofilik dermatofitler genellikle hayvanlarda enfeksiyona neden olan gruptur (White, 2008). İnsanlarda enfeksiyona neden olduğu vakalar da mevcuttur. Özellikle evcil hayvanlardan yayılan infektif partiküllerin eve saçılması, insanların dermatofitoza yakalanmasında en büyük etkidir (Özgür, 2007). Or vd. (1999) tarafından yapılan çalışmada kaşıntı, kızarıklık ve tüy dökülmesi gözlenen kedi ve köpeklerde mikolojik incelemeler sonucunda % 65’inde *M. canis*, % 20’sinde *M. nanum* ve % 15’inde *Candida* türü mantar etkenleri izole edilmiştir. *M. canis* enfeksiyonu saptanan kedinin sahibinin kolunda tek taraflı kırmızı renkte ve kepekli karakterde yaygın kaşıntılı lezyonlar olduğunu gözlemleyen araştırmacılar, bu tür mantarların pet hayvanlarıyla aynı evde yaşayan insanlara bulaşabileceğini bildirmişlerdir. Türkiye’de yapılan başka bir çalışmada kıl dökülmesi ve deride kepeklenme semptomları bulunan atlardan *T. verrucosum* izole edilmiştir. İnfekte atlardan sağlıklı atlara bulaşma olduğu rapor edilmiştir (Sancak vd., 2000).

Antropofilik Dermatofitler

Antropofilik türler insanlarda enfeksiyona neden olurlar. İnsan-insan etkileşimlidir. Ancak bazı türleri ara sıra hayvanları da infekte etmektedir. Okul, kışla, cezaevi ve aile gibi toplu yaşamın olduğu ortamlarda yaygındır. Ortak olarak kullanılan alanlar (banyo, soyunma kabini vs.) bulaşma riskini arttırmaktadır. Enfeksiyon tipi vücutta yerleştikleri bölgeye göre adlandırılır. *Tinea pedis*; ayak, *Tinea corporis*; vücut, *Tinea capitis*; baş, *Tinea unguium* (onkomikoz); tırnak enfeksiyonunu nitelemektedir (White, 2008). Semptomlar yanma, kaşıntı, kızarma ve soyulma şeklindedir. Saçlı deride klinik belirti ve bulguların olmamasına karşılık, dermatofit soyutlanması ise asemptomatik taşıyıcılık (AT) olarak tanımlanır (Gupta ve Summerbell, 2000). *T. rubrum*; *Tinea unguium*, *Tinea capitis* ve *Tinea pedis*’e sebep olmaktadır. Nadiren saç infekte eder, yayılımı globaldir. Bu dermatofit gelişmekte olan ülkelerde ve şehirlerde de yaygındır (Simpunya, 2000). Türkiye’de ilkokul öğrencilerinde *Tinea capitis* olgularının araştırıldığı çalışmada kültür sonucu pozitif olan 7 olgudan izole edilen dermatofitlerin 1 tanesinin *T. violaceum*, 2 tanesinin *M. audouinii*, 2 tanesinin *M. canis*, 2 tanesinin de *T. tonsurans* olduğu belirtilmiştir (Hocaoğlu, 2007).

Çizelge 2.3. Dermatofitlerin ekolojik açıdan sınıflandırılması (Tümbay, 1999; Özkütük, 1999).

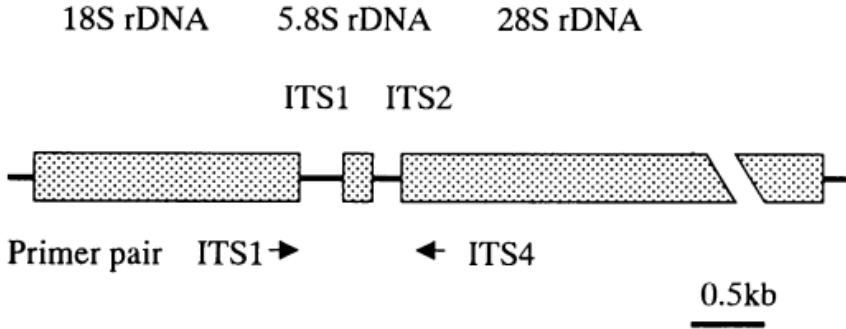
ANTROPOFİLİK	ZOOFİLİK	GEOFİLİK
<i>Epidermophyton floccosum</i>	<i>M. canis var. canis</i>	<i>M. fulvum</i>
<i>Microsporum audouinii</i>	<i>M. canis var. distortum</i>	<i>M. gypseum</i>
<i>Trichophyton concentricum</i>	<i>M. equinum</i>	<i>M. nanum</i>
<i>T. gourvilli</i>	<i>M. gallinea</i>	<i>M. persicolor</i>
<i>T. kanei</i>	<i>T. equinum</i>	<i>M. praecox</i>
<i>M. ferrugineum</i>	<i>T. mentagrophytes var. erinacei</i>	<i>M. racemosum</i>
<i>T. megninii</i>	<i>T. mentagrophytes var.</i>	<i>M.</i>
<i>T. mentagrophytes</i>	<i>mentagrophytes</i>	<i>vanbreuseghemii</i>
<i>var. interdigitale</i>	<i>T. mentagrophytes var.</i>	
<i>T. raubitschekii</i>	<i>quinckeanum</i>	
<i>T. schoenleinii</i>	<i>T. simii</i>	
<i>T. soudnense</i>	<i>T. verrucosum</i>	
<i>T. tonsurans</i>		
<i>T. violaceum</i>		
<i>T. yaoundei</i>		
<i>T. rubrum</i>		

Tanı

Dermatofitleri geleneksel yöntemlerle tanılama; koloninin makroskopik olarak incelenmesine (koloni yüzeyi ve tersinin rengi, büyüme hızı ve yapısı) mikroskopik morfolojisine ve hif biçimlerine dayanmaktadır. Ayrıca besin gereksinimleri (vitaminler ve amino asitler), üreaz üretimi, sorbitol asimilasyonu, patates dekstroza agar ve mısır unlu agarda pigment oluşumu, in vitro saç perforasyonu gibi deneyler uygulanmaktadır (Simpanya, 2000). Fungal hastalıklarının etkenlerinin tanımlanmasında, doğrudan mikroskopik

inceleme ve kültür günümüzde halen kullanılmaktadır. Ancak zaman alıcı olması, zor uygulanabilir ve yorumlanabilir olması nedeniyle, daha hızlı, duyarlılık ve özgüllüğü yüksek yeni tanı yöntemleri geliştirilmektedir (Susever, 2006).

Mikoloji alanında ilk PCR uygulaması 1990 yılında White vd. tarafından fungusların taksonomik ve filogenetik akrabalıklarını göstermek için rRNA'nın direkt dizi analizi ve amplifikasyonu ile yapılmıştır. Yaşayan tüm hücrelerde bulunan rRNA dizileri evölüsyonu tüm genomun evölüsyonunu yansıtmaktadır. Funguslarda nuklear rDNA arka arkaya tekrar eden rDNA alt birimleri şeklindedir. Birinci alt birim küçük nuklear 18S rRNA, 5,8S rRNA ve büyük nuklear 28S rRNA genlerini içermektedir Birinci alt birimde genler ITS1 (internal transcribed spacer) ve ITS2 ile ayrılmıştır ve iki alt birim IGS (intergenic spacer) ile ayrılmıştır. Son rRNA geni (5S) fungal taksona bağlı olarak, tekrarlanmış alt birimler ile birlikte olabilir veya olmayabilir. 18S rDNA nispeten yavaş evrim geçirir ve uzak akraba organizmaların karşılaştırılmasında kullanılmaktadır. Kodlama yapmayan (ITS ve IGS) bölgeler daha hızlı evrim geçirir ve bir genustaki fungal türlerin veya bir türdeki suşların karşılaştırılması için kullanılmaktadır. 28S rDNA'nın bazı bölgeleri türler arasında farklılık göstermektedir. PCR için farklı birkaç dizi olmasına rağmen, rRNA genleri tüm DNA'ları çoğaltabilen yüksek oranda korunmuş bölgeleri ve tür düzeyinde tanımlamayı sağlayan oldukça korunmuş bölgeler içerdikleri için en uygun hedef bölgelerdir. Diğer bir avantajı rRNA genlerinin PCR'ın hassasiyetini artıran yüksek kopya sayısının olmasıdır (Abacı ve Haliki, 2005). Bu yöntemlere gene-specific PCR (Kamiya vd., 2004), PCR-RFLP analizi, PCR fingerprinting (Graser vd., 2000), DNA hibridizasyon (El Fari vd., 1999), kitin sentaz ve rRNA bölgelerinin sekanslanması örnek olarak verilebilir.



Şekil 2.1. ITS ve alt birimler (Mochizuki vd., 2003)

Son yıllarda yapılan çalışmalara bakıldığında ITS bölgelerinin yoğun olarak çalışıldığı görülmektedir. 2009 yılında İran'da yapılan çalışmada 160 tane klinik örnek PCR-RFLP tekniği ile incelenmiştir. ITS-1 (5'TCCGTAGGTGAACCTGCGG) ve ITS-4 (5'TCCTCCGCTTATTGATATGC) primerleri kullanılarak yapılan PCR sonucu elde edilen ampliconlar *MvaI*, *HinfI* ve *HaeIII* restriksiyon enzimleri ile kesilmiştir. Örneklerin % 36,8'i *T. rubrum*, % 30'u *E. floccosum*, % 24,3'ü *T. mentagrophytes*, % 4,3'ü *T. verrucosum* % 3,1'i *T. tonsurans*, % 0,6 *M. canis* olarak tanılanmıştır. *M. canis* *MvaI*, *HinfI* enzimlerinde patern oluşturmazken; *Trichophyton* türleri *HaeIII* enziminde benzer patern oluşturmuştur (Mirzahoseini vd., 2009). Benzer bir çalışmada ise ITS1-ITS4 primerleri kullanılarak çoğaltılan ITS bölgesi *HinfI* ve *MvaI* restriksiyon enzimleri ile kesilmiştir. Çalışma kapsamında *T. tonsurans*'ın iki farklı tipi kaydedilmiştir. Bu iki tip arasındaki sekans homolojisi % 96,56'dır. Restriksiyon profillerine bakıldığında sadece 2 bp'lik bir fark olduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca *T. tonsurans*, *A. vanbreuseghem*, *T. mentagrophytes interdigitale*, *HinfI* profilinde benzer patern oluşturmuş fakat *MvaI* profilinde patern farkı gözlemlenmiştir (Mochizuki vd., 2003). 2008 yılında Taiwan'da yapılan bir çalışmada dermatofitleri tanılamak için ITS1, ITS2 bölgeleri kullanılmıştır. *T. soudanense* için; birinde 122. pozisyondan başlayarak 36 bazlık delesyon olmak üzere 2 farklı genotip bulunmuştur. *M. auodoinu* için 45-47. pozisyonda 3 bazlık bir delesyon dikkat çekmiştir (Chieh Li vd., 2008). Fungusların tanısında kullanılan bir diğer bölge kitin sentaz bölgesidir. Chitin synthase 1(CHS1), chitin synthase 2(CHS2) ve chitin synthase 3 (CHS3) olmak üzere 3 bölgeden oluşmaktadır (Hirai vd., 2003). Kano vd. yaptıkları çalışmada

CHS1 gen bölgesinin sekansının CHS2 ve CHS3'ten daha fazla veri sağladığını bildirmişlerdir. Araştırmacılar klinik izolatların, CHS1 gen bölgesinin kullanarak moleküler taksonomisini yapmış, *M. equinum* ve *T. equinum*'un sekanslarını karşılaştırarak genetik ilişkilerini incelemiştir (Kano vd., 2001).

Mochizuki vd, tanılama için RAPD (random amplification of polymorphic DNA) Tercih ettikleri çalışmada 5 farklı primer (OPE-01, OPE-02, OPE-04, RC08, R28) kullanmışlardır. *T. mentagrophytes* var. *interdigitale* suşlarının R28 bant profilinde varyasyon olduğunu kaydeden araştırmacılar, OPE-02 primerinin bant profillerinin sağlıklı olmadığını bildirmişlerdir. Optimum PCR koşulları ve uygun primerler kullanıldığında RAPD'in dermatofitleri tanılamakta kullanılabilir bir yöntem olduğunu rapor etmişlerdir (Mochizuki vd., 1997). Başka bir çalışmada 28S rRNA gen bölgesini kullanan araştırmacılar sekans sonuçlarını referans suşlarla karşılaştırmışlardır. *T. mentagrophytes* izolatlarının bazı pozisyonlarında transisyon, transversiyon ve delesyon gözlemlemişlerdir (Ninet vd., 2003). Kamiya vd. (2004) DNA topoizomeraz gen bölgesinin dermatofitleri tanılama için elverişli olduğunu bildirmişlerdir.

Süperfizyal mikoz dünya popülasyonunun % 20 - 25'ini etkilediği düşünülen oldukça yaygın bir olgudur. En büyük etkeni dermatofitlerdir. Epidemiyolojisini; yaşam tarzı, sosyo-ekonomik koşullar ve göç etkilemektedir. *T. soudanense*, *T. violaceum* ve *M. audouinii* gibi Asya ve Afrika endemiği dermatofitlerin Avrupa ve Kuzey Amerika'daki frekansları göç sonucu artmıştır (Ameen, 2010). 1960'lı yıllarda Tunus'taki *Tinea capitis* olgularında *T. violaceum* % 75, *M. canis* ise % 2,1 iken, 2005 yılında *T. violaceum* % 42, *M. canis* ise % 52,5 civarındadır. Araştırmacılar zoofilik olan *M. canis*'in insan enfeksiyonlarındaki artışına sebep olarak evcil hayvanların (özellikle kedilerin) bu dermatofiti asemptomatik olarak taşımaya başlamışlardır (Ameen, 2010).

İstanbul'da ilköğretim öğrencilerinde *Tinea capitis* olgusunu inceleyen araştırmacılar etken olarak *M. canis* izole etmişlerdir (Hapçioğlu vd., 2003). Türkiye'de yapılan başka bir araştırma da *Tinea capitis* etkeni olarak *Trichophyton verrucosum*, *T. rubrum*, *T. mentagrophytes* var. *mentagrophytes*, *Microsporum canis* ve *T. tonsurans* izole edilmiştir (Altındış vd., 2003). Dermatofitozun prevalansının artmasına rağmen dermatofitlerin patojenitesine

dair az şey bilinmektedir. Bu mekanizma tam olarak aydınlatılmamıştır (Grumbt vd., 2011).

Patogenez

Keratin, vertebratların epitelyum hücrelerinden oluşan özelleşmiş bir proteindir (Blyskal, 2009). Saç, tırnak, boynuz gibi kalınlaşmış epitelyum tabakasının ana ögesidir. Toprakta bol miktarda bulunan keratinin kaynağı ölü hayvanların kürk, pençe, boynuz gibi yapılarıdır. Keratinin dayanıklılığı yapısında bulunan sistin ve disülfid bağlarından kaynaklanmaktadır (Asquith, 1977; Balazsy ve Eastop, 1998). Saç, tüy ya da herhangi bir keratin kaynağı yağ ve elastin gibi keratin olmayan yapılar da içermektedir (Sharma ve Rajak, 2003).

Keratinofilik funguslar; keratin yapılar üzerine yerleşebilen, burada kolonize olabilen ve keratini bileşenlerine parçalayabilen bir gruptur. *Chrysosporium*, *Aspergillus*, *Alternaria*, *Trichurus*, *Curvularia*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Geomyces*, *Gleomastis*, *Monodictys*, *Myrothecium*, *Paecilomyces*, *Stachybotrys*, *Urocladium*, *Scopulariopsis*, *Sepedonium*, *Penicillium*, *Doratomyces* cinslerinde bazı türler keratinofiliktir (Gupta ve Rammani, 2006). Keratinofilik funguslar keratini karbon ve azot kaynağı olarak kullanmaktadır. *Ascomycota* ve *Deuteromycota* phylumuna mensup olan keratinofilik funguslar dermatofitleri de kapsamaktadırlar. Bu funguslar keratinize materyalleri dekompoze etmek üzere özelleşmişlerdir (Sharma ve Rajak, 2003).

Keratin materyalin tabaka yapısı ve fizyolojik dayanıklılığı ‘‘yüzeyel misel’’ gelişimine sebep olmaktadır. Yüzeyel miseller yapı üzerinde delikler açarlar ve tutunurlar. Tüm funguslar keratin benzeri yapılar üzerinde yüzeyel misel üretebilirler. Bu form fungusların komplike yapılar üzerine tutunabilmesi için gereklidir. Yüzeyel miselin ana fonksiyonu nutrient absorpsiyonudur. Sadece bazı funguslar sert keratin materyale penetre olabilirler. Yani bunun anlamı miseller basınç oluşturarak yüzeye penetre olabilirler ancak parçalayamazlar, mekanik bir rol üstlenirler (Blyskal, 2009). Keratinofilik funguslar bir yüzeye delici hif ya da özelleşmemiş bir misel ile tutunurlar. Keratinolitik funguslar ise yüzeye tutunduktan sonra aşındırıp organı delmeye başlarlar. Keratinofilik ve keratinolitikler için çok benzer olan bu aşamalar aslında farklıdır. Keratinofiliklerde bir istila, tutunma söz konusuken keratinolitiklerde yüzey erozyonu ve organ perforasyonu söz konusudur (Vanbreuseghem, 1952).

Keratin dekompozisyon sürecinin aydınlatılmasında mikroorganizmaların keratin materyal üzerindeki hifsel penetrasyonun analizi önemli bir yerdedir. Keratin materyalin istilasında iki ana bölüm vardır; yüzey erozyonu ve radial penetrasyon. Yüzey erozyonunda, dıştan içe doğru yıkım başlar ve kütikula bozulmaya başlar. Radial penetrasyon ise hiflerin dikey bir şekilde penetrasyona devam etmesidir. Bir fungus yüzey erozyonu ve radial penetrasyon aşamalarını gerçekleştirebiliyorsa keratini parçalayabiliyor demektir yani keratinolitikdir (Marchisio vd.,1994; Marchisio, 2000).

Keratin biodegradasyonu; deaminasyon, sülfitolizis, ve proteolizis olmak üzere 3 basamaklıdır. Keratinolizis olarak adlandırılan bu sürecin anahtar reaksiyonu sülfitolizisdir (Kunert 1972, 1992, 2000). Mikroorganizma keratin materyal üzerine yerleştğinde ilk olarak non-keratin materyali -membran materyali, nükleik kalıntılar, sitoplazmik artıklar, lipidler- kullanır (Al Musallam ve Radwan, 1990). Bu bileşenleri kullandıktan sonra keratini kullanmaya başlar. Kalınlaşmış epidermin non-keratin materyalini birçok fungusun kullanmasına rağmen tamamen parçalanma işlemini özelleşmiş organizmalar yapabilmektedir (Dix ve Webster, 1995; Jennings, 1995).

Bir materyalin biobozunumunu birçok faktör etkiler. Bunlar enzim, asit, pigment gibi mikrobiyal metabolitler, materyalin kimyasal yapısı örneğin boya içerip içermemesi, mikroorganizmanın giriş yeteneği, ortamın nemi, sıcaklığı, ışığı, materyalin yaşı ve durumu gibi faktörlerdir. Şartlara bağlı olarak materyalin yüzeyinde renk değişikliği, orijinal görüntüsünde tahrip, karakteristik küf kokusu, yapısal dekompozisyon, mikrobiyal aktivitede artış ve materyal kaybı meydana gelir (Blyskal, 2009).

Çerikoğlu yaptığı derlemede (2012) virülans faktörlerini, mikroorganizmaların konak savunma sistemleri tarafından elimine edilmelerini önlemek üzere oluşturulan mikrobiyal ürünler olarak tanımlamıştır. “Kolonizasyonu başlatan/ilerleten” ve “konağa zarar veren” ürünler olarak sınıflanan bu faktörlerden bazıları; adezinler, proteazlar, süperoksit dismutaz, fosfolipaz, pigmentler, üreaz, katalaz, toksinler, mannitol, kapsül, hücre duvarı bileşenleri şeklinde sıralanmıştır. Fosfolipaz ve proteazların, insan hücre membranında bulunan gliserofosfolipidlerin ester bağlarını hidrolize edip, epitel hücrelerine tutunmada ve invazyonda önemli rol oynadıkları belirtilmiştir. Birçok

araştırmacı, dermatofitlerin saçı ve deriyi istila etmede enzimlerin etkisi olduğunu bildirmiştir.

Dermatofit ve dermatofit olmayan turlerin lipaz, fosfolipaz, keratinaz, proteaz ve elastaz açısından değerlendirildiği çalışmada dermatofitlerin diğer türlere göre daha yüksek keratinaz aktivitesi gösterdiği bildirilmiştir. Elastaz'ın deri infeksiyonlara neden olan dermatofitler tarafından üretildiği rapor edilmiştir (Muhsin vd, 1997). Keratinaz, lipaz, proteaz, amilaz enzimleri açısından, 16 adet fungus türünün incelendiği başka bir çalışmada dermatofitik ve nondermatofitik türlerde keratinaz aktivitesi saptanmıştır. Ancak *Trichophyton mentagrophytes* var. *erinacei* ve *Microsporum gypseum* yüksek aktivite göstermiştir. Non-dermatofitlerin proteaz ve lipaz aktivitelerinin dermatofitlerden daha yüksek olduğu kaydedilmiştir (Tawfik vd, 2000). Dermatofitlerin patogenezinin moleküler düzeyine dair çalışmalar çok azdır. Preuett vd. (2010) yaptıkları çalışmada *T. tonsurans* ve *T. equinum*'un proteolitik ve lipolitik salgı genlerinin transkripsiyon seviyesini karşılaştırmışlar, 10 gen ailesinden 31 genin incelendiği araştırmada kantitatif RT-PCR tekniğini kullanmışlardır. *T. tonsurans* ve *T. equinum*'un gen ekspresyon seviyelerinde farklılık (1,1-33 kat arasında değişen) bulunduğunu bildirmişlerdir. *M. canis*'in in vivo ve in vitro ortamdaki MEP (metalloproteaz) genlerinin karşılaştırıldığında enfeksiyon sürecinde MEP1 ve MEP2 enzimlerinin üretildiği kanıtlanmıştır (Brouta, 2002). Yaklaşık son 10 yıldır dermatofitlerin patojenitesini moleküler olarak inceleyen araştırmacılar enzimlerin patojenitedeki rolünü kanıtlamışlardır. Bu çalışmalara ek olarak Burmester vd., 2011, Zaugg vd., 2009, Descamps vd., 2002, Staib vd., 2010 incelenebilir.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. MATERYAL

3.1.1. Toprak Örnekleri

Dermatofitlerin izolasyonu için arazi çalışması kapsamında 7 farklı lokaliteden toplamda 50 toprak örneği alınmıştır. Topraklar alınırken keratin kaynağının fazla olduğu olası yerler, tavuk, ördek, kaz gibi hayvanların, kümes ve barınaklarının bulunduğu bölgeler tercih edilmiştir. Örnek alınan bölgeler Çizelge 3.1’de listelenmiştir.

Çizelge 3.1. Toprak örneklerinin alındığı lokaliteler

İl	Lokalise Adı	Alınan Örnek Sayısı
Aydın	Germencik/ Kızılcapınar	18
Aydın	Germencik/ Mursallı	4
Aydın	Mursallı/ Dağkaraağaç	9
Aydın	Mursallı /Dedeçoban	4
Aydın	İncirliova/ Erbeyli	4
Aydın	İncirliova /Akçeşme	1
Tekirdağ	Hayrabolu /Kemaller	10
		Toplam: 50

Her bir toprak örneği steril poşetler içine alınmış, poşetlerin ağzı kapatılmıştır. Yaklaşık 7 saat içinde laboratuara getirilen örnekler +4°C’de bir gece muhafaza edilmiştir. Vanbreseughem’in (1952) ‘saç tuzağı tekniği’ kapsamında 50 toprak örneğinin her biri ayrı ayrı steril petri içine alınmıştır. Keratin kaynağı olarak kullanılan doğal saçlar 1-2 cm’lik parçalar halinde kesilip, 121 °C’de 10 dk. otoklavlanarak steril edilmiştir. Steril saç parçaları petrideki toprakların yüzeyine orantılı bir şekilde yerleştirilmiştir. Steril su ile nemlendirilen topraklar 25 °C’de inkübasyona bırakılmıştır.

3.1.2. İnsanlardan Alınan Örnekler

Deri ya da tırnakta; kaşıntı, kızarma, soyulma, renk değişikliği ve saç-sakal dökülmesi gibi semptomların olduğu 20 gönüllüden steril lansetler ile steril petri içine sürüntü alınmıştır. Semptomların olduğu bölgeye göre alınan örnekler Çizelge 3.2’de belirtilmiştir.

Çizelge 3.2. İnsanlardan alınan örnekler

Örnek Alınan Bölge	Semptom	Cinsiyet	Yaş	Şehir
Ayak tırnağı	Renk değişikliği, kalınlaşma	Kadın	55	Manisa
El tırnağı	Dökülme, soyulma	Kadın	25	Tekirdağ
Ayak tırnağı	Dökülme, soyulma	Kadın	51	Tekirdağ
El tırnağı	Renk değişikliği	Kadın	55	Aydın
Ayak tırnağı	Tırnak yüzeyinde çatlama	Kadın	57	Tekirdağ
Ayak tırnağı	Renk değişikliği	Kadın	60	Aydın
Yüz sakal bölgesi	Sakallarda dökülme	Erkek	30	Aydın
Ayak tırnağı	Kalınlaşma, soyulma	Kadın	52	Tekirdağ
Ayak tırnağı	Dökülme, soyulma	Kadın	33	Aydın
Ayak parmak arası	Kaşıntı, dökülme	Erkek	21	Aydın
Ayak tırnağı	Kalınlaşma	Kadın	36	Aydın
Ayak tırnağı	Renk değişikliği	Kadın	24	Aydın
Ayak parmak arası	Kaşıntı	Erkek	28	Diyarbakır
Dirsek	Kızarma, dökülme	Kadın	52	Ankara
Diz kapağı	Kızarma, dökülme	Kadın	63	Ankara
Ayak tırnağı	Dökülme	Kadın	25	Diyarbakır
Ayak tırnağı	Renk değişikliği	Kadın	29	Aydın
El tırnağı	Tırnak kenarlarında kaşıntı, kızarıklık	Kadın	21	Aydın
Ayak parmak arası	Kaşıntı	Erkek	35	Diyarbakır
El parmakları	Kızarıklık, dökülme	Erkek	23	Diyarbakır

3.1.3. Kullanılan Besiyerleri ve Çözeltiler

Sabouraud Dextrose Agar (Conda Pronadisa)

5 g/L	Kazeinin Pankreatik Dijesti
5 g/L	Hayvan Dokularının Peptik Dijesti
40 g/L	Dekstroz
15,0 g/L	Agar

Sikloheksimit ve Kloramfenikol içeren Sabouraud Dextrose Agar

SDA içerisine 0,04 g/L kloramfenikol, 0,5 g/L sikloheksimit (sigma) eklenerek hazırlanmıştır.

Tryptic Soy Agar (Fluka)

15 g/L	pankreatik kazein pepton
5 g/L	sodyum klorid
5 g/L	soya pepton
15 g/L	Agar

Elastase Screening Agar (ESA)

0,2 g	Elastin
0,01 g	Yeast Extract
0,5 g	Triton-X 100 /sigma
1,5 g	Agar

100 ml distile su içerisinde çözülüp, pH 8'e ayarlandıktan sonra 121 °C'de 15 dk. otoklavlanmıştır (Frosco vd., 1992). Besiyeri içeriğine elastin eklenmeden hazırlanan besiyeri; ESA-K, kontrol grubu için kullanılmıştır.

Lipase Screening Agar (LSA)

1 g	Pepton
0,5 g	NaCl
0,01 g	CaCl ₂ .H ₂ O
2 g	Agar
1 ml	Tween 20

Tween 20 dışındaki kimyasallar 100 ml distile su içinde çözülüp, pH 5,5'e ayarlanmıştır. Besiyeri ve tween 20 ayrı olarak 121 °C'de 15 dk. steril edilmiştir. Otoklavdan çıktıktan sonra tween 20 temel besiyeri içine eklenmiştir (Muhsin vd., 1997). Tween 20 eklenmeden hazırlanan besiyeri; LSA-K, kontrol grubu için kullanılmıştır.

Phospholipase Screening Agar (PhSA)

13 g SDA

11,7 g NaCl

0,111 g CaCl₂

184 ml distile suda çözülmüş ve 121 °C'de 15 dk. otoklavlanmıştır. Substrat olarak yumurta sarısı kullanılmıştır. 5000 g'de 30 dk. santrifüjlenen yumurta sarısının süpernatant kısmından 20 ml besiyerine eklenmiştir (Sharon vd., 1997). Substrat eklenmeden hazırlanan besiyeri; PhSA-K, kontrol grubu için kullanılmıştır.

Protease Screening Agar (PSA)

0,1 g K₂HPO₄0,05 g MgSO₄.7H₂O

0,05 g KCl

1,6 g Agar

100 ml distile su içinde içinde çözülmüş ve 121 °C'de 15 dk. otoklavlanmıştır. 60 °C'ye kadar soğutulan besiyerine son konsantrasyon %4,8 olacak şekilde skim milk eklenmiş ve karıştırılmıştır. Skim milk eklenmeden hazırlanan besiyeri; PSA-K, kontrol grubu için kullanılmıştır (Topal vd., 2000).

Keratinaz Screening Agar (KSA)

1,5 g/L	K ₂ HPO ₄
0,05 g /L	MgSO ₄ .7H ₂ O
0,025 g/L	CaCl ₂
0,015 g/L	FeSO ₄ .7H ₂ O
0,005 g/L	ZnSO ₄ .7H ₂ O
% 2	Agar

Keratin Solüsyonunun Hazırlanışı

10 g beyaz tavuk tüyü, 500 ml dimetilsülfoksit (DMSO) içerisine alınmıştır. 100 °C'de 2 saat geri soğutucuda bekletilmiştir. Bu süre sonunda tüyler atılmıştır. DMSO içerisinde çözünen keratini çöktürmek için sıvı üzerine 1 L soğuk aseton dökülmüştür. Karışım 2 saat -70 °C'de bekletilmiştir. Ardından 10.000 g'de 10 dk santrifüj yapıp keratinin çökmesi sağlanmıştır. Elde edilen keratin 2 kez distile su ile yıkandıktan sonra 40 °C vakumlu kurutucuda kurutulmuştur. Keratinin çözünmesi için üre tamponu hazırlanmıştır (Anbu vd., 2008)

Üre Tamponu İçeriği

8 M	Üre
50 mM	Tris
0,1 M	β -mercaptoetanol
% 0,1	sodyum azid

48,048 g üre, 0,6055 g Tris, 705 μ l β -mercaptoetanol, 0,1 g sodyum azid 100 ml distile su içinde çözüldükten sonra pH 8,4'e ayarlanmıştır. Bu tampon Sigma'daki keratin solüsyonun formülü temel alınarak hazırlanmıştır. Keratin bu solüsyon içerisinde çözüldükten sonra temel besiyeri içindeki konsantrasyonu 500 mg/L olacak şekilde ilave edilmiştir. Keratin solüsyonu otoklavlanmamıştır. Keratin eklenmeden hazırlanan besiyeri; KSA-K, kontrol grubu için kullanılmıştır. Keratinin çözünmesi için kullanılan üre tamponu KSA-K besiyerine eklenmiştir.

CBB G250 Çözeltisi

100 mg	Coomassie Brilliant Blue G250
50 ml	%95'lik etil alkol
100 ml	%85'lik fosforik asit

Çözelti distile su ile 1 L'ye tamamlandıktan sonra filtre kağıdından süzülmüştür. KSA'da zon çapını daha iyi görmek için boyama işleminde kullanılmıştır.

5X TBE Tamponu

54 g/L	Tris-baz (Sigma)
27,5 g/L	Borik asit (Riedel-de Haën)
3,72 g/L	EDTA.2H ₂ O (Sigma)

pH 8.1-8.3'e ayarlanmıştır. 5 kat seyreltilerek 1X TBE tamponu hazırlanmıştır.

% 1,5' luk Agaroz Jel (Sigma)

1,5 g agaroz üzerine 100 mL 1X TBE tamponu eklenmiş ve mikrodalga fırında ısıtılarak homojen hale getirilmiştir. Soğutulduktan sonra 5 µL SafeView™ Classic (Applied Biological Materials, Inc.) eklenerek elektroforez tankına dökülmüştür.

6X Yükleme Tamponu

% 0,015	Bromfenol Mavisi
% 0,015	Xylene Cyanol FF
% 30	Gliserol

0,015 g Bromfenol Mavisi ve 0,015 g Xylene Cyanol FF tartılarak üzerine 30 mL gliserol eklenmiş, steril distile su ile 100 mL' ye tamamlanmıştır.

Sodyum-Tris-Edta (STE) Tamponu

0,1 M	NaCl
0,001 M	EDTA
1 M	Tris

Proteinaz K

25 mg proteinaz K 1 ml distile su içerisinde çözdürülmüştür.

SDS (Sodyum Dodesil Sülfat)

10 g SDS 100 ml distile su içerisinde çözdürülmüştür.

3.2. YÖNTEM

Saç tuzakları inkübasyonun ilk bir haftasından sonra binoküler mikroskop ile her gün gözlemlenmiştir. 15. günden sonra saç üzerinde fungus üremesi başlamıştır. Binokülerde 50 toprak örneğinin hepsi ayrı ayrı incelenmiştir. Fungus tarafından tutulan saçlar sikloheksimid ve kloramfenikol içeren SDA'ya alınmıştır. Toprakta saprofitik küf ve bakteri kontaminasyonunu engellemek amacıyla antibiyotikli ve sikloheksimidli agar tercih edilmiştir. Saçlar agar yüzeyine bırakıldıktan sonra öze yardımıyla bastırılarak agara bir miktar gömülmesi sağlanmıştır. Petriye alınan saçlar 25 °C'de inkübasyona bırakılmıştır. Yaklaşık 2 hafta süreden sonra üreyen funguslar saflaştırma yapmak için SDA'ya tekrar ekilmiştir. Saflaştırılan funguslar kreyotüplere yatkın olarak hazırlanan SDA'ya ekilmiş, 20-25 günlük inkübasyonun ardından üzerlerine mineral yağ eklenmiştir. Hazırlanan stoklar +4 °C'de saklanmıştır.

20 gönüllüden alınan sürüntü örnekleri, izolasyonun ilk basamağında sikloheksimid ve kloramfenikol içeren SDA'ya ekilmiştir. Fungus üremesi gözlemlenen örneklerden saflaştırma yapılmıştır. Saflaştırılan funguslar yatkın SDA'ya ekilmiş, 20-25 günlük inkübasyonun ardından üzerlerine mineral yağ eklenmiştir. Hazırlanan stoklar +4 °C'de saklanmıştır.

3.2.1. Elde Edilen Funguslardan Genomik DNA İzolasyonu

DNA izolasyonu için taze kültürler kullanılmıştır. Agar yüzeyindeki misellerden steril bistüri yardımı ile yaklaşık 1 cm²'lik alan kesilmiştir. Miseller steril eppendorf içine alınmıştır. – 20 °C'de bir saat bekletilen miseller 55 °C'lik su banyosunda 15-20 dk bekletilerek çözdürülmüştür. Dondurma-çözdürme işlemi en az 2 kez tekrarlanmıştır. En son – 20 °C'de dondurulan miseller steril pestle yardımı ile ezilmiştir. Misellerin üzerine 600 µl STE, 25 µl proteinaz k (25 mg/ml) ve 75 µl SDS (%10) eklenerek 2 saat 55 °C'lik su banyosunda inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sona erdikten sonra tüplere v/v fenol-kloroform izoamil alkol eklenmiş ve 5 dk alt üst edilmiştir. 13.200 rpm'de 5 dk santrifüjlenen örneklerin üst fazı steril eppendorf içine alınmıştır. Örnekler 1 ml % 96'lık etanol eklenerek 2-3 kez alt üst edilmiştir. 20 dk -20 °C'de bekletilen örnekler 13.200 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir. 37 °C'lik etüvde bekletilip etanol uzaklaştırılmıştır. Son olarak eppendorflara 100 µl steril distile su eklenerek bir gece 37 °C'lik etüvde bekletilmiştir.

3.2.2. Toplam Genomik DNA' nın Kantitatif ve Kalitatif Tayini

İzole edilen DNA örneklerinin kantitatif tayini Nanodrop Spektrofotometre (Thermo) kullanılarak belirlenmiştir. Cihazın çalışma prensibine göre distile su kör olarak kullanılmış ve 1 µl DNA ile absorbans ölçülmüştür. Aşağıdaki formül kullanılarak DNA örneklerinin konsantrasyonları hesaplanmıştır.

$$C_{DNA} = OD_{260\text{ nm}} \times SK \times 50$$

OD - Optik Dansite (260 nm'de okunan absorbans değeri).

SK - Sulandırma katsayısı.

50 - 260 nm'de 1 optik dansitenin içerdiği DNA miktarı

Kalitatif tayin için A260 nm ve A280 nm'de ki absorbans değerleri esas alınmıştır. A260/A280 değeri 1,5-1,8 arasında olan DNA'lar kullanılmıştır. DNA'ların son konsantrasyonu 100 µl'de 100 ng olacak şekilde ayarlanmıştır.

3.2.3. İzole Edilen Fungusların Moleküler Tanılanması

Tanılama işlemi için internal transcribed spacer (ITS) , PCR ile çoğaltılmıştır. Kullanılan PCR karışımı Çizelge 3.3.'de verilmiştir. Primer olarak ITS 1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') ITS 4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATG-3') tercih edilmiştir. PCR koşulları; 94 °C'de 3 dk ön denaturasyon sonrasında, 35 döngülük 94 °C'de 1 dakika denaturasyon, 60 °C'de 1 dakika primer bağlanma, 72 °C'de 1 dakika uzamayı içermektedir. Son adım 72 °C'de 5 dakikalık final uzamayı içermektedir.

Çizelge 3.3. ITS bölgesini çoğaltmak için kullanılan PCR karışımı

Reaktifler (konsantrasyon)	Hacim
PCR buffer 10X	5 µl
MgCl ₂ (25 mM)	4 µl
dNTP (10 mM)	1 µl
Primer R (10 p/Mol)	2 µl
Primer F (10 p/Mol)	2 µl
Taq Polimeraz (5U/µl)	0,4 µl
DNA (100 ng/µl)	1 µl
Distile su	34,6 µl
Toplam hacim	50 µl

PCR ürünlerinden 3 µl, yükleme tamponundan da 3 µl alınarak % 5 safe view içeren % 1,5'lük agaroz jele yüklenmiştir. DNA büyüklük standardı; 1 kb'lık (Fermentas GeneRuler™) kullanılmıştır. Jel elektroforezi 75 V, 45 dk yapılmıştır. PCR ürünleri sekans için Macrogen (Güney Kore) firmasına gönderilmiştir. Sekans her örnek için revers ve forward olarak yapılmıştır. Öncelikle Clustal W programı kullanılarak hizalanmış, ardından BLAST programı kullanılarak tanısı yapılmıştır.

3.2.4.Katı Besiyerinde Enzim Görüntüleme

Fungus türlerinin tanısı yapıldıktan sonra keratinofilik ve dermatofitleri içeren 25 izolat; elastaz, lipaz, fosfolipaz, keratinaz ve proteaz açısından taranmıştır. Elastaz varlığını saptamak için hazırlanan ESA besiyerine substrat olarak elastin tozu eklenmiştir. Temel besiyeri içeriğine elastin tozu eklenmeksizin hazırlanan ESA-K besiyeri kontrol grubu için kullanılmıştır. Lipaz varlığını görüntülemek için tween 20, keratinaz varlığını görüntülemek için keratin tozu, fosfolipaz için yumurta sarısı, proteaz için skim milk substrat olarak kullanılmıştır. Her enzim taramasında substrat eklenmeden sadece temel besiyeri içeriğiyle hazırlanan ortamlar kontrol grubu için kullanılmıştır. Besiyerleri hazırlandıktan sonra inokülasyon yapılmış ve 25 °C'de 20 gün boyunca inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda fungusların çapı ve zon çapı ölçülmüştür. KSA zon görüntülemek için elverişli olmadığından CBB çözeltisi ile boyanmıştır.

4. BULGULAR/TARTIŞMA

4.1. İzole Edilen Fungusların Moleküler Tanı Sonuçları

Toplamda 50 toprak örneği kullanılarak hazırlanan saç tuzaklarından 40 tanesinde üreme olmuş (Şekil 4.1.) ancak 10 tanesinde üreme olmamıştır. Üremenin olduğu 8 tane saç tuzağının kültürü yapılamamıştır. Sonuç olarak 41 izolat elde edilmiştir. 20 gönüllüden alınan örneklerin 7 tanesi pozitif çıkmıştır. Bu 7 türün kültürü ve tanısı yapılmıştır (Çizelge 4.1). Çalışma kapsamında elde edilen 48 adet fungus ADÜ Biyoloji Bölümü Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda +4°'te muhafaza edilmektedir.

Çizelge 4.1. İzole edilen fungusların moleküler tanı sonuçları

Kaynak	İzolat no	Analiz sonucu	Karşılaştırılan baz sayısı	Benzerlik
Toprak	1a	<i>Debaryomyces vanriijiae</i>	511	%99
Toprak	2a	<i>Aphanoascus terreus</i>	558	%99
Toprak	2b	<i>Geotrichum sp</i>	349	% 100
Toprak	2c	<i>Debaryomyces vanriijiae var. vanriijiae</i>	611	%99
Toprak	3a	<i>Lecanicillium fusisporum</i>	588	%99
Toprak	3c	<i>Hypocreaceae sp</i>	561	% 100
Toprak	4	<i>Galactomyces geotrichum</i>	346	%99
Toprak	5	<i>Pseudallescheria boydii</i>	588	% 100
Toprak	6	<i>Galactomyces geotrichum</i>	363	%99
Toprak	7	<i>Paecilomyces lilacinus</i>	524	% 100
Toprak	9	<i>Microsporium gypseum</i>	517	%99
Toprak	10	<i>Microsporium gypseum</i>	608	%99
Toprak	11b	<i>Galactomyces geotrichum</i>	300	%99
Toprak	12	<i>Galactomyces geotrichum</i>	366	%99
Toprak	15a	<i>Geotrichum sp</i>	350	% 100
Toprak	16	<i>Chrysosporium keratinophilum</i>	581	% 99
Toprak	18	<i>Chrysosporium keratinophilum</i>	583	%99
Toprak	19a	<i>Debaryomyces vanriijiae var. vanriijiae</i>	611	%99
Toprak	19c	<i>Penicillium citrinum</i>	522	% 100
Toprak	22	<i>Scedosporium aurantiacum</i>	591	% 100
Toprak	23	<i>Chrysosporium keratinophilum</i>	582	% 100
Toprak	24	<i>Chrysosporium keratinophilum</i>	580	%99
Toprak	30b1	<i>Galactomyces geotrichum</i>	348	%98
Toprak	30b2	<i>Debaryomyces vanriijiae var. vanriijiae</i>	608	% 99
Toprak	30b3	<i>Paecilomyces lilacinus</i>	517	% 100
Toprak	31	<i>Chrysosporium keratinophilum</i>	764	%96
Toprak	32	<i>Galactomyces geotrichum</i>	345	%99
Toprak	34a	<i>Lecanicillium fusisporum</i>	534	%99
Toprak	34b	<i>Purpureocillium lilacinum</i>	385	% 100
Toprak	36a	<i>Uncinocarpus reesii</i>	593	% 100
Toprak	36b	<i>Debaryomyces vanriijiae</i>	573	%99
Toprak	38	<i>Chrysosporium keratinophilum</i>	577	%99
Toprak	40a	<i>Arthroderma fulvum</i>	583	%99

Çizelge 4.1. İzole edilen fungusların moleküler tanı sonuçları (Devamı)

Toprak	40b	<i>Arthroderma fulvum</i>	595	%99
Toprak	40c	<i>Arthroderma fulvum</i>	624	%100
Toprak	41	<i>Arthroderma fulvum</i>	654	%99
Toprak	43	<i>Chrysosporium articulatum</i>	576	%100
Toprak	46	<i>Arthroderma fulvum</i>	594	%99
Toprak	47	<i>Arthroderma fulvum</i>	587	%99
Toprak	49	<i>Arthroderma fulvum</i>	628	%99
Toprak	50	<i>Aphanoascus terreus</i>	516	%100
İnsan	51	<i>Debaryomyces vanriijiae</i> var. <i>vanriijiae</i>	608	%99
İnsan	52	<i>Beauveria (pseudo)bassiana</i>	541	%100
İnsan	53	<i>Debaryomyces vanriijiae</i> var. <i>vanriijiae</i>	600	%99
İnsan	56	<i>Debaryomyces vanriijiae</i> var. <i>vanriijiae</i>	607	%99
İnsan	57	<i>Paecilomyces lilacinus</i>	517	%100
İnsan	61	<i>Trichophyton rubrum</i>	665	%99
İnsan	63	<i>Trichophyton rubrum</i>	660	%100

Çizelge 4.1'e bakıldığında izole edilen fungusların yüzdeleri; % 16,7 *Debaryomyces*, % 14,5 *Chrysosporium*, %14,5 *Arthroderma*, % 12,5 *Galactomyces*, % 6,25 *Paecilomyces*, % 4,1 *Trichophyton*, % 4,1 *Microsporum*, %4,1 *Aphanoascus*, % 4,1 *Geotrichum*, % 4,1 *Lecanicillium*, % 2 *Beauveria*, % 2 *Penicillium*, % 2 *Scedesporium*, % 2 *Purpureocillium*, % 2 *Uncinocarpus*, % 2 *Acremonium*, % 2 *Pseudallescheria* şeklindedir. Elde edilen fungusların % 23'ü dermatofittir. 48 izolattan ; 7 adet *A. fulvum*, 2 adet *M. gypseum*, 2 adet *T. rubrum* olmak üzere 11 adet dermatofit elde edilmiştir.

İzole edilen fungusların klasik taksonomisi (indexfungorum)

Fungi, Ascomycota, Saccharomycotina, Saccharomycetes, Saccharomycetidae, Saccharomycetales, Debaryomyces vanriijiae

Fungi, Ascomycota, Pezizomycotina, Eurotiomycetes, Eurotiomycetidae, Onygenales, Onygenaceae, Aphanoascus terreus

Fungi, Ascomycota, Saccharomycotina, Saccharomycetes, Saccharomycetidae, Saccharomycetals, Dipodascaceae, Geotrichum sp.

Fungi, Ascomycota, Pezizomycotina, Sordariomycetes, Hypocreomycetidae, Hypocreales, Cordycipitaceae, Lecanicillium fusisporum

Fungi, Ascomycota, Pezizomycotina, Sordariomycetes, Hypocreomycetidae, Microascales, Microascaceae Pseudoallescheria boydii

Fungi, Ascomycota, Pezizomycotina, Eurotiomycetes, Eurotiomycetidae, Eurotiales, Trichocomaceae, Paecilomyces lilacinus

Fungi, Ascomycota, Pezizomycotina, Eurotiomycetes, Eurotiomycetidae, Onygenales, Arthrodermataceae, Microsporium gypseum

Fungi Ascomycota, Saccharomycotina, Saccharomycetes, Saccharomycetidae, Saccharomycetales, Dipodascaceae, Galactomyces geotrichum

Fungi Ascomycota, Pezizomycotina, Eurotiomycetes, Eurotiomycetidae, Onygenales, Onygenaceae, Chrysosporium keratinophilum

Fungi Ascomycota, Pezizomycotina, Sordariomycetes, Hypocreomycetidae, Microascales, Microascaceae, Scedosporium aurantiacum

Fungi Ascomycota, Pezizomycotina Sordariomycetes, Hypocreomycetidae, Hypocreales, Ophiocordycipitaceae, Purpureocillium lilacinum

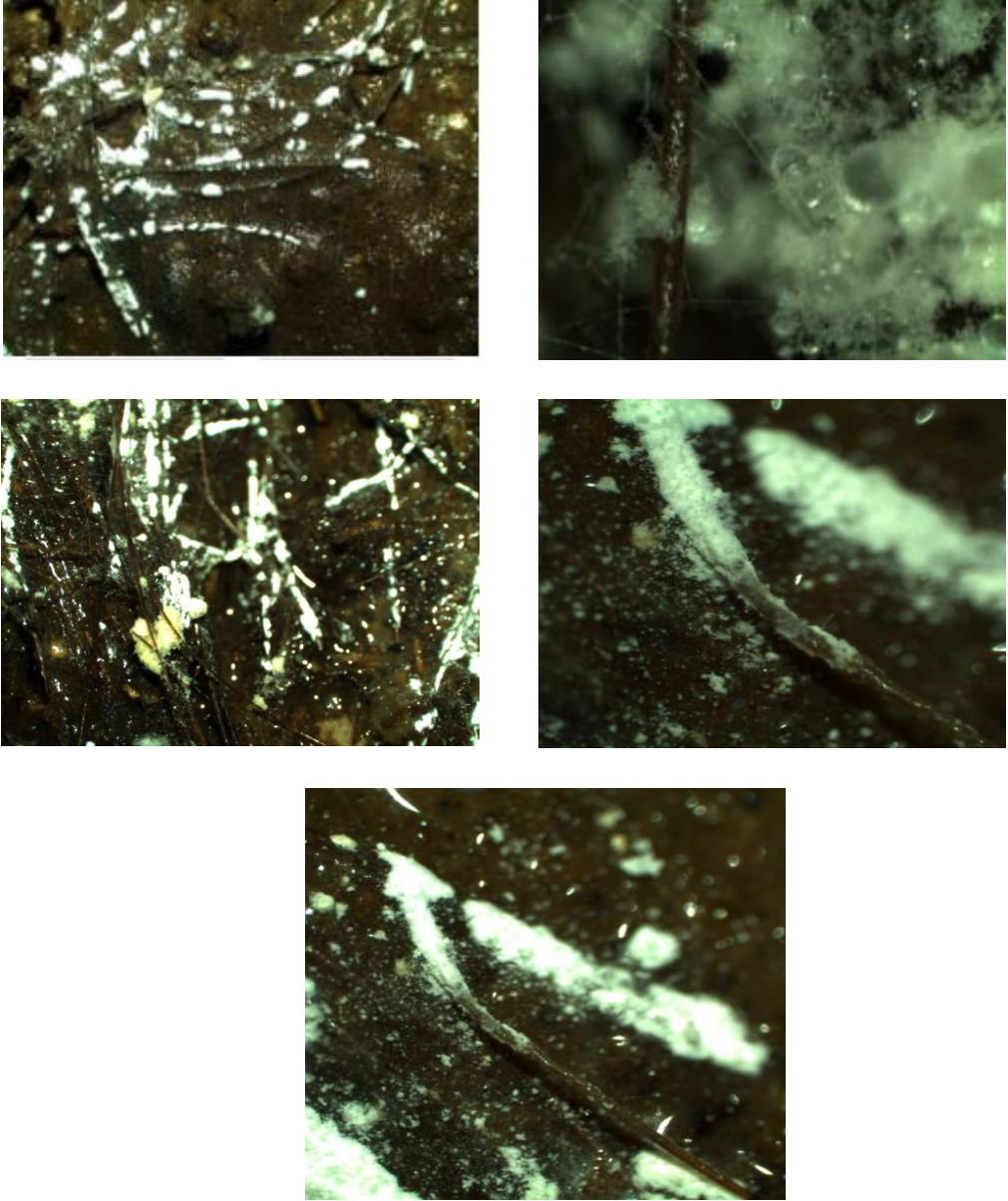
Fungi Ascomycota, Pezizomycotina, Eurotiomycetes, Eurotiomycetidae, Onygenales, Onygenaceae Uncinocarpus reesii

Fungi Ascomycota, Pezizomycotina, Eurotiomycetes, Eurotiomycetidae, Onygenales Arthrodermataceae, Arthroderma fulvum

Fungi Ascomycota, Pezizomycotina, Eurotiomycetes, Eurotiomycetidae, Onygenales, Onygenaceae, Chrysosporium articulatum

Fungi Ascomycota, Pezizomycotina, Sordariomycetes, Hypocreomycetidae, Hypocreales, Cordycipitaceae, Beauveria bassiana

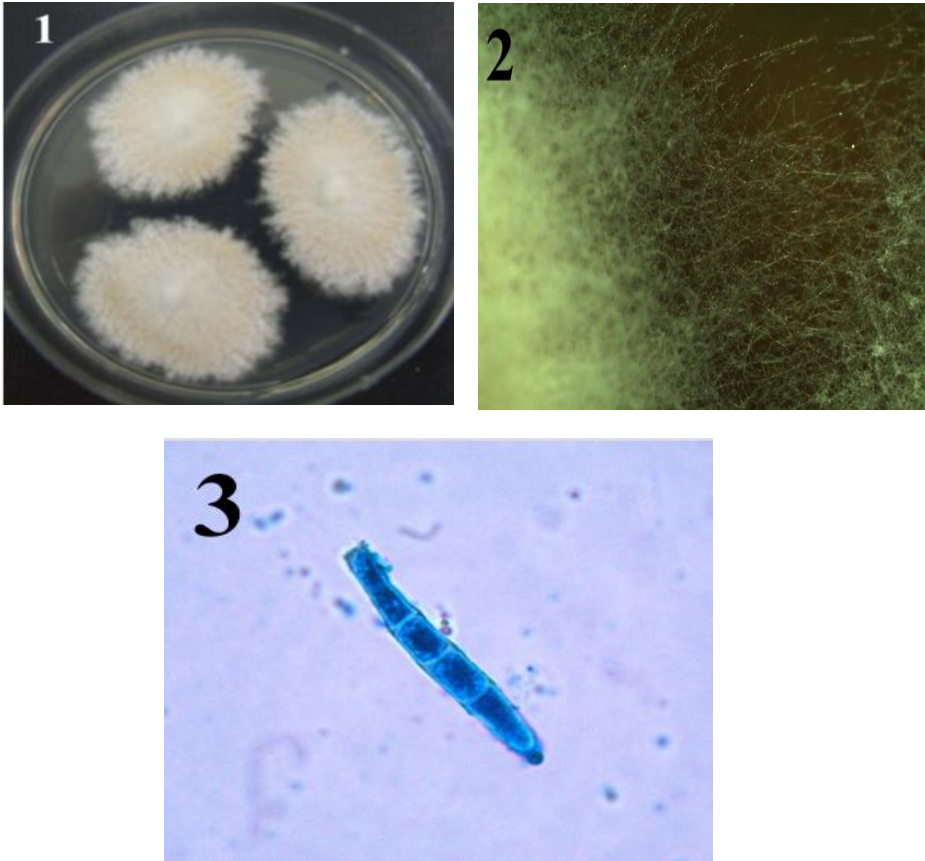
Fungi Ascomycota, Pezizomycotina, Eurotiomycetes, Eurotiomycetidae, Onygenales, Arthrodermataceae, Trichophyton rubrum



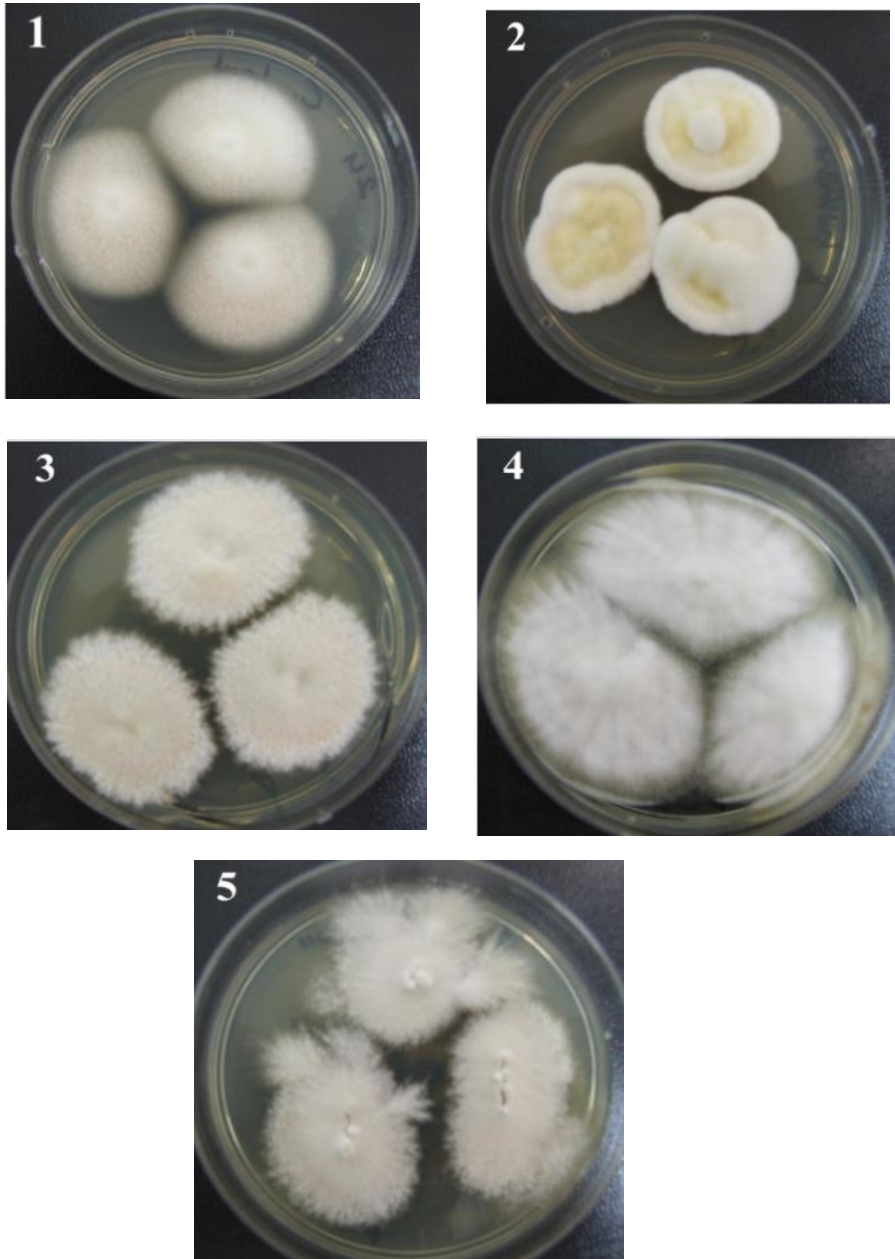
Şekil 4.1. Saç tuzaklarından binoküler mikroskop görüntüleri

2009 yılında Hindistan’da yapılan çalışmada farklı bölgelerden alınan toprak örneklerinden saç tuzağı yöntemi ile dermatofit izolasyonu yapılmıştır. Dermatofitlerin yanı sıra *Chrysosporium*, *Paecilomyces*, *Fusarium* ve *Scopulariopsis* genusundan funguslar da izole edilmiştir. Araştırmacılar dermatofitlerin bulunduğu toprağın pH aralığını 7-9 olarak bildirmişlerdir (Jain ve Sharma, 2009). Nijerya’da topraktan saç tuzağı ile keratofilik fungus

izolasyonu yapılmış, *Microsporum gypseum*, *Trichophyton mentagrophytes* gibi dermatofitlere ek olarak *Aspergillus flavus*, *Fusarium sp.* ve *Chrysosporium indicum* türleri de izole edilmiştir (Oyeka ve Okoli, 2002). Parklarda ve kumsallarda *Chrysosporium*, *Trichophyton*, *Microsporum*, *Paecilomyces* gibi türlerin varlığı saptanmıştır (Sharma, 2010; Lee vd., 2011). Saç tuzağı tekniği ile dermatofitlerin yanında non-dermatofit türlerin izole edildiği birçok araştırmacı tarafından kaydedilmiştir (Anbu vd., 2004; El-Said, 1995).



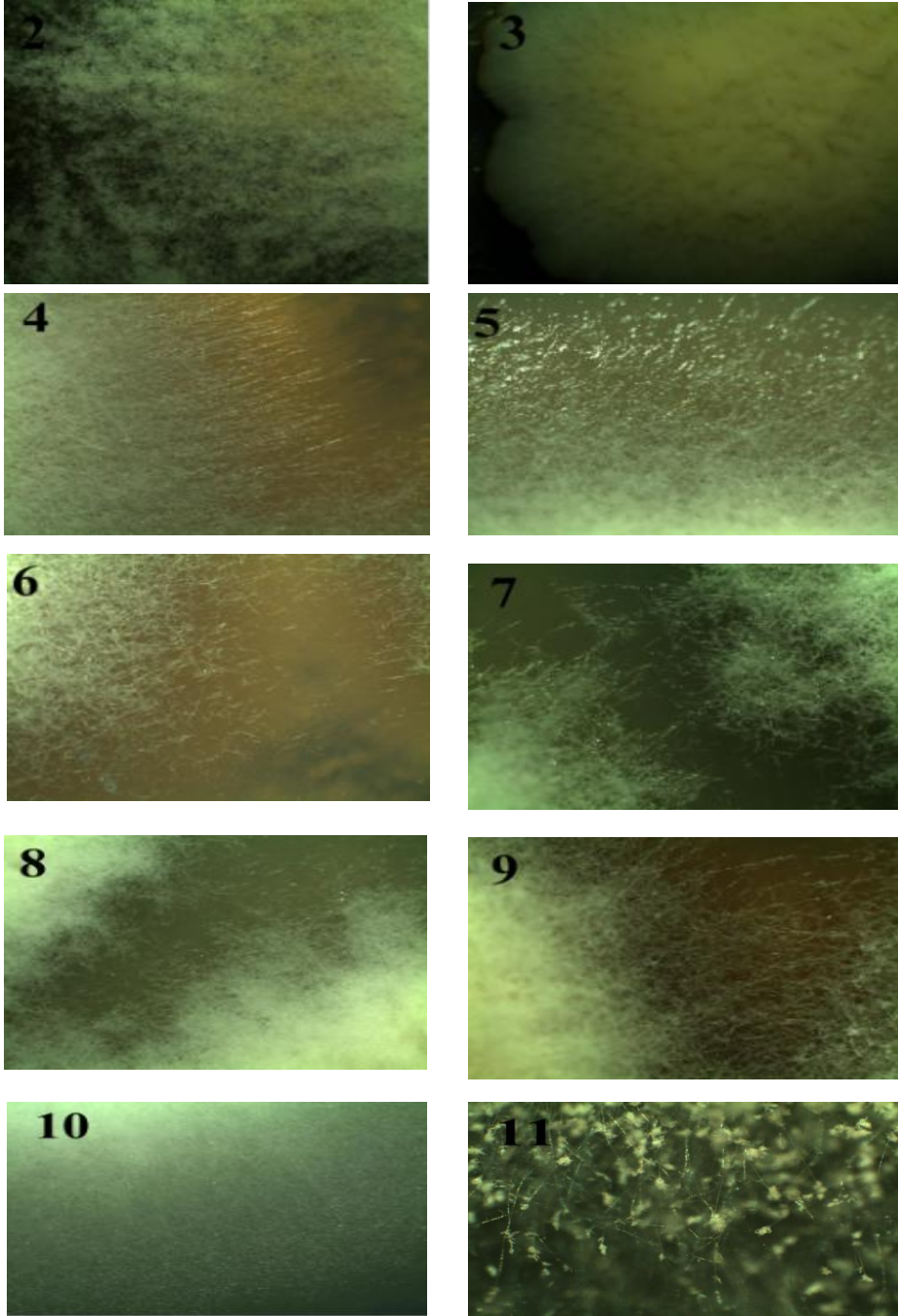
Şekil 4.2. *A. fulvum* izolatının sırasıyla petri, binoküler ve mikroskop görüntüsü



Şekil 4.3. Fungusların petri görüntüleri

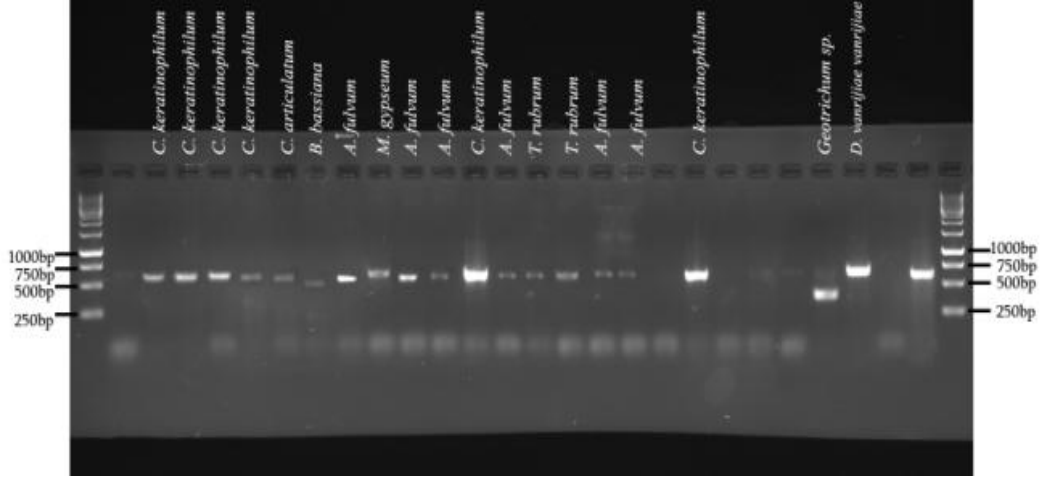
1) *C. keratinophilum* 2) *B. bassiana* 3)

A. Fulvum 4) *T. rubrum* 5) *M. gypseum*



Şekil 4.4. Fungusların binoküler mikroskop görüntüleri

1) *Aphanoascus terreus*, 2) *Microsporium gypseum*, 3) *Debaryomyces vanriijiae* var. *vanriijiae*, 4) *Chrysosporium keratinophilum*, 5) *Uncinocarpus reesii*, 6) *Chrysosporium keratinophilum*, 7,8) *Arthroderma fulvum*, 9) *Chrysosporium articulatum*, 10,11) *Trichophyton rubrum*.



Şekil 4.5. ITS-PCR sonuçlarının elektroforez görüntüsü

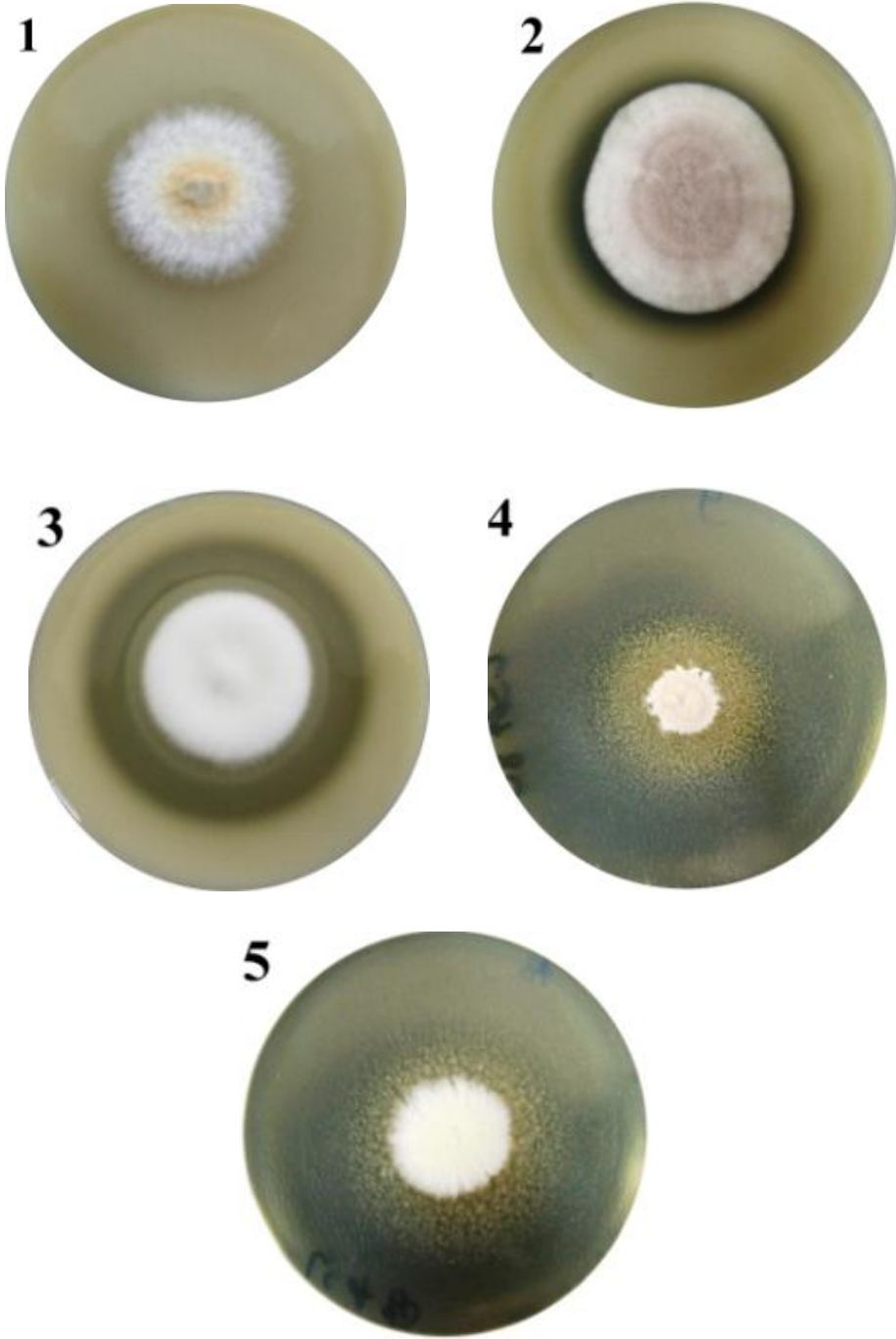
4.2. Enzim Görüntüleme Denemesinin Sonuçları

Dermatofit ve nondermatofit olan 25 tür beş enzim açısından taranmıştır. Substrat içeren katı besiyerine inoküle edilen funguslar 15 günlük inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda fungus ve oluşturduğu zon çapı ölçülmüştür. Sonuçlar Çizelge 4.2’de verilmiştir.

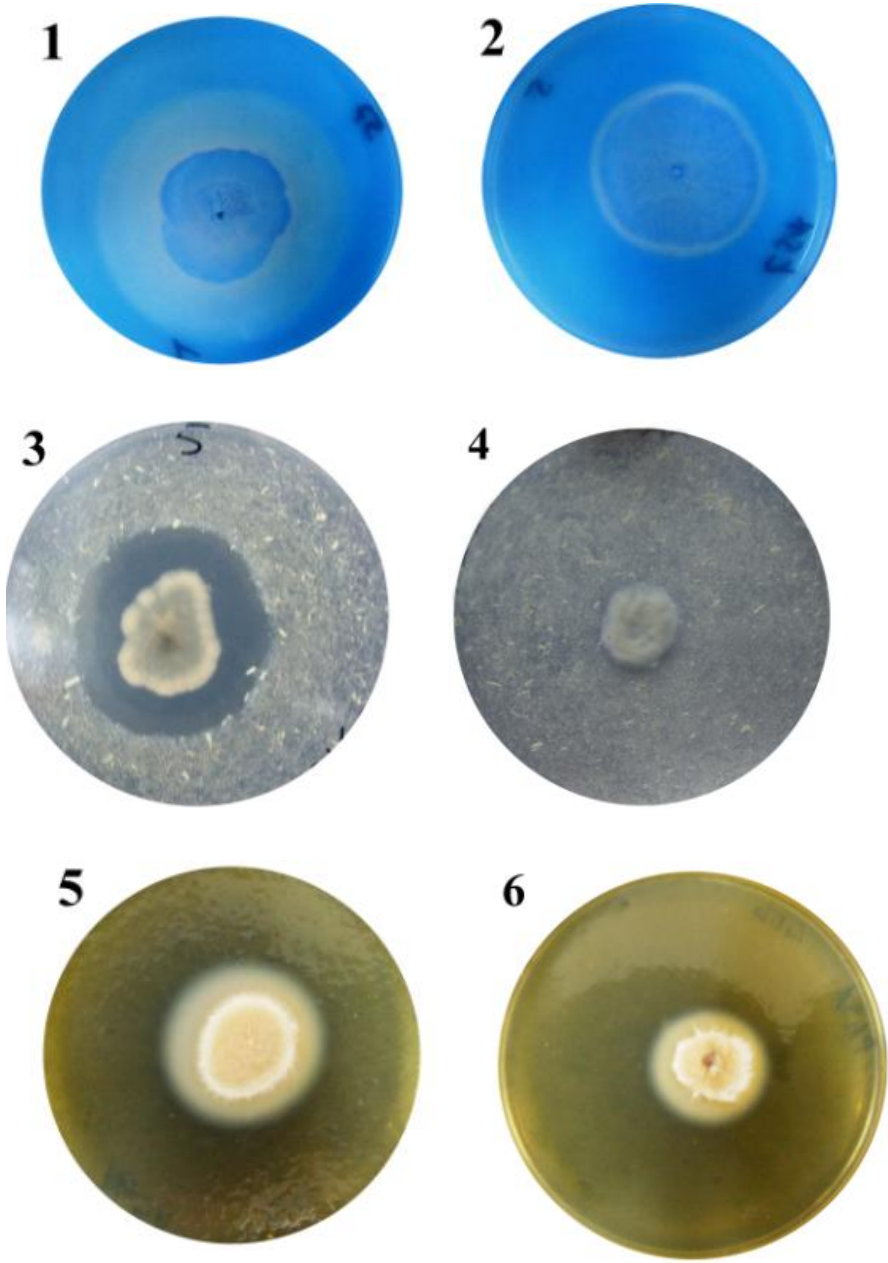
Çizelge 4.2. Enzim görüntüleme denemesinin sonuçları

İzolat no	PSA fungusçap ı/zon çapı	ESA Fungus çapı/ zon çapı	PhSA fungusçapı/ zon çapı	KSA fungusça pı /zon çapı	LSA fungusça pı/ zon çapı
2a: <i>A. Terreus</i>	22/22	-	-	26/30	15/28
5: <i>P. Boydii</i>	51/51	15/25	5/14	34/36	15/28
9: <i>M. gypseum</i>	-	-	14/25	-	9/30
10: <i>M. gypseum</i>	45/50	-	14/24	-	5/25
16: <i>C. keratinophilum</i>	48/48	-	10/16	32/35	18/35
18: <i>C. keratinophilum</i>	40/45	-	9/12	28/28	14/33
23: <i>C. keratinophilum</i>	46/50	-	8/17	24/24	22/35
24: <i>C. keratinophilum</i>	40/42	-	6/15	23/23	17/35
38: <i>C. keratinophilum</i>	46/51	-	10/15	26/26	15/29
43: <i>C. Articulatum</i>	-	-	-	40/40	40/51
40a: <i>A. fulvum</i>	43/43	10/12	22/32	11/11	23/34
40b: <i>A. fulvum</i>	41/44	10/12	24/33	20/20	28/33
40c: <i>A. fulvum</i>	-	-	14/22	13/13	28/46
41: <i>A. fulvum</i>	48/48	10/14	17/31	17/17	18/31
46: <i>A. fulvum</i>	49/49	-	24/35	24/24	24/37
47: <i>A. fulvum</i>	47/50	-	22/31	16/16	28/35
49: <i>A. fulvum</i>	47/47	10/12	12/28	27/27	25/45
2c: <i>D. vanrijae</i> <i>vanrijae</i>	5/7	-	-	-	-
51: <i>D. vanrijae</i> <i>vanrijae</i>	7/9	-	-	-	-
53: <i>D. vanrijae</i> <i>vanrijae</i>	-	-	-	-	18/27
56: <i>D. vanrijae</i> <i>vanrijae</i>	4/5	-	-	-	-
57: <i>P. lilacinus</i>	46/52	18/29	-	21/39	-
52: <i>B. bassiana</i>	40/56	10/17	-	20/30	-
61: <i>T. rubrum</i>	-	-	9/14	-	15/25
63: <i>T. rubrum</i>	27/33	-	10/17	-	-

Enzim aktivitesi (Pz); koloni çapının, koloni ile birlikte presipitasyon zonunun toplam çapına oranı olarak hesaplanmaktadır. Bulunan Pz katsayılarına göre Pz aktiviteleri dört grupta değerlendirilmektedir; 0,9-1 (+) çok yüksek Pz grubu, 0,89-0,80 (++) yüksek Pz grubu, 0,79-0,70 (+++) düşük Pz grubu ve <0,69 (++++) çok düşük Pz grubudur. Bu değerlendirmeye göre Pz değeri küçüldükçe enzim aktivitesi artmakta, Pz=1,00 değeri enzim aktivitesi olmadığını göstermektedir. Bu durumda 0,9-1,00 değerine sahip olanlar enzim aktivitesi çok düşük grubu; <0,69 olanlar enzim aktivitesi çok yüksek grubu oluşturmaktadır (Arslan ve Fındık, 2003). Klinik *Candida* izolatlarında proteaz ve fosfolipaz aktivitesini katı besiyerinde inceleyen Kantarcıoğlu ve Yücel, (2002) Pz değerine göre sonuçları değerlendirmiştir. Funguslarda katı besiyerinde enzim görüntüleme çalışmalarında birçok bilim insanının bu yöntemi tercih ettiği görülmüştür (Kothavade ve Panthaki, 1998; Sharon vd., 1997).



Şekil 4.6. 1) PSA -, 2,3) PSA +, 4,5) LSA + petri görüntüleri



Şekil 4.7. 1,2) KSA pozitif, 3) ESA pozitif, 4) ESA negatif, 5,6) PhSA pozitif petri görüntüleri

Çizelge 4.3. Enzim görüntüleme denemesinin Pz değerleri

zolat no	PSA Pz	ESA Pz	PhSA Pz	KSA Pz	LSA Pz
2a: <i>A. Terreus</i>	1	-	-	0,86	0,53
5: <i>P. Boydii</i>	1	0,6	0,35	0,96	0,53
9: <i>M. gypseum</i>	-	-	0,56	-	0,3
10: <i>M. gypseum</i>	0,9	-	0,58	-	0,2
16: <i>C. keratinophilum</i>	1	-	0,625	0,91	0,51
18: <i>C. keratinophilum</i>	0,88	-	0,75	1	0,42
23: <i>C. keratinophilum</i>	0,92	-	0,47	1	0,62
24: <i>C. keratinophilum</i>	0,95	-	0,4	1	0,48
38: <i>C. keratinophilum</i>	0,9	-	0,66	1	0,51
43: <i>C. articulatum</i>	-	-	-	1	0,78
40a: <i>A. fulvum</i>	1	0,83	0,68	1	0,67
40b: <i>A. fulvum</i>	0,93	0,83	0,72	1	0,84
40c: <i>A. fulvum</i>	-	-	0,63	1	0,60
41: <i>A. fulvum</i>	1	0,7	0,54	1	0,58
46: <i>A. fulvum</i>	1	-	0,68	1	0,64
47: <i>A. fulvum</i>	0,94	-	0,7	1	0,8
49: <i>A. fulvum</i>	1	0,83	0,42	1	0,55
2c: <i>D. vanrijae vanrijae</i>	0,7	-	-	-	-
51: <i>D. vanrijae vanrijae</i>	0,77	-	-	-	-
53: <i>D. vanrijae vanrijae</i>	-	-	-	-	0,66
56: <i>D. vanrijae vanrijae</i>	0,8	-	-	-	-
57: <i>P. lilacinus</i>	0,88	0,62	-	0,53	-
52: <i>B. bassiana</i>	0,71	0,58	-	0,66	-
61: <i>T. rubrum</i>	-	-	0,64	-	0,6
63: <i>T. rubrum</i>	0,81	-	0,58	-	-

Çizelge 4.4. Enzim aktivite değerlendirmesi +: aktivite yok/ çok düşük, ++: düşük, +++:orta, ++++: yüksek

İzolot no	PSA aktivite	ESA aktivite	PhSA aktivite	KSA aktivite	LSA Aktivite
2a: A. Terreus	+	-	-	++	++++
5: P. Boydii	+	++++	++++	+	++++
9: M. gypseum	-	-	++++	-	++++
10: M. gypseum	+	-	++++	-	++++
16: C. keratinophilum	+	-	++++	+	++++
18: C. keratinophilum	++	-	+++	+	++++
23: C. keratinophilum	+	-	++++	+	++++
24: C. keratinophilum	+	-	++++	+	++++
38: C. Keratinophilum	+	-	++++	+	++++
43: C. articulatum	-	-	-	+	+++
40a: A. fulvum	+	++	++++	+	++++
40b: A. fulvum	+	++	+++	+	++
40c: A. fulvum	-	-	++++	+	++++
41: A. fulvum	+	+++	++++	+	++++
46: A. fulvum	+	-	++++	+	++++
47: A. fulvum	+	-	+++	+	++
49: A. fulvum	+	++	++++	+	++++
2c:D. vanrijae vanrijae	+++	-	-	-	-
51: D. vanrijae vanrijae	+++	-	-	-	-
53: D. vanrijae vanrijae	-	-	-	-	++++
56: D. vanrijae vanrijae	++	-	-	-	-
57:P. lilacinus	++	++++	-	++++	-
52: B. bassiana	+++	++++	-	++++	-
61: T. rubrum	-	-	++++	-	++++
63: T. rubrum	++	-	++++	-	-

Proteaz aktiviteleri karşılaştırıldığında orta düzeyde aktivite gösteren 2 tür vardır. Bunlar *D. vanrijae* ve *B. Bassiana*'dır. Yüksek düzeyde elastaz aktivitesi gösteren funguslar *P. Boydii*, *P. lilacinus*, *B. Bassiana*'dır. Fosfolipaz açısından yüksek aktivite gösteren suşlar; *P. boydii*, *M. gypseum*, *C. keratinophilum*, *A. fulvum* ve *T. rubrum*'dur. Taradığımız funguslar içinde keratinaz üreten oldukça azdır. *A. terreus* düşük aktivite gösterirken *P. lilacinus*, *B. bassiana* yüksek keratinaz aktivitesi göstermektedir. *D. vanrijae* izolatlarından bazıları, *P. lilacinus*, *B. bassiana* ve *T. rubrum* izolatlarından 1 tanesi lipaz üretmemektedir. Geriye kalan fungusların hepsi lipaz açısından orta-yüksek seviyede aktivite göstermektedir.

Dermatofitleri inceleyecek olursak 2 adet *M. gypseum* izolatu 5 enzim açısından benzer sonuçlar göstermiştir. 7 adet *A. fulvum* izolatından hiçbiri keratinaz ve proteaz aktivitesi göstermemiştir. 3 tanesi düşük, 1 tanesi orta düzeyde elastaz aktivitesi gösterirken, diğer 3'ü aktivite göstermemiştir. Fosfolipaz açısından orta-yüksek aktivite gösteren *A. fulvum* izolatlarının 5 tanesi lipaz açısından yüksek aktivite göstermiştir. *T. rubrum* izolatlarından biri proteaz, elastaz ve keratinaz aktivitesi göstermemiş, fosfolipaz ve lipaz açısından yüksek aktivite göstermiştir. Diğer *T. rubrum* izolatu elastaz, keratinaz ve lipaz aktivitesi göstermezken düşük proteaz, yüksek fosfolipaz aktivitesi göstermiştir.

Araştırmacıların infekte hayvanlardan elde ettikleri dermatofit ve non-dermatofit türlerini 4 enzim (lipaz, amilaz, proteaz, keratinaz) açısından taradıkları çalışmada, dermatofitlerde yüksek keratinaz aktivitesinin yanı sıra proteaz aktivitesi de olduğunu bildirmişlerdir. Non-dermatofit türlerde ise keratinaz aktivitesi düşüktür. *M. gypseum*, *T. verrucosum*, *T. mentagrophytes nodulare* lipaz aktivitesi gösterirken *T. mentagrophytes erinacei* lipaz üretmemiştir (Muhsin ve Salih, 2000). Literatürün aksine izole ettiğimiz iki adet *T. rubrum* izolatu keratinaz aktivitesi göstermemiştir.

Trichophyton sp. izolatının ürettiği keratinazın incelendiği çalışma enzimin çalıştığı pH aralığı 6-9 olarak belirtmiştir. Ancak maksimum aktivite için optimum değerler pH:8 ve 35 °C'dir. Farklı karbon kaynakları (glukoz, fruktoz, galaktoz, laktoz, sükroz, mannitol) kullanıldığında en iyi aktivitenin gözlemlendiği karbon kaynağı glukoz olarak kaydedilmiştir. Ancak glukoz konsantrasyonu arttıkça aktivite azalmıştır. %1'lik glukoz konsantrasyonu optimum olarak rapor edilmiştir. Saç, tırnak, tavuk tüyü, boynuz ve toynak gibi farklı keratin

materyallerin test edilmesiyle tavuk tüyünde en iyi aktivite gözlemlenmiştir (Anbu vd., 2008). Tavşanlarda semptomlu, asemptomatik olgulardan ve çevreden izole edilen *T. mentagrophytes* izolatlarının enzim aktivitesinin araştırıldığı çalışmada semptomlu olgulardan izole edilen türlerin elastaz ve jelatinaz aktivitesinin diğerlerinden daha fazla olduğu belirtilmiştir. Keratinaz, lipaz ve DNaz aktivitesinin her üç kaynaktan elde edilen *T. mentagrophytes* türleri için aynı olduğu bildirilmiştir. Araştırmacılar hayvanlarda parazitik olarak büyümeye adapte olan türlerin bazı enzimler açısından daha aktif olabileceğini bildirmiştir (Cafarchia vd., 2011). *M. canis*'in etken olduğu dermatofitozlu kediler ve asemptomatik taşıyıcı olan kedilerden izole edilen *M. canis* izolatları keratinaz, elastaz ve kolajenaz açısından karşılaştırılmıştır. Keratinolitik ve elastinolitik aktivite semptomatik grupta daha yüksek çıkmıştır. Ancak kolajenolitik aktivite arasındaki fark anlamlı bulunmamıştır. Araştırmacılar enzimlerin özellikle keratinazın virulans faktör olduğunu, dermatofitozda önemli rol oynadığını bildirmişlerdir (Viani vd., 2007).

Endüstride kullanılan birçok enzim mikrobiyal kökenlidir. Ticari olarak kullanılan enzimlerin %59'unu proteazlar, %28'ini karbohidrazlar, %3'ünü lipazlar ve %10'unu ise diğer enzimler oluşturmaktadır. Lipazlar gıda endüstrisinde, biyomedikal uygulamalarda, biyosensörler ve pestisitlerin yapımında, deterjan ve deri sanayiinde, çevre yönetiminde, kozmetik ve parfüm sanayiinde uygulama alanları bulmaktadır. Endüstriyel olarak en yaygın kullanılan lipaz üreticisi mikroorganizmalar; *Candida sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Rhizopus sp.*'dir. Son yıllarda biyoteknoloji alanında lipazların kullanımında hızlı bir artış gözlenmektedir (Kıran,2006). Gıda endüstrisinde yaygın olarak kullanılan enzimlerden proteaz; unlu ürünlerde (ekmekçilikte), geleneksel fermente ürünlerde, biranın soğukta olgunlaştırılmasında, peynir endüstrisinde koagülasyon amacıyla, et olgunlaştırmada, balık proteininin çözünürlüğünün artırılmasında, klinikte (sindirim kolaylaştırıcı olarak, tanıda, vb.) ve biyokimyada (hücrel materyal saflaştırılmasında, peptid analiz ve sentezinde vb.) kullanılmaktadır (Topal vd., 2000). Bu nedenle tıp, kozmetik, deterjan, deri endüstrisi ve keratin atıkların biodegradasyonu gibi farklı alanlarda, keratinofilik fungusların enzimlerinden faydalanılabileceği belirtilmektedir (Tanış ve Cihangir, 2009).

5. SONUÇ

Keratinofiliklerin topraktan izolasyonu için kullanılan tek yöntem keratin tuzağıdır. Bakteri ve saprofit fungus kontaminasyonunu engellemek için kullanılan antibiyotik ve sikloheksimit ilk izolasyon aşamasında çok önemlidir. Toprakta bulunan akarlar gözle görülmediği için besiyerine - kontamine saç aktarırken- geçebilmektedir. Akar kontaminasyonu dikkat edilmesi gereken diğer bir noktadır. Bu çalışma ile Türkiye'nin toprak florasında keratinofilik funguslar olduğu saptanmıştır. İnsanlarda deri enfeksiyonlarına sebep olan bazı dermatofitlerin toprakta da bulunduğu belirlenmiştir. Çalışma kapsamında izole edilen fungusların %23'ü dermatofittir. 48 izolattan ; 7 adet *A. fulvum*, 2 adet *M. gypseum*, 2 adet *T. rubrum* olmak üzere 11 adet dermatofit elde edilmiştir. *Chrysosporium*, *Aphanoascus*, *Paecilomyces*, *Pseudallescheria*, *Galactomyces*, *Geotrichum*, *Lecanicillium*, *Penicillium*, *Scedosporium*, *Purpureocillium*, *Uncinocarpus*, *Debaryomyces*, *Beauveria* ve *Acremonium* izole edilen non-dermatofit türlerdir. Dermatofitler inkübasyon sürelerinin uzun, mikroskobik ve makroskobik özelliklerinin değişebilir olması sebebiyle klasik tanıya elverişli olmayan funguslardır. Çalışmamızda tercih ettiğimiz ITS-PCR güvenilir ve kolaydır.

Enzim potansiyellerine bakıldığında; dermatofitler fosfolipaz üretimi açısından öne çıkmaktadır. Literatürün aksine izole ettiğimiz dermatofitlerin katı besiyerinde yüksek keratinaz aktivitesi göstermediği gözlemlenmiştir. Bu durum dermatofitlerin patojenitesinde fosfolipaz ve lipaz'ın etkili olduğunu düşündürmektedir. *B. bassiana* ve *P. lilacinus*'un keratinaz üretimi yüksek seviyededir. *P. boydii* *B. bassiana* ve *P. lilacinus* elastaz üretmektedir. Proteaz açısından *D. vanrijiae* izolatları elverişlidir. Fungusların çoğunda lipaz üretimi vardır. Lipaz, fosfolipaz, keratinaz, elastaz ve proteaz aktivitesi yüksek olan suşlar elde edilmiş, çalışma amacına ulaşmıştır.

Elde edilen kültür koleksiyonu topraktaki keratinofilik fungus florasını göstermektedir. Bu fungusların moleküler tanısının yapılması ve bazı enzimler açısından potansiyellerinin belirlenmesi sayesinde ilerideki çalışmalara temel oluşturulmuştur.

Bundan sonra farklı bölgelerden alınan toprak örnekleri ile Türkiye'nin çevresel keratinofilik florası belirlenebilir. Tercih edilen bir enzimin üretimi, karakterizasyonu ve endüstriyel anlamda kullanıma sunulması söz konusu olabilir. Keratinolitik salgı genleri araştırılabilir, gen transferi denenebilir, insan ve toprak kaynaklı izolatların proteolitik salgı genlerinin transkripsiyon seviyesi karşılaştırılıp patogenez ve enfeksiyon sürecine dair araştırmalar yapılabilir.

KAYNAKLAR

- Abacı, Ö., Haliki, A. 2005. Fungal tanıda polimeraz zincir reaksiyonu. **Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi**, 3: 1-9.
- Achterman, R.R., White, T.C. 2012. Dermatophyte virulence factors: identifying and genes that may contribute to chronic or acute skin infections. **International Journal of Microbiology**, Article ID 358305, 8 pages doi:10.1155/2012/358305.
- Adl, S.M., Simpson, A.G.B., Lane, C.E., Lukes, J., Bass, D. Bowser, S.S., Brown, M.W., Burki, F., Dunthorn, M., Hampl, V., Heiss, A., Hoppenrath, M., Lara, E., Gall, L., Lynn, D.H., Mcmanus, H., Mitchell, E.A.D., Mozley-Stanridge, S.E., Parfrey, L.W. Pawlowski, J., Rueckert, S., Shadwick, L., Schoch, C.L., Smirnov, A., Spiegel, F.W. 2012. The revised classification of eukaryotes. **Journal Eukaryot Microbiology**, 5: 429-493.
- Ajello, L., George, L.K., Kaplan, W., Kaufman, L. 1962. Laboratory manual for medical mycology. Public Health Service, pp. 337, Georgia.
- Al Musallam, A.A., Radwan, S.S. 1990. Wool colonizing microorganisms capable of utilizing wool lipids and fatty acids as sole sources of carbon and energy. **Journal of Applied Bacteriology**, 69: 806-813.
- Altindiş, M., Bilgili, E., Kiraz, N., Ceri, A. 2003. Prevalence of Tinea capitis in primary schools in Turkey. **Mycoses**, 46: 218-221.
- Ameen, M. 2010. Epidemiology of superficial fungal infections. **Clinics in Dermatology**, 28: 197-201.
- Anbu, P., Hilda, A., Gopinath, S.C.B. 2004 . Keratinophilic fungi of poultry farm and feather dumping soil in Tamil Nadu, India. **Mycopathologia**, 158: 303-309.
- Anbu, P., Hilda, A., Sur, H., Hur, B., Jayanthi, S. 2008. Extracellular keratinase from *Trichophyton sp.* HA-2 isolated from feather dumping soil. **International Biodeterioration and Biodegradation**, 62: 287-292.

- Arslan, U., Fındık D. 2003. Klinik örneklerden izole edilen *Candida albicans* türü maya mantarlarında virulans faktörlerinin (proteinaz, slime ve fosfolipaz) in-vitro araştırılması. **Turkish Journal of Infection**, 4: 471-481.
- Asquith, R.S. 1977. Chemistry of Natural Protein Fibers. Plenum Press, pp.417, New York.
- Ateş, A. 2007. *Trichophyton rubrum*'un *Trichophyton mentagrophytes*'ten Ayırt Edilmesinde Kullanılan Tanı Testlerinin Karşılaştırılması. Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Doktora tezi, Adana.
- Balazsy, T.A., Eastop, D. 1998. Chemical Principles of Textile Conservation. Butterworth-Heinemann, Oxford.
- Bıyık, F. 2008. Dermatofitlerin İdentifikasyonunda Moleküler Yöntemlerin Yeri ve Uygulanabilirliğinin Belirlenmesi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Doktora tezi, İstanbul.
- Blyskal, B. 2009. Fungi utilizing keratinous substrates. **International Biodeterioration & Biodegradation**, 63: 631–653.
- Brouta, F., Descamps, F., Monod, M., Vermout, S., Losson, B., Mignon, B. 2002. Secreted metalloprotease gene family of *Microsporum canis* **American Society for Microbiology**, 70: 5676-5683.
- Böhme, H., Ziegler, H. 1969. The distribution of geophilic dermatophytes and other keratinophilic fungi in relation to the pH of the soil. **Mycopathologia**, 38: 247-255.
- Burmester, A., Shelest, E., Glöckner, G., Heddergott, C., Schindler, S., Staib, P., Heidel, A., Felder, M., Petzold, A., Szafranski, K., Feuermann, M., Pedruzzi, I., Priebe, S., Groth, M., Winkler, R., Li, W., Kniemeyer, O., Hertweck, V.S.C., Hube, B., White, T.C., Platzer, M., Guthke, R., Heitman, J., Wöstemeyer, J., Zipfel, P.F., Monod, M., Brakhage, A. 2011. Comparative and functional genomics provide insights into the pathogenicity of dermatophytic fungi. **Genome Biology**, 1: 2-16.

- Cabanes, F.J. 2000. Dermatophytes in domestic animals. **Revista Iberoamericana de Micología**, 17: 104-108.
- Cafarchia, C., Figueredo, L.A., Coccioli, C., Camarda, A., Otranto, D. 2011. Enzymatic activity of *Microsporum canis* and *Trichophyton mentagrophytes* from breeding rabbits with and without skin lesions. **Mycoses**, 55: 45-49.
- Chieh Li, H., Bouchara, J., Hsu, M., Barton, M., Su, S., Chang, T. 2008. Identification of dermatophytes by sequence analysis of the rRNA gene internal transcribed spacer regions. **Journal of Medical Microbiology**, 5: 592-600.
- Connole, M.D. 1990. Review of animal mycoses in Australia. **Mycopathologia**, 111: 133-164.
- Çerikoğlu, N. 2012. Mantarlarda virülans faktörleri. **Ankem**, 26: 261-269.
- Descamps, F., Brouta, F., Monod, M., Zaugg, C., Baar, D., Losson, B., Mignon, B. 2002. Isolation of a *Microsporum canis* gene family encoding three subtilisin-like proteases expressed in vivo. **The Society for Investigative Dermatology**, 4: 830-835.
- Deshmukh, S.K., Verekar, S.A. 2006. Keratinophilic fungi from the vicinity of meteorite crater soils of Lonar (India). **Mycopathologia**, 162: 303-306.
- De Vroey, C. 1984. Ecological and epidemiological aspects in dermatophytoses. 257: 234-239.
- De Vroey, C. 1985. Epidemiology of ringworm (dermatophytosis). **Seminars in Dermatology**, 4: 185-200.
- Dilek, N., Yücel, A.Y., Dilek, A.R., Saral, Y., Toraman, Z.A. 2009. Fırat Üniversitesi hastanesi dermatoloji kliniği'ne başvuran hastalardaki dermatofitoz etkenleri. **Turkish Journal of Dermatology**, 3: 27-31.

- Dix, N.J., Webster, J., 1995. Fungal Ecology. Chapman and Hall, London.
- El-Said, A.H.M. 1995. Keratinophilic fungi in soils of Yemen Arab Republic. **Journal of Islamic Academy of Sciences**, 4: 151-154.
- El Fari, M., Tietz, H.J., Presber, W., Sterry, W., Graser, Y. 1999. Development of an oligonucleotide probe specific for *Trichophyton rubrum*. **British Journal of Dermatology**, 141: 240-245.
- Ergin, Ç. 2007. Dermatofitlerin doğadan soyutlanması. **İnfeksiyon dergisi**, 21: 113-116
- Ergin, Ç., Kaleli, İ., Çevik, E., Övet, H. 2008. Laodikeia rekreasyon atölyesinde keratinofilik mantarların araştırılması. **Mikrobiyoloji Bülteni**, 42: 463-467.
- Frosco, M., Chase, T., Macmillan, J.D. 1992. Purification and properties of the elastase from *Aspergillus fumigatus*. **Infection and Immunity**, 3: 728-734.
- Gawad, K.M. 1997. Mycological and some physiological studies of keratinophilic and other moulds associated with sheep wool. **Microbiology. Research**, 152: 181-188.
- Graser, Y., Kuijpers, A.F., El Fari, M., Presber, W., De Hoog, G.S. 2000. Molecular and conventional taxonomy of the *Microsporium canis* complex. **Medical Mycology**, 38: 143-153.
- Grumbt, M., Monod, M., Staib, P. 2011. Genetic advances in dermatophytes. **FEMS Microbiology Letters**, 320: 79-86.
- Gugnani, H.C. 2000. Nondermatophytic filamentous keratinophilic fungi and their role in human infection. **Revista Iberoamericana de Micología**, 17:109-114.
- Gupta, A.K., Summerbell, R.C. 2000. Tinea capitis. **Medical. Mycology**, 38: 255-287.

- Gupta, R., Ramnani, P. 2006. Microbial keratinases and their prospective applications: an overview. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 70: 21-33.
- Gürcan, Ş. 2007. Tek konidiyum oluşturan hyalen küfler ve infeksiyonları (Scedosporium, Chrysosporium, Sepedoniumve Beauveria). **İnfeksiyon dergisi**, 21: 159-164.
- Hapçioğlu, B., Yeğenoğlu, Y., Dişçi, R., Erturan, Z., Karayev, Z. 2003. İstanbul'da farklı sosyoekonomik statüdeki ilköğretim öğrencilerinde *Tinea capitis* ve *Pediculosis capitis* prevalansının araştırılması. **Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti. Dergisi**, 33: 343-349.
- Hirai, A., Kano, R., Nakamura, Y., Watanabe, S., Hasegawa, A. 2003. Molecular taxonomy of dermatophytes and related fungi by chitin synthase 1 (CHS1) gene sequences. **Antonie van Leeuwenhoek**, 83: 11-20.
- Hocaoğlu, G. 2007. Erzincan İli Merkez İlçesi İlkokul Öğrencilerinde Tinea Capitis Prevalansı ve Etken Dermatofit Türlerinin Belirlenmesi. Atatürk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Erzurum.
- Jain, N., Sharma, M. 2009. Distribution of dermatophytes and other related fungi in Jaipur city, with particular reference to soil pH. **Mycoses**, 54: 52-58.
- Jennings, D.H., 1995. The Physiology of Fungal Nutrition. Cambridge University Press, Cambridge.
- Kamiya, A., Kikuchi, A., Tomita, Y., Kanbe, T. 2004. PCR and PCR-RFLP techniques targeting the DNA topoisomerase II gene for rapid clinical diagnosis of the etiologic agent of dermatophytosis. **Journal of Dermatological Science**, 34: 35-48.
- Kano, R., Aihara, S., Nakamura, Y., Watanabe, S., Hasegawa, A. 2001. Chitin synthase 1 (Chs1) gene sequences of *Microsporium equinum* and *Trichophyton equinum*. **Veterinary Microbiology**, 78: 85-90.

- Kantarcıoğlu, A., Yücel, A. 2002. Phospholipase and protease activities in clinical *Candida* isolates with reference to the sources of strains. **Mycoses**, 45: 160-165.
- Kaşık, G. 2010. Mantar Bilimi. 1. Baskı, Selçuk Üniversitesi, Konya.
- Kıran, Ö., Çömlekçioğlu, U., Dostbil, N. 2006. Bazı mikrobiyal enzimler ve endüstrideki kullanım alanları. **Journal of Science and Engineering**, 1: 12-19.
- Kothavade, R.J., Panthakı, M.H. 1998. Evaluation of phospholipase activity of *Candida albicans* and its correlation with pathogenicity in mice. **Journal of Medical Microbiology**, 47: 99-102.
- Kunert, J. 1972. Tiosulphate esters in keratin attacked by dermatophytes in vitro. **Sabouraudia**, 10: 6-13.
- Kunert, J. 1992. Effect of reducing agents on proteolytic and keratinolytic activity of enzymes of *Microsporum gypseum*. **Mycoses**, 35: 343-348.
- Kunert, J. 2000. Physiology of keratinophilic fungi. **Revista Iberoamericana de Micologia**, 17: 77-85.
- Kwon-Chung, K.J., Bennet, J.E. 1992. Medical Mycology. Lea and Febiger, pp: 866 Philadelphia, London.
- Lee, M.J., Park, J.S., Chung, H., Jun, J.B., Bang, Y.J. 2011. Distribution of soil keratinophilic fungi isolated in summer beaches of the east sea in Korea. **Korean Journal of Medical Mycology**, 2: 44-50.
- Marchisio, V.F., Fusconi, A., Rigo, S. 1994. Keratinolysis and its morphological expression in hair digestion by airborne fungi. **Mycopathologia**, 127:103-115.
- Marchisio, V.F. 2000. Keratinophilic fungi: their role in nature and degradation of keratinic substrates. **Revista Iberoamericana de Micologia**, 17: 86-92.

- Mebazaa, A., Oumari, K.E.L., Said, M.B., Ghariani, N., Denguezli, M., Mili, A.F., Kenani, N., Belajouza, C., Noura, R. 2010. Tinea capitis in adults in Tunisia. **International Journal of Dermatology**, 49: 513-516.
- Mirzahoseini, H., Omidinia, E., Ghahfarokhi, M., Sadeghi, G., Abyaneh, M. 2009. Application of PCR-RFLP to rapid identification of the main pathogenic dermatophytes from clinical specimens. **Iranian Journal Public Health**, 38: 18-24.
- Mochizuki, T., Tanabe, H., Kawasaki, M., Ishizaki, H., Jackson, C. 2003. Rapid identification of *Trichophyton tonsurans* by PCR-RFLP analysis of ribosomal DNA regions. **Journal of Dermatological Science**, 32: 25-32.
- Mochizuki, T., Sugie, N., Uehara, M. 1997. Random amplification of polymorphic DNA is useful for the differentiation of several anthropophilic dermatophytes. **Mycoses**, 40: 405-409
- Muhsin, T.M., Salih, T.H. 2000. Exocellular enzyme activity of dermatophytes and other fungi isolated from ruminants in Southern Iraq. **Mycopathologia**, 150: 49-52.
- Muhsin, T.M., Aubaid, A.H., Al-Duboon, A.H. 1997. Extracellular enzyme activities of dermatophytes and yeast isolates on solid media. **Mycoses**, 40: 465-469.
- Ninet, B., Jan, I., Bontems, O., Lechenne, B., Jousson, O., Panizzon, R., Lew, D., Monod, M. 2003. Identification of dermatophyte species by 28S ribosomal DNA sequencing with a commercial kit. **Journal Of Clinical Microbiology**, 826-830.
- Or, E., Kaymaz, A., Dodurka, T., Tan, H. 1999. Zoonotik *Microsporium canis* infeksiyonu. **Journal. of Veterinary and Animal Sciences**, 23: 293-296.
- Oyeka, C.A., Okoli, I. 2002. Isolation of dermatophytes and non-dermatophytic fungi from soil in Nigeria. **Mycoses**, 46: 318-320.

- Özgür, N.Y. 2007. Simpozyum: Hayvan dermatomikozları: Çevre, toplum ve aile ilişkileri. **İnfeksiyon dergisi**, 21: 85-89.
- Özkütük, A. 1999. Dermatomikoz Olgularından İzole Edilen Dermatofitlerin Tiplendirilmesi ve Antifungal Ajanlara Duyarlılıkları. Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora tezi, İzmir.
- Preuett, B., Schuenemann, E., Brown, J., Kovac, M., Krishnan, S.K., Abdel-Rahman, S.M. 2010. Comparative analysis of secreted enzymes between the anthropophilic-zoophilic sister species *Trichophyton tonsurans* and *Trichophyton equinum*. **Fungal Biology**, 114: 429 - 437.
- Sancak, A., Erdeger, J., Güvenç, T. 2000. Atlarda yaygın *Trichophyton verrucosum* infeksiyonunun tanı ve tedavisi. **Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi**, 47: 95-101.
- Shaqra, Q.A., AL-Jamaien, H., Zoubı, M. 2011. Isolation of soil dermatophytes from three distinct geographic locations in Jordan. **Fungal Ecology**, xxx: 1-3.
- Sharma, R., Rajak, R.C. 2003. Keratinophilic fungi: nature's keratin degrading machines. **Resonance**, 8: 28-40.
- Sharma, M., Sharma, Meenakshi. 2010. Incidence of dermatophytes and other keratinophilic fungi in the schools and college playground soils of Jaipur, India. **African Journal of Microbiology Research**, 24: 2647-2654.
- Sharon C.A., Muller, M., Zhou, J.Z., Wright, L.C., Sorrell, T.C. 1997. Phospholipase activity in *Cryptococcus neoformans*: a new virulence factor. **The Journal of Infectious Diseases**, 175: 414-420.
- Simpanya, M.F. 2000. Dermatophytes: Their taxonomy, ecology and pathogenicity. **Revista Iberoamericana de Micología**, 17: 1-12.
- Staib, P., Zaugg, C., Mignon, B., Weber, J., Grumbt, M., Pradervand, S., Harshman, K., Monod, M. 2010. Differential gene expression in the pathogenic dermatophyte *Arthroderma benhamiae* in vitro versus during infection. **Microbiology**, 156: 884-895.

- Susever, S. 2006. İnvazif mantar İnfeksiyonlarının Tanımlanmasında Moleküler Yöntemlerin Önemi; Uygulanması ve Geleneksel Yöntemler İle Karşılaştırılarak Değerlendirilmesi, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora tezi, İstanbul.
- Tanış, H., Cihangir, N. 2009. Klinik izolatlardan elde edilen *Trichophyton rubrum* ve *Trichophyton mentagrophytes*'in proteaz aktivitelerinin araştırılması. **Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Tıp Dergisi**, 3: 137-144.
- TEL, O.Y. 2005. Kedi ve Köpeklerden Dermatofitlerin İzolasyonu. Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Doktora tezi. Ankara.
- Topal, Ş., Pembeci, C., Batum, M., Borcaklı, M., Çeltik, Ö. 2000. Türkiye'nin tarımsal mikoflorasının endüstriyel öneme sahip bazı enzimatik aktivitelerinin incelenmesi-I: Amilaz, Proteaz, Lipaz. **Turkey Journal Biology** 24: 79-93.
- Tümbay, E. 1999. Temel ve klinik mikrobiyoloji. GüneşKitabevi, 1015-1159, Ankara.
- Vanbreuseghem, R. 1952. Keratin digestion by dermatophytes: a specific diagnostic method. **Mycologia** 44: 176-182.
- Viani, F.C., Viani, P.R.C., Rivera, I.N.G., Silva, E.G., Paula C.R., Gambale, W. 2007. Extracellular proteolytic activity and molecular analysis of *Microsporum canis* strains isolated from symptomatic and asymptomatic cats. **Revista Iberoamericana de Micología**, 24: 19-23.
- Weitzman, I., Summerbell, R.C. 1995. Dermatophytes. **Clinical Microbiology Review**, 8: 240-259.
- White, T.C. 2008. Generating and testing molecular hypotheses in the dermatophytes. **American Society for Microbiology**, 8: 1238-1244.
- Yücel, A.1999. Medical mycology: yesterday and today. **Cerrahpasa Journal of Medicine**, 2: 191-198.

Zaugg, C., Monod, M., Weber, J., Harshman, K., Pradervand, S., Thomas, J., Bueno, M., Giddey, K., Staib, P. 2009. Gene expression profiling in the human pathogenic dermatophyte *Trichophyton rubrum* during growth on proteins. **Eukaryotic Cell**, 2: 241-250.

EKLER



T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
GİRİŞİMSSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR
ETİK KURULU



Sayı : B.30.2.ADÜ.0.20.05.00/050.04- 63
Konu : Çalışmanız hk.

26.3.2012

Sayın, Doç.Dr. Halil BIYIK
ADÜ Fen-Edebiyat Fak.
Biyoloji Bölümü

Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun 22.03.2012 tarihinde yapılan olağan toplantısında çalışmanızla ilgili alınan 10 nolu karar ilişikte sunulmuştur.

Bilgilerinize sunarım.

Prof.Dr. M. Selim ÖZKÖK
Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi
Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar
Etik Kurul Başkanı

KARAR 10

Protokol No : 2012/42
Sorumlu Yürütücü : Doç.Dr. Halil BIYIK
ADÜ Fen-Edebiyat Fak.
Biyoloji Bölümü

ADÜ Fen ve Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Öğretim Üyesi Doç.Dr. Halil BIYIK'ın "Toprakta ve insandan izole edilen bazı dermatofitlerin moleküler tanısı" konulu yukarıda bilgileri verilen klinik araştırma başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezlerde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına oy birliğiyle karar verilmiştir.



Adres: Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı Merkez Kampüsü – Kepez Mevkii- AYDIN
Tel: 256- 225 31 66
Faks : 256-212 31 69

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Merve YAVUZ

Doğum Yeri ve Tarihi : Tekirdağ 03.08.1987

EĞİTİM DURUMU

Lisans Öğrenimi : Adnan Menderes Üniversitesi

Yüksek Lisans Öğrenimi : Adnan Menderes Üniversitesi

Yabancı Dil : İngilizce

BİLİMSEL FAALİYETLERİ

Çoban, E., Yavuz, M., Bıyık, H. Antibacterial effects against some pathogen bacteria of different disinfectants. Abstracts / Current Opinion in Biotechnology 22S (2011) S15–S152.

Bıyık, H., Çoban, E., Özdemir, G., Yavuz, M., Sertel, Y. Screening of antibacterial effects of isolated microfungi. Abstracts of the 15th European Congress on Biotechnology. Volume 29 supplement 23-26 september 2012 pages S230

Yavuz, M., Aşıcı, D. Doğadan Entomopatojenik Organizmaların İzole Edilmesi. 2. Entomopathogens and Microbial Control Symposium. 2009. Sözlü bildiri

İLETİŞİM

E-posta adresi : merveyavuzadu@gmail.com