



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ
ENSTİTÜSÜ**



***MICROSPORUM CANIS VE TRICHOPHYTON MENTAGROPHYTES TEŞHİSİNE
YÖNELİK LAMP KİTİ GELİŞTİRİLMESİ***

Gültekin ÜNAL

**MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

DANIŞMAN

Doç. Dr. H. Kaan MÜŞTAK

ANKARA

2019

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

***MICROSPORUM CANIS VE TRICHOPHYTON MENTAGROPHYTES TEŞHİSİNE
YÖNELİK LAMP KİTİ GELİŞTİRİLMESİ***

Gültekin ÜNAL

**MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

DANIŞMAN

Doç. Dr. H. Kaan MÜŞTAK

ANKARA

2019

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne

Yüksek Lisans tezi olarak hazırlayıp sunduğum “*Microsporum Canis* ve *Trichophyton Mentagrophytes* Teşhisine Yönelik Lamp Kiti Geliştirilmesi” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Gültekin Ünal

Tarih:

İmza:

KABUL VE ONAY

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Mikrobiyoloji Anabilim Dalında

Gültekin Ünal tarafından hazırlanan

“*Microsporum canis* ve *Trichophyton mentagrophytes* Teşhisine Yönelik Lamp Kiti
Geliştirilmesi” tez

çalışması aşağıdaki jüri tarafından TEZLİ YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak OY
BİRLİĞİ / OY ÇOKLUĞU ile

kabul/ret edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi

İmza

Unvanı Adı ve Soyadı

Üniversitesi

Jüri Başkanı

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

İmza

Unvanı Adı ve Soyadı

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

İÇİNDEKİLER

Etik beyan	ii
Kurul kararı	iii
İçindekiler	iv
Önsöz	vi
Simgeler ve kısaltmalar	vii
Şekiller	ix
Çizelgeler	x
1. GİRİŞ	1
1.1. Dermaotfitlerin Tarihçesi ve Klasifikasyonu	1
1.2. Etiyoloji	3
1.3. Epidemiyoloji	4
1.4. <i>Microsporum canis</i> ve <i>Trichophyton mentagrophytes</i> 'in teşhisi	5
1.5. Tedavi	7
1.6. Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP)	8
1.6.1. LAMP Yönteminin avantajları ve kullanım alanları	10
2. GEREÇ VE YÖNTEM	12
2.1. Gereç	12
2.1.1. Referans suşlar	12
2.1.2. <i>Microsporum canis</i> ve <i>Trichophyton mentagrophytes</i> saha izolatları	12
2.2. Yöntem	14
2.2.1. LAMP yönteminin tasarımı ve optimizasyonu	14
2.2.1.1. LAMP primerlerinin tasarımı	14
2.2.1.2. LAMP reaksiyonunun optimizasyonu	15
2.2.2. DNA eldesi	17
2.2.2.1. Optimizasyon aşamasında kullanılan suşlardan DNA ekstraksiyonu	17
2.2.2.2. Kıl örneklerinden DNA ekstraksiyonu	18
2.2.2.3. Kültür örneklerinden DNA ekstraksiyonu	18
2.2.3. Optimize edilen LAMP yönteminin validasyonu	19
2.2.3.1. Kültür örneklerine uygulanması	19
2.2.3.2. Kıl örneklerine uygulanması	19
2.2.3.3. Hazır nükleik asit örneklerine uygulanması	20
2.2.4. Geliştirilen yöntemin tespit limitinin belirlenmesi	20
2.2.4.1. Kıl örneklerinden tespit limitinin belirlenmesi	20
2.2.4.2. Kültür örneklerinden tespit limitinin belirlenmesi	21
2.2.4.3. DNA örneklerinden tespit limitinin belirlenmesi	21
2.2.5. Geliştirilen yöntemin özgüllük ve duyarlılığının belirlenmesi	21
2.2.6. Tekrarlanabilirlik	22
3. BULGULAR	23
3.1. LAMP Yönteminin Tasarımı ve Optimizasyonu	23
3.1.1. LAMP Primerlerinin tasarımı	23
3.1.2. LAMP reaksiyonunun optimizasyonu	25
3.2. DNA Eldesi	27
3.2.1. Optimizasyon aşamasında kullanılan suşlardan DNA ekstraksiyonu	27

3.2.2. Saha örneklerinden DNA ekstraksiyonu	27
3.3. Optimize Edilen LAMP Yönteminin Farklı Örneklerde Uygulanması	29
3.3.1. Kültür örneklerine uygulanması	29
3.3.2. Kıl örneklerine uygulanması	30
3.3.3. Hazır nükleik asitlere uygulanması	30
3.4. Tespit Limitinin Belirlenmesi	30
3.4.1. Kültür örneklerinden tespti limitinin belirlenmesi	30
3.4.2. Kıl örneklerinden tespit limitinin belirlenmesi	31
3.4.3. DNA örneklerinden tespit limitinin belirlenmesi	31
3.5. Spesifite ve Sensitivitenin Belirlenmesi	32
3.6. Tekrarlanabilirlik	32
4. TARTIŞMA	33
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	38
ÖZET	39
SUMMARY	40
KAYNAKLAR	41
ÖZGEÇMİŞ	45

ÖNSÖZ

Mantar hastalıkları, pet hayvanları arasında en sık rastlanan hastalıklardandır. Bunlar arasından da en sık görülenleri *Microsporum canis* ve *Trichophyton mentagrophytes* enfeksiyonlarıdır. Tüm dünyada yaygın olarak görülen bu hastalık ülkemizdeki pet hayvanları arasında da yaygındır. Etkene göre değişebilen ve uzun süren bir tedavisi bulunan bu enfeksiyonlar için geliştirilmiş aşılar da bulunmaktadır. Bu aşılar sadece tedavi amaçlı kullanılmakta ve koruyuculuk sağlayamamaktadır. Klinik olarak bu etkenlerin teşhisi konvansiyonel mikolojik yöntemler kullanılarak yapılmakta, bu yöntemlerin güvenilirliği ve doğrulukları birçok nedenden etkilendiği için sonuçlar yanıltıcı olabilmektedir.

Bu çalışmanın gerçekleştirilmesinde, değerli bilgilerini benimle paylaşan, kendisine ne zaman danışsam bana kıymetli zamanını ayırıp sabırla ve büyük bir ilgiyle bana faydalı olabilmek için elinden gelenden fazlasını sunan her sorun yaşadığımda yanına çekinmeden gidebildiğim Doç. Dr. Hamit Kaan MÜŞTAK'a teşekkürü bir borç biliyor ve şükranlarımı sunuyorum.

Çalışmalarım boyunca bilgi ve becerisi ile bana yardımcı olan Tajelser ADAM'a, Araş. Gör. Dr. İnci Başak MÜŞTAK'a, Öğr. Gör. Seyyide SARIÇAM'a ve Gizem ÖZEN'e, varlıklarıyla ve desteklerini üzerimden esirgemeyen Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji A.D. hocalarıma sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışmanın gerçekleşmesinde katkılarını esirgemeyen başta Mustafa Kolukırık ve Canan Ketre Kolukırık olmak üzere tüm Bioeksen Ar-Ge Ltd. Şti. çalışanlarına da ayrıca teşekkür ederim.

SİMGELER VE KISALTMALAR

%	Yüzde
A	Adenine
AG	Arabinogalactin
Bç	Baz çifti
B3	Geri dış primer
BIP	Geri iç primer
BLAST	Basic local alignment search tool
BLP	Geri döngü primer
BSA	Sığır serum albümini
Bst	Bacillus stearothermophilus
C	Sitozin
CFU	Bakteriyel üreme ünitesi
CI	Confidence interval
Dk	Dakika
DMSO	Dimetil sülfoksit
dNTP	Deoksinükleosit trifosfat
F3	İleri dış primer
FIP	İleri iç primer
FITC	Fluoresein isotiosiyanat
FLP	İleri loop primer
G	Guanin
g	Gram-g kuvveti
HCl	Hidroklorik asit
HNB	Hidroksi naftol mavisi
HPLC	Yüksek-performanslı likit kromatografi
ITS	Internal Transcribed Spacer
KCl	Potasyon hidroksit
Kg	Kilogram
L	Litre

LAMP	Loop-mediated isothermal amplification
LOD	Tespit limiti (Limit of detection)
LSU	Large subunit
μ	Mikro
M	Molar
m	Mol
MgCl ₂	Magnezyum klorür
mL	Millilitre
NaOH	Sodyum hidroksit
Nm	Nanometre
Ng	Nanogram
NTC	Negatif kontrol
°C	Santigrad
PEG	Polietilen glikol
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
PG	Peptidoglycan
pH	Asit/Baz derecesi
pg	Pikogram
ppm	Milyonda bir
rDNA	Ribozomal DNA
rRNA	Ribozomal RNA
rpm	Dakikadaki dönüş sayısı
T	Timin
Tm	Erime sıcaklığı
Tris	Hidroksimetil aminometan
sn	Saniye
UV	Ultraviyole

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. Jack russell cinsi bir köpekte dermatofitozis (<i>Trichophyton mentagrophytes</i>) olgusu.	3
Şekil 1.2. <i>Microsporum</i> ve <i>Trichophyton</i> cinslerine ait makrokonidya ve mikrokonidya yapıları.	6
Şekil 1.3. Lamp'ın tematik çalışma şeması.	9
Şekil 3.1. Negatif ve pozitif deney sonucu.	26
Şekil 3.2. <i>M.canis</i> için geliştirilen yöntemin duyarlılığı.	31
Şekil 3.3. <i>T.mentagrophytes</i> için geliştirilen yöntemin duyarlılığı.	31

ÇİZELGELER

Çizelge 2.1. Optimizasyon ve validasyon çalışmalarında hedef dışı örnek olarak kullanılan referans suşlar.	12
Çizelge 2.2. Özgüllük ve duyarlılığın belirlenmesi için kullanılan tablo.	23
Çizelge 3.1. Tasarlanan <i>M.canis</i> primerlerine ait diziler.	23
Çizelge 3.2. Tasarlanan <i>T.mentagrophytes</i> primerlerine ait diziler.	24
Çizelge 3.3. Optimize edilmiş LAMP reaksiyonu miks içeriği.	25
Çizelge 3.4. Optimizasyonda kullanılan suşlardan ekstrakte edilen Dna'ların saflıkları ve miktarları.	27
Çizelge 3.5. <i>M.canis</i> 'e ait dilüsyonlardan yapılan hızlı dna ekstraksiyonu yöntemine ait sonuçlar.	28
Çizelge 3.6. <i>T.mentagrophytes</i> ile kontamine edilen kıl numunesinden, hızlı dna ekstraksiyonu yöntemi sonucu ölçülen dna yoğunluğu.	28
Çizelge 3.7. <i>M.canis</i> 'e ait dna ekstraktlarının yoğunlukları.	29
Çizelge 3.8 <i>T.mentagrophytes</i> 'e ait ekstraktlarının yoğunlukları.	29
Çizelge 3.9. Hazır dna'lar ile yapılan LAMP duyarlılık ve özgüllük sonuçları.	32
Çizelge 3.10. Hızlı ekstraksiyon yöntemi ile kıl örneklerinden hazırlanan DNA'lar ile yapılan LAMP duyarlılık ve özgüllük sonuçları.	32

1. GİRİŞ

1.1. Dermaotfitlerin Tarihçesi ve Klasifikasyonu

Kayıtlı ilk mantar enfeksiyonunun, şu anki ismi mikotik misetom olan “padaval mika” olduğu ve M.Ö. 2000 ile 1000 yılları arasında Hindistan’da görüldüğü tahmin edilmektedir. Bu yıllardan sonra Hipokrat zamanında çeşitli bilim insanlarının da mikotik hastalıklarla ilgili çalışmaları bulunmaktadır (Ainsworth, 1976).

Mikotik etkenlerin mikroskopik özellikleri Hooke’un (1665) bileşik mikroskop aracılığıyla mantarları incelemesine kadar tam anlaşılamamıştır. Leuwenhook mayaların tomurcuklanarak üremesini incelemiştir. Micheli (1729), *Aspergillus*, *Botrytis* ve 900 farklı mantar türünü bulmuş olup mikolojinin babası olarak anılmaktadır (Kendrick, 2011). 1929 yılında Flemming, *Penicillium notatum*’dan kazara “Penicillin” elde etmiştir. Keşfettiği bu etken madde stafilokoklar üzerinde inhibitör etki göstermiş ve birçok hastalığın tedavisini sağlamıştır. Bu keşif mantarlara olan ilgiyi daha da arttırmıştır (Fleming, 1929).

Mantarlar sistematik olarak *linnean* hiyerarşisine göre Order (-ales), alt sınıf (-mycetidae), sınıf (-mycetes), alt filum (-mycotina), filum (-mycota; Microsporidia hariç) gibi ekler almakta, alt alem ve alem eki almamaktadır. Mantarlar morfolojilerine göre üç ana gruba ayrılmaktadır. Bunlar maya, küf ve maya benzeri form olarak adlandırılmaktadır (Gil-Lamaignere ve ark., 2003; Samanta, 2015).

Mantar aleminin yaklaşık yüz kadarı patojenik olarak değerlendirilip, insan ve hayvanda hastalık yaptığı bildirilmiştir. Patojenik önemi bulunan mantar alemi yaklaşık olarak 250.000’den fazla tür içermektedir. Mantar alemi 6 adet şubeye bölünmüştür. Bunlar; *Ascomycota*, *Basidiomycota*, *Chytridiomycota*, *Zygomycota*, *Microsporidiomycota* ve *Glomeromycota*’dır. Bu şubelerin içinde bazılarının medikal ve veteriner patojen olarak değeri bulunmamaktadır. Bunlar *Chytridiomycota* ve *Glomeromycota* şubesine ait türlerdir (Markey ve ark., 2013).

Mantarlar, seksüel ve aseksüel olmak üzere iki ana şekilde üreme göstermektedirler. Seksüel olan üremede spor oluşturan etkenler ana hücreden ayrılarak farklı bir yerde bireysel bir mantar kolonisi oluşturarak üremektedir. Bu üreme şeklinde birbirine uygun dişi ve erkek hücreler bulunmaktadır. Aseksüel üreme şeklinde ise bir seks organı ya da çekirdek oluşmaz. Bunun yerine ana hücrenin ayrışması, tomurcuklanma, tomurcuğu büyümesi, hifanın parçalanması, spor formasyonu oluşması şeklindedir (Samanta, 2015).

Medikal ve veteriner mikoloji, insan ve hayvanlardaki mikolojik hastalıkları inceleyen bilim dallarıdır. Mikozis terimi insanlarda, hayvanlarda ve bitkilerde patojen mantarların yaptığı hastalığı tanımlamaktadır. Toksinlerin vücut dışından canlı hücre içine alınmasına ise mikotoksikozis adı verilmektedir (Samanta, 2015).

Mikozisler oluştuğu yere göre ise süperfisiyal mikozlar, kutanöz mikozlar, subkutanöz mikozlar, derin (sistemik) mikozlar olarak sınıflandırılmaktadır (Hibbett ve ark., 2007).

Hayvanlarda en çok hastalık yapan mantar etkenleri dermatofitlerdir. Bu etkenler gelişmek için keratin tabakasına ihtiyaç duymaktadır. Bu keratin ihtiyacından dolayı genellikle tırnak, saç, kıl ve deri gibi yapılarda gözlenmektedirler. Dermatofitlerin yaptıkları hastalıklara “dermatofitozis” (Şekil.1) denilmektedir (Markey ve ark., 2013).



Şekil 1.1. Jack Russell cinsi bir köpekte dermatofitozis (*Trichophyton mentagrophytes*) olgusu (Bond, 2010).

1.2. Etiyoloji

Dermatofitler, *Ascomycota* filumu, *Euascmycetes* sınıfı, *Onygenales* takımı, *Arthrodermataceae* ailesinde bulunmaktadır. Aseksüel özelliklerine göre *Microsporum*, *Trichophyton* ve *Epidermophyton* cinslerine ayrılan dermatofit etkenleri konakta deri, kıl, tüy, boynuz, toynak, tırnak, pençe gibi organları enfekte etmektedir (Samanta, 2015). Bunlar içerisinde kedi ve köpeklerden en çok izole edilen en önemli dermatofit etkenleri *Microsporum canis*, (Bond, 2010; Cabanes ve ark., 1997; Chermette ve ark., 2008; Tel ve Akan, 2008) ve *Trichophyton mentagrophytes*'tir (Bond, 2010; Nweze, 2011; Sparkes ve ark., 1993).

Microsporum cinsi 18 tür içermektedir. *Microsporum* cinsi hem seksüel hem de aseksüel üreme gösterebilmektedir. Aseksüel üreme için konidia adı verilen sporları oluştururlar. Bu makrokonidiaların boyutları 6-160 μm $\times$ 6-25 μm arasında değişmektedir. Genel olarak antijeniteden sorumlu endoproteaz, pseudokinaz, ekzoproteaz gibi enzimler üretirler. Kedi ve köpek gibi pet hayvanları arasında en çok görüleni *Microsporum canis*'tir (Tel ve Akan, 2008). Sikloheksimid, kloramfenikol veya gentamisin eklenmiş Sabouraud Dekstroz Agar'da 25-30°C'de yaklaşık iki

haftada üreme gösterir. Agarda koloniler büyük, düzenli ve düzensiz dağılım ve farklı pigmentasyonlar gösterdiği için Dermatophyte Test Medium (DTM) *Microsporum* üretmek için uygun değildir (Markey ve ark., 2013; Samanta, 2015).

Trichophyton cinsi 25 tür içermektedir. Bu türler seksüel (teleomorfik) olarak farklı kompleksler içerisinde sınıflandırılmaktadır. Morfolojik olarak yapay kültürlerde farklı tipte hifalar (spiral, tenis raketi hifa vb.) görülebilmektedir. Bir hifa, yapısında genetik olarak ayrılmış çekirdekler içermektedir. Bunun yanı sıra tek çekirdekli konidiyalar da bulunmaktadır. Yapısında makro ve mikrokonidiyalar bulunmakta ve makrokonidiyaların uzunluğu 100 µm'ye kadar ulaşabilmektedir. Antijeniteden sorumlu enzimler keratinaz ve çinko metaloproteaz ailesinde bulunmaktadır (Samanta, 2015).

1.3. Epidemiyoloji

Memelilerde ve kuşlarda 30 farklı mantar cinsi dermatofitozise neden olabilmektedir. Bunlardan bazıları ve en sık görüldüğü hayvan grupları; *Microsporum canis* (genellikle kedi, köpek), *M.gypseum* (köpek), *Trichophyton verrucosum* (sığır, küçük ruminant), *M.equinum* (equidae), *T.mentagrophytes* (kedi, köpek), *T.mentagrophytes* var. *T.erinacei* (av köpekleri)'dir. Günümüzde hayvanlar ile insan ilişkilerinin artması ve bu etkenlerin insanlarda da enfeksiyona sebebiyet vermesi dermatofitlerin zoonotik önemini arttırmaktadır (Bond, 2010; Chermette ve ark., 2008).

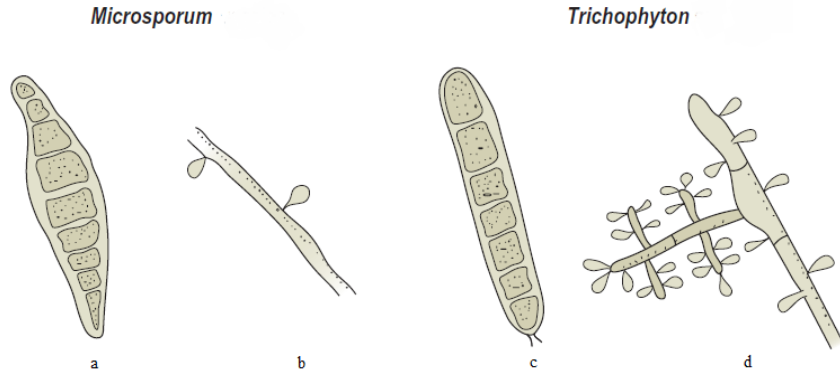
Uzun süreli antibiyotik kullanımı, bağışıklık düşüklüğü, eş zamanlı enfeksiyonlar, deri ve muköz membranların bütünlüğünün bozulması, nemli bölgelerin fazla etkene maruz kalması gibi sebepler ile ortaya çıkan *T.mentagrophytes* ve *M.canis* enfeksiyonları, yüzeysel deri enfeksiyonları, alerjik reaksiyonlar, generalize kutanöz enfeksiyonlar, invaziv kutanöz enfeksiyonlar ve nadiren generalize enfeksiyonlara sebep olmaktadır (Howard, 1983). Bu etkenlerin neden olduğu enfeksiyonlarda genellikle klasik yuvarlak ringworm lezyonu (alopeci) görülmektedir.

Bunun haricinde uzun süren enfeksiyonlarda generalize lezyonlar, nodüler ya da tümöral lezyonlar (kerion)'da görülebilmektedir (Markey ve ark., 2013).

1.4. *Microsporum canis* ve *Trichophyton mentagrophytes*'in teşhisi

Dermatofitlerin teşhisi ve izolasyonu, uluslararası altın standart olarak kabul edilen konvansiyonel mikolojik teşhis yöntemi ile yapılmaktadır. İzolasyon için farklı antibiyotik formülasyonları ve kimyasal içerikleri barındıran Saboraud Dekstroza Agar (SDA) kullanılmaktadır. Identifikasyon; SDA'da üreme, makroskopik özelliklerine (koloni morfolojisi, rengi, üreme süresi gibi) ve mikroskopik morfolojik özelliklerine göre yapılmaktadır. Steril olarak alınan kıl örneği SDA'ya ekilerek genellikle 25°C'de 7-21 gün inkübasyona bırakılır ve bu süre sonunda değerlendirilir. Mikroskopik teşhiste mikoloji atlasları kullanılmaktadır (Campbell ve Johnson, 2013; Markey ve ark., 2013). Diğer konvansiyonel mikolojik teşhis yöntemleri; yayma preparat, ıslak kapama (wet mount), florasan boyama, lam kültür tekniği, germ tüpü testi, kıl perforasyon testi, kıl tuzağı yöntemi, wood lambası, deney hayvanı inokülasyonu ve serolojik yöntemlerdir (Samanta, 2015).

M.canis agarda hızlı ürer, beyaz ve ipeksi merkez ve çevresinde sarı bir hale oluşturur. Agarın diğer tarafından bakıldığında sarı ya da turuncu renkler görülmektedir. Mikroskopik olarak da genellikle yoğun miktarda makrokonidiya yapısı içermektedir. Bu konidiya yapıları iğsi yapıda olgun sporları içerir. Hücreler, 8-20 × 40-150 µm boyutlarında olup, az miktarda mikrokonidiya içermektedir (Samanta, 2015). *T.mentagrophytes* agarda hızlı ürer. Kültürlerinde aşırı pleomorfizm görülmektedir. Bu morfolojik pleomorfizm yüzeydeki miselyal antenlerin oluşturduğu beyaz kabarıklıklar oluşmasına neden olur. Bunun sonucunda da karakteristik pigmentasyon ve konidiya yapıları ortaya çıkmaktadır (Samanta, 2015).



Şekil 1.2. *Microsporum* ve *Trichophyton* cinslerine ait makrokonidya ve mikrokonidya yapıları (a: *Microsporum* makrokonidyası, b: *Microsporum* mikrokonidyası, c: *Trichophyton* makrokonidyası, d: *Trichophyton* mikrokonidyası) (Markey ve ark., 2013).

T.mentagrophytes ve *M.canis* etkenlerinin teşhisinde genellikle derideki lezyonlar değerlendirilmektedir. Laboratuvar teşhisinde sıklıkla Wood lambası, %10-20’lik KOH ile yapılan direkt mikroskopik kıl muayenesi ve kültür yöntemi kullanılmaktadır (Bond, 2010). “Altın standart” olan mikolojik ekim yönteminde ise genellikle SDA kullanılmaktadır. Bu yöntemde kültüre edilen klinik materyal yaklaşık 7-14 gün süren inkübasyon periyodu sonunda mikroskopik ve makroskopik morfolojilerine göre, resimli mantar atlasları ile karşılaştırmak suretiyle subjektif olarak teşhis edilmektedir. Bu yöntemin dezavantajları bazı dermatofitlerin besi yerlerinde ürememesi, ekim sonrası yapılan makroskopik ve mikroskopik incelemede operatörün subjektif görüşüne dayanan teşhis yapılması ve yapılan bu teşhisin de uzmanlık gerektirmesidir. Bunların yanısıra mantarlardaki bazı geçiş formlarını değerlendirirken hata yapılması, bazı türlerin de spesifik besi yeri ihtiyacının bulunması ve en önemlisi teşhisin gerçekleşmesi için geçen sürenin yaklaşık 7-14 gün olması diğer önemli dezavantajlarından (Pedersen ve ark., 2015).

Konvansiyonel ekim yöntemi gibi yöntemlerin dezavantajlarından dolayı günümüzde nükleik asit temelli yöntemler daha sık başvurulanan yöntemlerdir. Dermatofit etkenlerinin taranmasında kullanılan moleküler yöntemlerin büyük bir

çoğunluğu polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) tabanlıdır. PCR tabanlı yöntemler hedef DNA'nın yüksek miktarda kopyalanmasını, tespitini ve bazen de sekans analizi yardımıyla da genetik fragmanlar şeklinde tanımlanmasını sağlamaktadır. PCR, korunmuş bölgelerin amplifikasyonu ile tür tayini-tespitinin yanı sıra, virülans ve antifungal direnç genlerinin tespiti için de kullanılmaktadır (Cafarchia ve ark., 2013). Konvansiyonel PCR (Faggi ve ark., 2001), real-time kantitatif-PCR (Arabatzis ve ark., 2007), nested PCR (Verrier ve ark., 2012), ITS bölge sekansı (Makimura ve ark., 1999) bazı teşhis yöntemleri *T.mentagrophytes* ve *M.canis* teşhisinde sık tercih edilen diğer moleküler yöntemlerdendir.

1.5. Tedavi

Deri ve kıl hücrelerinde yüksek miktarda bulunan *T.mentagrophytes* ve *M.canis* etkenleri direkt temas, hava, vektörler ve enfekte materyallerin/aletlerin kullanımı ile yayılmaktadır. Enfeksiyonun oluşmasında en önemli çevresel etkenler sıcaklık ve nemdir. Bu durumdan sonra enfeksiyonun oluşması 1-3 hafta arası sürebilmektedir (Michaud, 2011).

Günümüzde *T.mentagrophytes* ve *M.canis* tedavisi için topikal olarak veteriner hekimlikte kullanılan, enilkonazol ve mikokonazol içeren preparatlar bulunmaktadır. Topikal olan bu tedavide amaç hayvan ve halk sağlığı açısından riskli olan etkenlerin etrafa saçılmasını önlemektir. Etkenin tedavisi için ayrıca oral olarak terbinafine kullanılmaktadır. En çok kullanılan etken maddeler mikokonazol, ekonazol, ketokonazol, itrakonazol ve tiyobendazol'dur. Bunların yanı sıra terbinafin, flukonazol ve itrakonazol diğer etken maddelere sahip ilaçlar bulunamadığında alternatif olarak kullanılabilir (McVey ve Kennedy, 2013). Bu tedavilerin yansıra kedi ve köpeklerde, *Microsporum* ve *Trichophyton* genuslarına spesifik canlı, attenüe aşı bulunmaktadır. Bu aşı hücresel immün yanıtı arttırarak iyileşme süresini kısaltmaktadır. Koruyucu etkisi bulunmamaktadır (McVey ve Kennedy, 2013).

1.6. Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP)

Günümüzde birçok nükleik asit amplifikasyon metodu geliştirilmiştir. Genellikle PCR tabanlı yöntemler kullanılsa da, alternatif olarak *nucleic acid sequence-based amplification* (NASBA), *self-sustained sequence replication* (3SR) ve *strand displacement amplification* (SDA) gibi amplifikasyon yöntemleri de geliştirilmiştir. Bu yöntemlerin kendi içlerinde çalışma prensipleri değişiklik gösterse de özgüllükleri ve duyarlılıkları ile ilgili bazı dezavantajlar barındırmaktadırlar. 2000 yılında geliştirilen LAMP yöntemi ise hem düşük sıcaklıkta, hem de yüksek duyarlılık ve özgüllükte özel bir çoğaltıcı cihaz bulunmadığı laboratuvar ortamında nükleik asit amplifikasyonu yapılabilmektedir (Notomi ve ark., 2000; Notomi ve ark., 2015).

LAMP testi, belirli bir ısıda gerçekleşen, termal döngü cihazına ihtiyaç duymayan, etken genomundaki korunmuş bölgeyi hedefleyen 3-4 çift primer tarafından gerçekleştirilen, *Bacillus stearothermophilus*'den elde edilen Bst polimeraz isimli enzimin kullanıldığı bir amplifikasyon yöntemidir. Kullanılan Bst polimeraz enzimi zincir yerdeğiştirebilme aktivitesine sahip olduğundan reaksiyon izotermal koşullarda gerçekleşmektedir (Şekil 1.3.) (Chang ve ark., 2012).

Reaksiyonu tamamlanmış LAMP deneylerini tek tüpte, nitel olarak değerlendirebilmek amacıyla çeşitli yöntemler geliştirilmiştir (Notomi ve ark. 2000, 2015). Bu yöntemlerde bulanıklığın ölçülmesi, çeşitli florasan boyalar ile DNA'nın görünür hale getirilmesi ve florasan barındırmayan renk değişimleri sağlayan kimyasallar kullanılmaktadır (Mori ve ark., 2001; Notomi ve ark., 2015). LAMP testinde DNA'nın indirekt olarak görünür hale gelmesi, kompleksometrik floresan metal indikatörü HNB (Hidroksi naftol mavisi) ve DNA biyosentezi sonrasında ortaya çıkan Mg^{++} iyonları ile tepkimeye girmesi sonucu oluşan renk değişimi ile sağlanır. Bu yöntem diğer yöntemlere moleküler yöntemlere göre tüplerin açılmasını gerektirmediğinden kontaminasyon riskini sıfıra indirmekte, gözle değerlendirme yapıldığından da kolay uygulanabilir ve hızlı sonuçlanan bir test olarak göze çarpmaktadır. Bu yüzden günümüzde en çok kullanılan LAMP değerlendirme yöntemlerinden biridir (Goto ve ark., 2009; Mori ve ark., 2001).

nükleik asit bulunmakta ve bu nükleik asitler çeşitli görüntüleme metodlarıyla tespit edilebilmektedir (Nagamine ve ark., 2002; Notomi ve ark., 2000).

1.6.1. LAMP Yönteminin avantajları ve kullanım alanları

Klasik moleküler yöntemlere kıyasla birçok avantajı olduğu için son zamanlarda önem kazanan bu yöntem, izotermal bir nükleik asit amplifikasyon tekniğidir. Ortamdaki enzim aktivitesi sonucu ortaya çıkan yoğun DNA molekülünü amplifikasyonun bir yan ürünü olarak ortaya çıkan Mg^{++} iyonlarının artması ve HNB ile tepkimeye girmesi sonucu oluşan gökyüzü mavisi rengi ile ayırt edilir. Ayrıca farklı boyalar kullanılarak renk değişimi doğrudan çıplak göz ya da UV ışığı yardımıyla tespit edilebilmektedir (Khan ve ark., 2017; Scheel ve ark., 2014).

LAMP, numuneden gelen inhibitörlerden çok az miktarda etkilendiğinden, hem direkt olarak klinik numuneden çalışılabilmekte hem de tespit duyarlılığı PCR temelli yöntemlerden daha yüksek olmaktadır (Aliotta ve ark., 1996). Diagnostik bir test olarak LAMP, bakterilerde (Garrido-maestu ve ark., 2017; Mitsuko ve ark., 2018) denenmiş, ayrıca mantarlardan *Aspergillus fumigatus* (Tang ve ark., 2016), *Ochroconis gallopava*, (Ohuri ve ark., 2006) *Fusarium* spp. (Souza ve ark., 2017) ve dermatofitlerden sadece *T. tonsurans*'ın (Yo ve ark., 2016) teşhisinde kullanılmış ve PCR'a göre daha iyi sonuçlar alındığı belirtilmektedir.

Rutin olarak veteriner kliniklerinde hasta başında yapılabilecek moleküler tabanlı bir test olan LAMP yöntemi, yüksek maliyetli cihaz gereksinimi olmayışı, yüksek oranda duyarlı ve özgül olması, tekrarlanabilirliği, direkt olarak klinik numuneden kısa sürede (30-60 dk) sonuç vermesi, sonuçların konvansiyonel yöntemlere göre objektif değerlendirilebilmesi ve uzman teknisyen ihtiyacını ortadan kaldırması açısından önemli bir hızlı tanı yöntemidir (Tang ve ark., 2016).

Bu tez çalışmasında, veteriner kliniklerinde, mikrobiyoloji laboratuvarlarında ve sahada uygulanabilir, maliyeti düşük bir LAMP tanı kiti geliştirilmesi hedeflenmiştir. Bu çalışma ile dünyada ilk kez, sahada direkt klinik örnekten *T.mentagrophytes* ve *M.canis*'in teşhisine yönelik bir LAMP tanı kiti geliştirilmesi amaçlanmıştır.



2. GEREÇ ve YÖNTEM

2.1. Gereç

2.1.1. Referans suşlar

Bu tez çalışmasında geliştirilen yöntemin optimizasyonu ve validasyonu için pozitif kontrol olarak kullanılan referans suşlar *Microsporum canis* CBS 566.80 ve *Trichophyton mentagrophytes* CBS 106.67'dir. Suşlar agar üzerinde üremiş şekilde tedarik edildi. Optimizasyon ve validasyon çalışmalarında hedef dışı olarak kullanılan referans suşlar Çizelge 2.1.'de gösterilmiştir.

Çizelge 2.1. Optimizasyon ve validasyon çalışmalarında hedef dışı örnek olarak kullanılan referans suşlar.

Suş İsmi	Suş Numarası
<i>Trichophyton tonsurans</i>	CBS 112818
<i>Trichophyton rubrum</i>	CBS 118892
<i>Nannizzia gypseum</i>	CBS 118893
<i>Aspergillus niger</i>	CBS 513.88
<i>Candida albicans</i>	CBS 562
<i>Rhizopus oryzae</i>	CBS 257.28
<i>Histoplasma capsulatum</i>	CBS 136.72
<i>Fusarium solanii</i>	CBS 490.63
<i>Alternaria alternata</i>	CBS 916.96
<i>Malessezia pachydermatitis</i>	CBS 1879

2.1.2. *Microsporum canis* ve *Trichophyton mentagrophytes* saha izolatları

Tez çalışmasında geliştirilen yöntemin saha örnekleri ile validasyonu amacıyla Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı kültür koleksiyonunda bulunan, konvansiyonel mikolojik ekimi ile doğrulanmış 64 adet

M.canis ve 44 adet *T.mentagrophytes* olmak üzere toplam 108 adet suşa ait, önceden ekstrakte edilerek saklanmış DNA'lar kullanıldı.

Bu izolatlara ait DNA'ların haricinde yine validasyon çalışmalarında kullanılmak üzere, 2014-2018 yılları arasında Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı rutin klinik laboratuvarına mantar muayenesi amacıyla gönderilmiş hayvanlardan elde edilen, konvansiyonel mikolojik kültür yöntemi ile mantar teşhisi konulmuş ve -80°C'de saklanmış, 100 adet kıl örneği (20 adedi *M.canis*, 13 adedi *T.mentagrophytes* pozitif olup 67 adedi ise *M.canis* ve *T.mentagrophytes* negatif) seçildi. Bu 67 suş içerisinde ise 12 adedi *Alternaria* spp., 30 adedi *Aspergillus* spp., 3 adedi *Blastomyces* spp., 4 adedi *Candida* spp., 4 adedi *Cryptococcus* spp., *Fusarium* spp., 5 adedi *Histoplasma* spp., 4 adedi *Microsporum* spp., 1 adedi *Mucor* spp., 2 adedi *Penicillium* spp., 5 adedi *Rhizopus* spp., 2 adedi *Sporotrix* spp., 15 adedi *Trichophyton* spp.'dir.

Elde edilen yöntemin direkt saha materyalinde tespit limitini belirlemek amacıyla, *M.canis* ve *T.mentagrophytes* yönünden negatif olduğu bilinen 100 adet kıl örneğinden, rastgele seçilen 20 adedi kullanıldı.

2.2. Yöntem

2.2.1. LAMP yönteminin tasarımı ve optimizasyonu

2.2.1.1. LAMP primerlerinin tasarımı

Bu amaçla, *M.canis* ve *T.mentagrophytes*'in her ikisinde de bulunan 3592 bp uzunluğunda, korunmuş gen bölgesi olan “*Chitin Synthase-1 (CHS-1)*” geni seçildi. Bu bölge, hücre duvarı yapısında bulunan selüloz benzeri polisakkariti sentezlemekle görevli olup dermatofitler dahil bir çok mantar türünde de bulunmaktadır. Bu bölgenin *M.canis* ve *T.mentagrophytes*'i diğer mantarlardan ayırmada özgül bir bölge olduğu literatürlerden (Garg ve ark., 2007; Kano, 2004; Kano ve ark., 1997; Kano ve ark., 2000; Tiryaki ve ark., 2015) anlaşılmaktadır.

M.canis ve *T.mentagrophytes*'in her ikisinde de bulunan *CHS-1* bölgesinin belirli alanlarını hedef alan LAMP primerlerinin tasarlanması için, bu gen bölgesinin farklı dizileri “National Center of Biotechnology Information” websitesinde bulunan GenBank’tan (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) elde edildi. Varolan DNA dizilerinden, *M.canis* için referans genom “*Microsporum canis* chitin synthase 1 CBS 113480” (Genbank No: XM_002843156), “*Microsporum canis* CDM chitin synthase 1 gene partial” (Genbank No: FJ897700) ve “*Microsporum canis* gene for chitin synthase 1 partial cds” (Genbank No: AB003563); *T.mentagrophytes* için ise “*Trichophyton mentagrophytes* strain CDM 15 chitin synthase 1 gene, partial cds” (Genbank No: FJ897705), “*Trichophyton mentagrophytes* strain FZ1405 chitin synthase 1 (CHS) gene, partial cds” (Genbank No: KM355549) ve “*Trichophyton mentagrophytes* strain CDM 7 chitin synthase 1 gene, partial cds” (Genbank No: FJ897704) seçildi. Bu gen dizileri CLC Main Workbench vs. 6 (Qiagen Bioinformatics, Danimarka) programı ile alt alta sıralanarak türe özgü varyasyonların en az olduğu, mutasyonların olmadığı ve diğer mantar etkenleri ile çapraz reaksiyon göstermeyecek özgül bölgeler belirlendi.

LAMP primerlerinin tasarlanması için Eiken Chemical Co. Ltd (Tokyo, Japon)'ye ait internet sitesinde bulunan PrimerExplorer V.5 (<http://primerexplorer.jp>, 2018) online programı, primerlerin test edilmesi için ise Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3/>) online programı ve CLC Main Workbench vs. 6 (Qiagen Bioinformatics, Danimarka) programları kullanıldı. Primerlerin tasarımı sırasında mutasyon olan bölgeler program üzerinde işaretlenerek bu noktaların dışını hedefleyerek primer tasarımı yapıldı. Loop primerlerinin tasarlanması için ise Nagamine ve ark. (2002)'nin kullandığı yöntem kullanılarak aynı primer tasarım programları ile hazırlanan 6 adet [2 dış (F3, B3), 2 iç (FIB, BIP) ve 2 döngü (L-F, L-B)] primer tasarlandı.

Bu gen bölgesine özgü tasarlanan primerler 3 farklı alternatif şeklinde, her etken için ayrı ayrı tasarlandı. Her hedef (*M.canis* ve *T.mentagrophytes*) için tasarlanan primer çiftlerinden 5'mer/3'mer stabiliteyi en yüksek olanlar ve $\Delta G \leq -4$ kcal/mol ve primer-dimer oluşturma oranları en düşük olanlardan ve primerlerin bağlandığı ve çoğalttığı en büyük bölgeye ait ürün boyutu 200 nükleotidi geçmeyecek şekilde tasarlandı. In siliko testleri, NCBI'nin internet sitesinde bulunan primer BLAST veritabanında ve "primer3" programı yardımıyla yapıldı.

2.2.1.2. LAMP reaksiyonunun optimizasyonu

Optimizasyonun tüm aşamalarında, yüksek duyarlılıkta çalıştığı bilinen "Bst DNA polymerase 2.0 Warmstart (New England BioLabs, Sumida, Tokyo, Japan) enzimi kullanıldı. Spesifik DNA ürününü görünür hale getirmek için reaksiyonu inhibe etmediği bilinen kalsiyum metal indikatörü "hydroxy naphthol blue" (HNB) (Sigma-Aldrich Corporation, USA) kullanıldı (Goto ve ark., 2009).

Reaksiyon içeriği, primer konsantrasyonları ve reaksiyon süresi Bst polimeraz enzimi için New England BioLabs internet sitesinde (<https://international.neb.com>) verilmiş olan reaksiyon koşullarına göre yapıldı. LAMP reaksiyon karışımı 25 µl

hacminde olup şu bileşenleri içermektedir: 6 mg/ml BSA, 20 mg/ml PEG 400, %0,25 Tween 20, 15 mM peptit kompleksi, 20 mM Tris-HCl pH 8, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP mix, 0,1 U Bst DNA Polimeraz, 120 µM HNB. 25 µl'lik reaksiyona konsantrasyonları 40 µM FIP, 40 µM BIP, 5 µM F3, 5 µM B3, 10 µM Loop-F, 10 µM Loop-B1 olacak şekilde primerler ve 10 µl nükleik asit izolatu eklenmiştir. Tasarlanan üç farklı primer setine, hazırlanan bu miks uygulanarak optimizasyonun diğerk aşamalarına en uygun primer seti ile devam edildi. İki etken ve primer seti için tüm deneyler, enzim üreticisinin belirttiği optimum sıcaklık olan 65°C'de gerçekleştirildi. Ticari kit ile *Microsporium canis* CBS 566.80 ve *Trichophyton mentagrophytes* CBS 106.67'a suşlarından ekstraksiyonu yapılmış DNA ekstraktları tüm deneylerde pozitif kontrol olarak kullanıldı.

Tüm deneylerdeki LAMP rnleri HNB sayesinde çıplak göz ile değerlendirildi. Bir testin pozitif olarak değerlendirilebilmesi için mor renkli reaksiyon karışımının, gökyüzü mavisi renge dönmesi beklendi. LAMP deneyinin değerlendirilmesi için tüpler beyaz kağıt önünde değerlendirildi. Bir deneyin geçerli sayılabilmesi için negatif kontrol olarak kullanılan tüpte herhangi bir reaksiyon gözlenmemesi beklendi. Negatif kontrolde pozitiflik saptandığı taktirde test tekrarlandı. Negatif kontrol olarak moleküler ölçekli su kullanıldı.

Enzim sağlayıcısının direktifleri doğrultusunda hazırlanan LAMP karışımı her etken için hazırlanan üç farklı primer seti için, 65°C sabit sıcaklıkta 60 dk test edildi. Bu deney her 15 dk sonunda göz ile değerlendirildi. Elde edilen sonuca göre seçilen primer seti ve optimum reaksiyon süresi diğerk aşamalarda kullanıldı.

2.2.2. DNA eldesi

2.2.2.1. Optimizasyon aşamasında kullanılan suşlardan DNA ekstraksiyonu

İki ayrı hedef etken için oluşturulan iki ayrı yöntemin optimizasyonunda, *Microsporum canis* CBS 566.80 ve *Trichophyton mentagrophytes* CBS 106.67'a ait standart suşlar ve Tablo 2.1.1.'deki referans suşlardan Quick-DNA™ Fungal/Bacterial Miniprep kiti (Catalog No. D6005, Zymo Research Corp., U.S.A.) ile üretici firmanın direktiflerine göre şu şekilde yapıldı:

- 1- 200 µl içerisine agar üzerindeki koloniden 2-4 cm²'lik parça alındı ve vortekslendi.
- 2- Bu karışım ZR BashingBead™ Lysis tüpüne eklenerek üzerine 750 µl BashingBead™ Buffer eklendi. Minimum 5 dk vortekslendi.
- 3- ZR BashingBead™ Lysis tüpü 10,000 g'de 1 dk santrifüj edildi.
- 4- 400 µl süpernatant Zymo-Spin™ III-F kolonu ve toplama tüpüne sonrasında 8,000 g'de 1 dk santrifüj edildi.
- 5- Kolondan 1,200 µl Genomic Lysis Buffer geçirildi ve 8000 g'de 1 dk santrifüj edildi.
- 6- Tüpte kalan sıvı toplama tüpü içerisindeki Zymo-Spin™ IICR kolonuna alındı ve 10,000 g'de 1 dk santrifüj edildi.
- 7- 200 µl DNA Pre-Wash Buffer kolona eklendi ve alta geçen süpernatant atıldıktan sonra 10,000 g'de 1 dk santrifüj edildi.
- 8- 500 µl g-DNA Wash Buffer kolona eklendi ve alta geçen süpernatant atıldıktan sonra 10,000 g'de 1 dk santrifüj edildi.
- 9- Kolon 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne alındı ve üzerine 100 µl DNA elüsyon bufferı eklendi. Sonrasına 10,000 g'de 30 saniye santrifüj edildi.
- 10- DNA ekstraksiyonu sonrasında örneklerin spektrofotometre yardımıyla saflıkları (A_{260}/A_{280}) ve konsantrasyonları ölçüldü. Minimum 50 ng/µl, A_{260}/A_{280} değeri 1,6-2,0 aralığında olan izolatlar analizlerde kullanıldı.

2.2.2.2. Kıl örneklerinden DNA ekstraksiyonu

Kıl örneklerinden ekstraksiyon yapılması amacıyla Kolukırık ve ark. (2012) ile Zhang ve ark. (2010)'nın kullandıkları yöntem, çalışmada hedeflenen iki etkene göre modifiye edilerek kullanıldı. Bu yöntemle göre DNA izolasyonu yapılırken, doğrudan kıl örneğinden minimum 5 adet olacak şekilde; 200 µl'lik (6 mg/ml BSA, 20 mg/ml PEG 400, %0,25 Tween 20, 15 mM peptit kompleksi, 20 mM Tris-HCl pH 8,0) solüsyonu içerisine eklendi. Sonrasında bu karışım 10 dk vorkteslendi ve 15 dk 85°C'de inkübe edilerek nükleik asit izolasyonu tamamlandı.

DNA ekstraksiyonu sonrasında örneklerin spektrofotometre yardımıyla saflıkları (A_{260}/A_{280}) ve konsantrasyonları ölçüldü. Miktarı yaklaşık 50 ng/µl, A_{260}/A_{280} değeri 1,6-2,0 aralığında olan izolatlar analizlerde kullanıldı. Nükleik asit miktarı fazla olan örnekler 50 ng/µl olacak şekilde DNaz/Nükleaz içermeyen moleküler ölçekli su ile dilüe edildi. Ekstraksiyon sonrası ölçümlerde yoğunluğu 1-50 ng/µl arası çıkan örneklerde orijinal yoğunluk kullanıldı. Standardize edilen örneklerden her biri için 10 µl LAMP reaksiyonuna eklenerek denendi.

2.2.2.3. Kültür örneklerinden DNA ekstraksiyonu

Kültür örneklerinden ekstraksiyon yapılması amacıyla Kolukırık ve ark. (2012) ile Zhang ve ark. (2010)'nın kullandıkları yöntem, çalışmada hedeflenen iki etkene göre modifiye edilen yöntem kültür örneklerine uyarlandı. Bu yöntemle göre DNA izolasyonu yapılırken, doğrudan agar üzerinde üremiş örneğinden 2-4 cm³'lük bir bölge bistüri yardımıyla kesildi ve spatula yardımıyla 2 ml'lik mikrosantrifüj tüpü içerisine alındı. Üzerine 200 µl'lik (6 mg/ml BSA, 20 mg/ml PEG 400, %0,25 Tween 20, 15 mM peptit kompleksi, 20 mM Tris-HCl pH 8,0) solüsyon içerisinde çözüldü 10 dk vorkteslendi ve sonrasında 15 dk 85°C'de inkübe edilerek nükleik asit izolasyonu tamamlandı.

Bu yöntem, *Microsporum canis* CBS 566.80 ve *Trichophyton mentagrophytes* CBS 106.67'a ait standart suşlar ve Tablo 2.1.1.'deki referans suşların hazır kültürüne uygulandı. Bu yöntem uygulandıktan sonra örneklerin spektrofotometre (Nanodrop, ThermoFisher Scientific, USA yardımıyla saflıkları (A_{260}/A_{280}) ve konsantrasyonları ölçüldü. Miktarı yaklaşık 50 ng/ μ l, A_{260}/A_{280} değeri 1,6-2,0 aralığında olan izolatlar analizlerde kullanıldı. Nükleik asit miktarı fazla olan örnekler 50 ng/ μ l olacak şekilde DNaz/Nükleaz içermeyen moleküler ölçekli su ile dilüe edildi. Ekstraksiyon sonrası ölçümlerde yoğunluğu 1-50 ng/ μ l arası çıkan örneklerde orijinal yoğunluk kullanıldı. Standardize edilen örneklerden her biri için 10 μ l LAMP reaksiyonuna eklenerek denendi.

2.2.3. Optimize edilen LAMP yönteminin validasyonu

2.2.3.1. Kültür örneklerine uygulanması

Optimizasyonu yapılmış olan yöntem *Microsporum canis* CBS 566.80 ve *Trichophyton mentagrophytes* CBS 106.67'a ait standart suşlar ve Tablo 2.1.1.'deki referans suşların kültürlerinden ticari kit ve Kolukırık ve ark. (2012) ile Zhang ve ark. (2010)'nın yönteminden modifiye edilerek elde edilen DNA örneklerinde denendi. Her iki ekstraksiyon yöntemi ile test edilen yöntem sonuçları karşılaştırıldı.

2.2.3.2. Kıl örneklerine uygulanması

Optimizasyonu yapılmış olan yöntem, 2014-2018 yılları arasında Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı klinik laboratuvarına rutin mantar muayenesi amacıyla gönderilmiş hayvanlardan elde edilen, konvansiyonel mikolojik kültür yöntemi ile mantar teşhisi konulmuş ve -80°C'de saklanmış, 100 adet kıl örneğine uygulandı.

2.2.3.3. Hazır nükleik asit örneklerine uygulanması

Optimizasyonu yapılmış olan yöntem Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı kültür koleksiyonunda bulunan, konvansiyonel mikolojik ekim yöntemi ile doğrulanmış 64 adet *M.canis* ve 42 adet *T.mentagrophytes* olmak üzere toplam 108 adet suşa ait ekstrakte edilmiş çalışma zamanına kadar -80°C’de saklanan DNA’lar ile denendi.

2.2.4. Geliştirilen yöntemin tespit limitinin belirlenmesi

2.2.4.1. Kıl örneklerinden tespit limitinin belirlenmesi

Kıl örneklerinden tespit limiti çalışmalarında kullanmak üzere *M.canis* CBS 566.80, *T.mentagrophytes* CBS 106.67 standart suşlarına, De Hoog (2000) ile Aberkane ve ark. (2002)’nin metodları modifiye edilerek uygulandı. Kısaca bu metod:

- 1- SDA agarda üremiş şekilde satın alınan referans suşlar kullanıldı.
- 2- Agar üzerindeki koloniden 2-4 cm³ alınıp, steril 1,5 ml’lik Eppendorf tüpü içerisinde bulunan steril PBS (phosphate buffered saline) içerisinde karıştırıldı.
- 3- Elde edilen bu süspansiyon 11 µm (Millipore, Madrid, Spain)’lik filterlerden geçirilerek sadece hifaların filtrede kalması sağlandı ve sadece sporlardan oluşan bir karışım hazırlandı.
- 4- Bu karışım kloramfenikol eklenmiş Saboraud Dekstroz Broth’a alınarak, 30°C’de bir gece inkübasyona bırakıldı.
- 5- McFarland 0,5 standardına göre konsantrasyonları 1×10⁶ ile 5×10⁶ spor/ml şeklinde ayarlandı ve bu standart karışımlardan 1 spor/ml’e kadar incek dilüsyonlar hazırlandı.
- 6- İçerisindeki spor miktarı bilinen bu örneklerden 10⁰’a kadar incek şekilde hazırlanan 10 katlı dilüsyonlar (10⁶, 10⁵, 10⁴, 10³, 10², 10¹, 10⁰) kullanıldı.

7- Bu spor örneklerine ait dilüsyonlar, bu yöntemin saha şartlarında uygulanması için geliştirilen kıldan DNA ekstraksiyonu yöntemi ile ekstrakte edildi ve optimize edilmiş LAMP reaksiyonuna eklendi.

2.2.4.2. Kültür örneklerinden tespit limitinin belirlenmesi

Optimize edilen yöntemin direkt saha materyalinde tespit limitini belirlemek amacıyla, *M.canis* ve *T.mentagrophytes* yönünden negatif olduğu bilinen toplam 20 adet kıl örneği alındı. Bu kıl örneklerine *M.canis* CBS 566.80 ve *T.mentagrophytes* CBS 106.67 standart suşlarından, De Hoog (2000) ile Aberkane ve ark. (2002)'nin metodları birleştirilerek hazırlanan spor dilüsyonları sırasıyla; 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 , 10^0 oranında eklendi. Kıl örneklerine geliştirilen hızlı DNA ekstraksiyonu yöntemi uygulandı.

2.2.4.3. DNA örneklerinden tespit limitinin belirlenmesi

Elde edilen yöntemin direkt DNA'dan tespit limitini belirlemek amacıyla, *M.canis* ve *T.mentagrophytes* referans materyallerden hazırlanan optimizasyon aşamasında da kullanılmış olan ticari kit ile elde edilmiş DNA ekstraktları, maksimum yoğunluğu 50 ng/μl olacak şekilde DNaz/Nükleaz içermeyen moleküler ölçekli su ile dilüe edildi. Ekstraksiyon sonrası ölçümlerde yoğunluğu 1-50 ng/μl arası çıkan örneklerde orijinal yoğunluk kullanıldı. Bu örneklerden hazırlanan 10 katlı dilüsyonlar (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6})'dan her biri 10 μl LAMP reaksiyonuna eklenerek denendi.

2.2.5. Geliştirilen yöntemin özgüllük ve duyarlılığının belirlenmesi

İki etken için de ayrı ayrı hem LAMP yöntemi hem de geliştirilen ekstraksiyon yönteminin duyarlılık ve özgüllüğünün belirlenmesi amacıyla Çizelge 2.2.'de

belirtilen formül kullanılmıştır. Geliştirilen yöntemin karşılaştırılması amacıyla konvansiyonel mikolojik yöntem altın standart olarak değerlendirilmiştir. Geliştirilen kıl örneği ekstraksiyon yöntemi de farklı örnek türleri arasındaki karşılaştırma Çizelge 2.2.'deki yönteme göre değerlendirilmiştir (Saunders ve ark., 2013).

Çizelge 2.2. Özgüllük ve duyarlılığın belirlenmesi için kullanılan tablo. A: Gerçek pozitif hastalar, b: Yanlış pozitif hastalar, c: Yanlış negatif hastalar, d: Gerçek negatif hastalar, duyarlılık: $a / (a+c) \times 100$, özgüllük: $d / (b+d) \times 100$.

Geliştirilen Yöntem	Altın Standart Yöntem		
		Gerçek Pozitif	Gerçek Negatif
	Pozitif	a	b
	Negatif	c	d
Toplam		Pozitif (a+c)	Negatif (b+d)

2.2.6. Tekrarlanabilirlik

Her örnek tipi için (kıl, DNA, kültür) rastgele 3 adet pozitif ve 3 adet negatif örnek seçildi ve üç farklı günde üç tekrarlı olarak çalışıldı. Bu çalışmalar arasında pozitiflik/negatiflik arasında bir farklılık olup olmadığı araştırıldı.

3. BULGULAR

3.1. LAMP Yönteminin Tasarımı ve Optimizasyonu

3.1.1. LAMP Primerlerinin tasarımı

Primer tasarımında *CHS-1* bölgesinin *M.canis* için 619 bç, *T.mentagrophytes* için ise 504 bç uzunluğunda olan hedefe özgü bölgeleri kullanıldı (Bu gen bölgelerine ait nükleotid dizileri sırasıyla Şekil 3.1. ve Şekil 3.2.'de gösterilmiştir). Tasarlanan hedefe özgü primer setleri (F3/B3 ve FIP/BIP) ve Loop primer seti (L-F,L-B) Çizelge 3.1. ve Çizelge 3.2.'deki gibidir.

Çizelge 3.1. Tasarlanan *M.canis* primerlerine ait diziler.

Primer Adı	Dizi (5'-3')
MC-1	F3 ATTGCCAAACAGCAGGTC
	B3 CTGGTATATGCTCTGCTTCC
	FIP GCCGAGGCTTGAGGATGACTTTTCACATCTACGAGTACACC AC
	BIP CCAGCTCCTTCTGCCTGAAGTTTTCCGAACCTGGAAAGAAC C
	L-F GACCTCCATGCCGATCTG
	L-B CCAGAGGAAGGATCAACTCG
MC-2	F3 ATTGCCAAACAGCAGGTC
	B3 CTGGTATATGCTCTGCTTCC
	FIP GCCGAGGCTTGAGGATGACTTTTCACATCTACGAGTACACC AC
	BIP AGAAGAAGATCAACTCGCACCGTTTTGATGTTTGGGTCGAG GATG
	L-F GACCTCCATGCCGATCTG
	L-B GTTCTTCCAGGCCTTCGG
MC-3	F3 GCATTGCCAAACAGCAGGT
	B3 AGGATGCGGCCGAAGG

Çizelge 3.1. (Devamı) Tasarlanan *M.canis* primerlerine ait diziler.

FIP	GCCCTTGACCTCCATGCCGATTTTAAGGACGTCACCGCCCA
BIP	GCCCGTCCAGCTCCTCTTCTTTTACCGGTGCGAGTTGATCT
L-F	CTGGGTGGTGTACTCGTAGAT
L-B	TGCCTCAAGGAGAAGAACCAG

Çizelge 3.2. Tasarlanan *T.mentagrophytes* primerlerine ait diziler.

Primer Adı	Dizisi (5'-3')
TM-1	F3
	CCTGGAAGAAGATTGTCGTT
	B3
	CGGCTTGAGAATAACCTGG
	FIP
	TGCCATCTTGGTAAACGCCTAGTTTTTATCGTCTCAGACGGTCG
TM-2	BIP
	GCATTGCCAAACAGCAGGTCTTTTACCTCCATGCCTATCTGG
	L-F
	GGCAAGAACAGCTCTCGT
	L-B
	CGTCACTGCTCACATCTATGA
TM-3	F3
	AGAATATCGAGTACATGTGCTC
	B3
	AATAACCTGGGTGCCCTT
	FIP
	CGGCAAGAACAGCTCTCGTTTTTCTGGAAGAAGATTGTCGTT
TM-2	BIP
	GCATTGCCAAACAGCAGGTCTTTTACCTCCATGCCTATCTGG
	L-F
	CGACCGTCTGAGACGATAC
	L-B
	CGTCACTGCTCACATCTATGA
TM-3	F3
	AGCAGCAAGACATGGGGTA
	B3
	TAACCTGGGTGCCCTTGA
	FIP
	GAACAGCTCTCGTACGCGGATTTTTTAGCCTGGAAGAAGATTGTCG
TM-3	BIP
	GATGGCATTGCCAAACAGCAGGTTTTCCATGCCTATCTGGGTGGTA
	L-F
	CGACCGTCTGAGACGATACAAA
	L-B
	TCAACGGTAAAGACGTCCTGC

```

1  tctgaagctt acaatgtaca atgaggacga gttcctcttc gcccgcacca tggccggcat
61  cttcaagaac atcgagtaca tgtgctcgcg caccagcagc aagacctggg gcaaggaggc
121 ctggaagaag atcgctgtct gcatcgcttc cgacggccgt gcaaaaatca atccgcgcac
181 gagagccgtg ctggccgggc tgggggtcta ccaggacggc attgccaaac agcagggtcaa
241 cggcaaggac gtcaccgccc acatctacga gtacaccacc cagatcggca tggagggtcaa
301 gggcaccag gtcattctca agcctcggcc gggcatgccc gtccagctcc ttctgcctga
361 aggagagaac cagaggaagg atcaactcgc accggtgggt ctttccagggt tcggccggca
421 tcctcgaccc aaacatctgc gtcctcctcg acgccgggac aaagccgggg aagcagagca
481 tataccagct ctggcgtgcc ttcgacctcg agcccatgtg cggcgggtcct gcggcgagat
541 caagggtcatg ctctcgacg gcaagaaact gctaaaccca ctctcgccg ggcagaactt
601 cgaatataag ctcgagaac

```

Şekil 3.1. *M.canis*'e ait primer tasarımı yapılan *CHS-1* gen bölgesinin nükleotid dizisi.

```

1  cgaactatgg ccggtgtctt taagaatata gactacatgt gctcgcgcac cagcagcaag
61  acatggggta aagaagcctg gaagaagatt gtcgtttgta tcgtctcaga cggtcgtgca
121 aagataaatc cgcgtacgag agctgttctt gccggtctag gcgtttacca agatggcatt
181 gccaaacagc aggtcaacgg taaagacgtc actgctcaca tctatgaata taccaccag
241 ataggcatgg aggtcaaggg caccaggtt attctcaagc cgcggccggg aatgccggtc
301 cagctcctct tctgtcttaa agagaagaac cagaagaaga tcaactctca cagatgggtc
361 ttccaagcct ttggtcgcgt cctcgacccc aatatctgtg ttctcctcga cgcgggaaca
421 aaaccaggcg gccgaagtat ataccaactc tggcgtgctt ttgacctcga gcccatgtgc
481 ggtggtgcct gcggtgaaat caag

```

Şekil 3.2. *T.mentagrophytes*'e ait primer tasarımı yapılan *CHS-1* gen bölgesinin nükleotid dizisi.

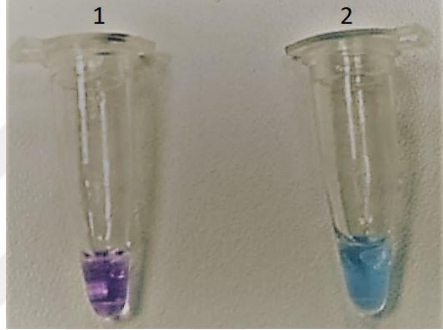
3.1.2. LAMP reaksiyonunun optimizasyonu

Optimizasyon aşamasından sonra kullanılan master mikse ait LAMP reaksiyonu içeriği Çizelge 3.3.'deki gibidir.

Çizelge 3.3. Optimize edilmiş LAMP reaksiyonu miks içeriği.

Reaksiyon Kurulumu	Bir reaksiyon için
10x Buffer	2,5
BST 2.0 (NEB)	1
100 nM MgSO ₄	1,5
10 nM dNTP	3,5
HNB Boyası	1
10x primer miks	2,5
MGW	3
DNA	10
Toplam	25

Sabit sıcaklıkta (65°C) her iki etken için de yapılan primer seçim denemeleri sonucunda TM-1, TM-2 primer setlerinde 45'inci dk sonunda, TM-3 primer setinde 30'uncu dk sonunda pozitiflik saptandı. MC-1 ve MC-2 primer setlerinde ise 45'inci dk sonunda pozitiflik gözlenirken MC-3 primer setinde 30'uncu dk sonunda pozitiflik gözlemlendi. Sonuç olarak süre göz önüne alındığında tüm primer setlerinin 60'ıncı dk sonunda çalıştığı görüldü. En kısa sürede pozitiflik görülen primer setleri *M.canis* için MC-3, *T.mentagrophytes* için ise TM-3 primer seti olarak belirlendi. Reaksiyon sonucu, mor renkli başlangıç karışımının maviye dönmesi pozitif olarak değerlendirildi (Şekil 3.1.).



Şekil 3.1. Negatif ve pozitif deney sonucu. 1: Negatif reaksiyon sonucu, 2: Pozitif reaksiyon sonucu.

3.2. DNA Eldesi

3.2.1. Optimizasyon aşamasında kullanılan suşlardan DNA ekstraksiyonu

İki ayrı hedef etken için oluşturulan iki ayrı yöntemin optimizasyonunda, *Microsporum canis* CBS 566.80 ve *Trichophyton mentagrophytes* CBS 106.67'a ait standart suşlar ve Tablo 2.1.1.'deki referans suşlardan yapılan DNA ekstraksiyonu sonucunda Çizelge 3.4.'de gösterilen absorbans değerleri ve yoğunlukları bulundu.

Çizelge 3.4. Optimizasyonda kullanılan suşlardan ekstrakte edilen DNA'ların saflıkları ve miktarları.

Suş ismi	Referans No	A ₂₆₀ / A ₂₈₀	DNA miktarı (ng/μl)
<i>Microsporum canis</i>	CBS 566.80	1,71	58,1
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	CBS 106.67	1,70	60,44
<i>Trichophyton tonsurans</i>	CBS 112818	1,79	82,49
<i>Trichophyton rubrum</i>	CBS 118892	1,81	66,81
<i>Nannizzia gypseum</i>	CBS 118893	1,75	71,38
<i>Aspergillus niger</i>	CBS 513.88	1,74	51,8
<i>Candida albicans</i>	CBS 562	1,79	69,41
<i>Rhizopus oryzae</i>	CBS 257.28	1,71	88,99
<i>Histoplasma capsulatum</i>	CBS 136.72	1,79	91,58
<i>Fusarium solanii</i>	CBS 490.63	1,88	58,17
<i>Alternaria alternata</i>	CBS 916.96	1,80	54,27
<i>Malessezia pachydermatitis</i>	CBS 1879	1,71	63,4

3.2.2. Saha örneklerinden DNA ekstraksiyonu

Kolukırık ve ark.'nın (2012) ve Zhang ve ark. (2010)'nın kullandıkları yöntemle göre hazırlanan 200 μl'de çözünen DNA ekstraktlarının saflıkları ve konsantrasyonları kıl örneklerinden absorbans ve yoğunluk miktarları belirtilen aralıklarda olmayan 5 örnek yerine farklı kıl örnekleri çalışmaya alındı. Standardizasyonu sağlamak amacıyla sadece 1-50 ng/μl, A₂₆₀/A₂₈₀ değeri 1,6-2,0 aralığında olan izolatlar analizlerde kullanıldı.

M.canis'e ait referans suştan hazırlanan ve içindeki spor miktarı bilinen örnek ile kirletilen kıl numunesinden, hızlı DNA ekstraksiyonu yöntemi sonucu ölçülen DNA yoğunluğu Çizelge 3.5.'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.5. *M.canis*'e ait dilüsyonlardan yapılan hızlı DNA ekstraksiyonu yöntemine ait sonuçlar.

Dilüsyon	DNA Yoğunluğu	Spor/ml
10 ⁶	58,1 ng/uL	1000000
10 ⁵	5,81 ng/uL	100000
10 ⁴	0,58 ng/uL	10000
10 ³	0,058 ng/uL	1000
10 ²	0,0058 ng/uL	100
10 ¹	0,00058 ng/uL	10
10 ⁰	0,000058 ng/uL	1

T.mentagrophytes'e ait referans suştan hazırlanan ve içindeki spor miktarı bilinen örnek ile kirletilen kıl numunesinden, hızlı DNA ekstraksiyonu yöntemi sonucu ölçülen DNA yoğunluğu Çizelge 3.6.'da gösterilmiştir.

Çizelge 3.6. *T.mentagrophytes* ile kontamine edilen kıl numunesinden, hızlı DNA ekstraksiyonu yöntemi sonucu ölçülen DNA yoğunluğu.

Dilüsyon	DNA Yoğunluğu	Spor/ml
10 ⁶	60,44 ng/uL	1000000
10 ⁵	6,04 ng/uL	100000
10 ⁴	0,60 ng/uL	10000
10 ³	0,060 ng/uL	1000
10 ²	0,0060 ng/uL	100
10 ¹	0,00060 ng/uL	10
10 ⁰	0,000060 ng/uL	1

M.canis'e ait direkt olarak spor dilüsyonlarından hızlı DNA ekstraksiyonu yöntemi ile hazırlanan nükleik asit ekstraktlarının spor miktarlarını ve konsantrasyonları Çizelge 3.7.'de verilmiştir.

Çizelge 3.7. *M.canis*'e ait DNA ekstraktlarının yoğunlukları.

Dilüsyon	DNA Yoğunluğu	Spor/ml
10 ⁶	54 ng/uL	1000000
10 ⁵	5,4 ng/uL	100000
10 ⁴	0,54 ng/uL	10000
10 ³	0,054 ng/uL	1000
10 ²	0,0054 ng/ul	100
10 ¹	0,00054 ng/uL	10
10 ⁰	0,000054 ng/uL	1

T.mentagrophytes'e ait direkt olarak spor dilüsyonlarından hızlı DNA ekstraksiyonu yöntemi ile hazırlanan nükleik asit ekstraktlarının spor miktarlarını ve konsantrasyonları Çizelge 3.8.'da verilmiştir.

Çizelge 3.8. *T.mentagrophytes*'e ait ekstraktlarının yoğunlukları.

Dilüsyon	DNA Yoğunluğu	Spor/ml
10 ⁶	51 ng/uL	1000000
10 ⁵	5,1 ng/uL	100000
10 ⁴	0,51 ng/uL	10000
10 ³	0,051 ng/uL	1000
10 ²	0,0051 ng/uL	100
10 ¹	0,00051 ng/uL	10
10 ⁰	0,000051 ng/uL	1

3.3. Optimize Edilen LAMP Yönteminin Farklı Örneklerde Uygulanması

3.3.1. Kültür örneklerine uygulanması

M.canis CBS 566.80, *T.mentagrophytes* CBS 106.67 standart suşları ve Tablo 2.1.1.'deki suşlarından yapılan DNA ekstraktlarına optimize edilen LAMP yöntemi uygulandığında, *M.canis* ve *T.mentagrophytes* kendi hedeflerinde pozitif, diğer etkenler ise her iki hedefe ait optimize yöntem ile negatif olarak bulunmuştur.

3.3.2. Kıl örneklerine uygulanması

100 adet kıl örneğinin kör numune olarak kullanıldığı çalışmada *M.canis* ve *T.mentagrophytes* yönünden negatif olan 67 adet kıl örneğinden 4 (%5,97) adedi (2 adet *M.canis*, 2 adet *T.mentagrophytes*) konvansiyonel ekim yöntemi ile negatif bulunmasına karşın LAMP yöntemi ile pozitif bulunmuştur. Ayrıca 5 adet kıl örneği numunesinde kıl örneğinden DNA ekstraksiyonu yöntemine göre elde edilen DNA ekstraktları içeriğindeki DNA miktarlarının ve saflıklarının standardizasyonunu sağlamak amacıyla çalışmadan çıkarılmıştır.

88 adet kıl örneği ile yapılan çalışma sonucunda 18 *M.canis* örneğinden 1 adedi, 11 *T.mentagrophytes* örneğinden 1 adedi konvansiyonel mikolojik ekim yöntemiyle pozitif bulunmasına karşın LAMP yöntemi ile negatif değerlendirilmiştir.

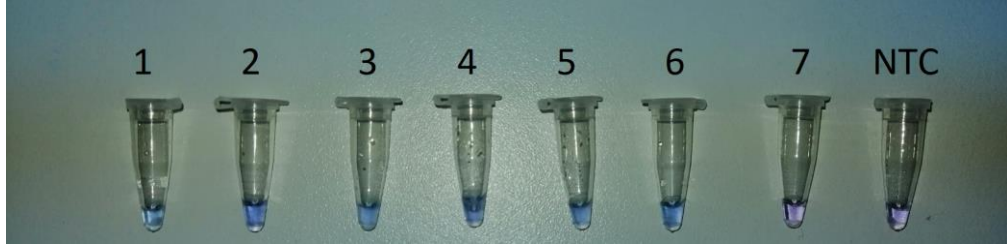
3.3.3. Hazır nükleik asitlere uygulanması

Stokta saklanan 108 adet hazır DNA ile optimize edilen yöntemin denenmesi sonucunda 64 adet *M.canis*'ten 62 (%96,87) adedi pozitif, 44 adet *T.mentagrophytes*'ten ise 42 (%95,45) adedi pozitif olarak bulunmuştur.

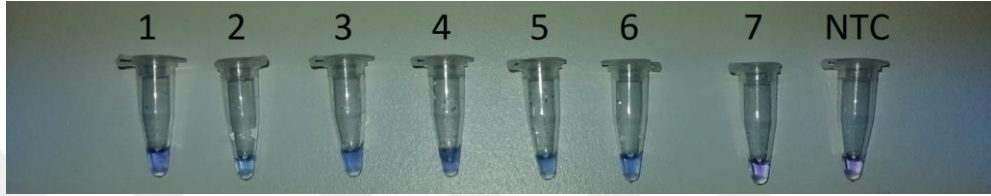
3.4. Tespit Limitinin Belirlenmesi

3.4.1. Kültür örneklerinden tespti limitinin belirlenmesi

M.canis ve *T.mentagrophytes*'e ait dilüsyonlarla yapılan LAMP sonucunda her iki etken için de 10^1 (sırasıyla 0,00058 ng/ul ve 0,00060 ng/uL) olarak bulundu. Bu sonuçlar Şekil 3.2. ve Şekil 3.3.'de gösterilmiştir.



Şekil 3.2. *M.canis* için geliştirilen yöntemin duyarlılığı. Sırasıyla 1-2-3-4-5-6-7'e kadar *M.canis*'e ait 10^6 - 10^0 DNA dilüsyonları; NTC: Negatif kontrol.



Şekil 3.3. *T.mentagrophytes* için geliştirilen yöntemin duyarlılığı. Sırasıyla 1-2-3-4-5-6-7'e kadar *T.mentagrophytes*'e ait 10^6 - 10^0 DNA dilüsyonları; NTC: Negatif kontrol.

3.4.2. Kıl örneklerinden tespit limitinin belirlenmesi

Tespit limitinin belirlenmesi amacıyla *M.canis* CBS 566.80, *T.mentagrophytes* CBS 106.67 referans suşlarına ait hazır kültürlerden hazırlanan ve 10^6 'dan 10^0 'a kadar inen sporelerden hazırlanan dilüsyonlardan elde edilen DNA'lar kullanıldı. *M.canis* ve *T.mentagrophytes*'e ait bu DNA'lar ile yapılan LAMP sonucunda her iki etken için de 100 spor/ml'ye inebilen tespit limiti olduğu saptandı.

3.4.3. DNA örneklerinden tespit limitinin belirlenmesi

M.canis ve *T.mentagrophytes*'e ait referans suşlardan hazırlanan ve ticari kit ile ekstraksiyonu yapılarak elde edilen DNA örnekleriyle yapılan LAMP reaksiyonu sonucunda her iki etken için de tespit limiti 10^2 (sırasıyla 0,00048 ng/ul ve 0,00037 ng/uL) olarak bulundu.

3.5. Spesifite ve Sensitivitenin Belirlenmesi

Stokta bulunan *M.canis* ve *T.mentagrophytes*'e ait 108 adet hazır DNA ile, geliştirilen yöntemin denendiği çalışma sonucunda hesaplanan duyarlılık ve özgüllük sonuçları Çizelge 3.9'daki gibidir. Hızlı ekstraksiyon yöntemi ile kıl örneklerinden hazırlanan ekstraktlar ile yapılan LAMP reaksiyonlarına ait sonuçların konvansiyonel mikolojik ekim yöntemiyle karşılaştırması sonucu elde edilen duyarlılık ve özgüllük değerleri Çizelge 3.10.'daki gibidir.

Çizelge 3.9. Hazır DNA'lar ile yapılan LAMP duyarlılık ve özgüllük sonuçları.

Hazır DNA'lar ile	Duyarlılık	Özgüllük
<i>M.canis</i>	96,87	%100
<i>T.mentagrophytes</i>	95,45	%100

Çizelge 3.10. Hızlı ekstraksiyon yöntemi ile kıl örneklerinden hazırlanan DNA'lar ile yapılan LAMP duyarlılık ve özgüllük sonuçları.

Hızlı ekstraksiyon yöntemiyle	Duyarlılık	Özgüllük
<i>M.canis</i>	94,73	%100
<i>T.mentagrophytes</i>	91,66	%100

3.6. Tekrarlanabilirlik

Üç farklı günde yapılan üç tekrarlı deneyler sonucunda aynı örnekler her çalışmada aynı sürede pozitif bulunmuştur.

4. TARTIŞMA

Kedi ve köpeklerden en sık izole edilen, zoonotik özelliği de bulunan *M.canis* ve *T.mentagrophytes*'in hızlı ve doğru bir şekilde, günümüz laboratuvar şartlarında teşhis edilememesi, hem hayvan hem de halk sağlığı açısından önemli bir problem oluşturmaktadır. Bugünkü şartlarda etkenlerin teşhisi için kullanılan ve aynı zamanda altın standart olan mikolojik kültür yöntemi, yaklaşık 7-21 gün içerisinde sonuç verebilmektedir. Bahsedilen yöntem ile yapılan teşhisin subjektif olmasından dolayı hatalı sonuçların olabileceği göz önüne alındığında, bu iki etkenin saha şartlarında, DNA temelli, doğru, güvenilir ve kısa sürede teşhisi büyük önem arz etmektedir. Bu iki etken hızlı ve doğru bir şekilde teşhis edildiğinde, gereksiz ilaç kullanımı sonrası gelişebilecek toksikasyonların engellenecek olması bir yana, etkenin yayılması da ayrıca önlenerek tedavi süresi kısalmaktadır. Bu tez çalışmasında geliştirilmek istenilen LAMP yöntemi, ilk olarak Notomi ve ark. (2000), tarafından, sonrasında da başka araştırmacılar tarafından bir çok bakteriyel ve fungal etkenin (Endo ve ark., 2004; Luo, 2014; Seki ve ark., 2018; Souza ve ark., 2017) teşhisinde başarı ile kullanılan bir nükleik asit amplifikasyon yöntemidir. Duyarlılık ve özgüllük değerlerine göre mantar teşhisinde altın standart yöntem ile karşılaştırıldığında daha iyi sonuçlar alındığı (Khan ve ark., 2017) bilinen LAMP yönteminin, saha şartlarında da direkt kıl örneğinden inhibitörlerden etkilenmeden çalışması (Scheel ve ark., 2014) yöntemin hızlı tanıda oldukça önemli olduğunu göstermektedir. Bu doğrultuda, bu tez çalışmasında, dünyada ilk kez, *M.canis* ve *T.mentagrophytes*'in hızlı ve objektif olarak teşhis edilebildiği bir LAMP yöntemi geliştirilmesi amaçlandı.

Dünyada farklı fungal etkenlerin teşhisi amacıyla geliştirilen DNA temelli yöntemlerde, Sun ve ark. (2010), ITS ve 5.8S bölgesini, Scheel ve ark. (2014), *Hcp100* genini, Ohori ve ark. (2006), D1/D2 LSU rDNA bölgesini, Endo ve ark. (2004), *gp43* genini kullandıkları görüldü. Bunlardan farklı olarak *CHS-1* gen bölgesi, dizi analizleri yapılan dermatofit türleri arasında %85, tür içinde %99 oranında benzerliğe sahip olan ve tek başına fungal etkenleri ayırmada yeterli olduğu bilinen bir gen bölgesidir (Cafarchia ve ark., 2013; Kano, 2004; Kano ve ark., 1997). Bu sebeple *CHS-1* gen

bölgesi seçilerek çalışmalara bu gen bölgesi ile devam edildi. Bu tez çalışmasında bu gen bölgesine yönelik tasarlanan primerleri içeren LAMP reaksiyonu ile *M.canis* örneklerinden %95,8'i, *T.mentagrophytes* örneklerinden %93,55'i doğru bir şekilde teşhis edildi. Garg ve ark. (2007)'nın dermatofitlerin (*T.tubrum*, *T. mentagrophytes*, *T.tonsurans*, *T.violaceum*) tespiti için *CHS-1* genine yönelik geliştirdiği Nested-PCR kullanılan bir çalışmada, bu yöntem ile klinik örneklerden (tırnak örneği) duyarlılığın %79,6 olduğu görüldü. Litz ve Cavagnolo (2010)'nun *CHS-1* geni kullanılarak dermatofit (*T.rubrum*, *T.mentagrophytes*, *Epidermophyton floccosum*, *T.tonsurans*) teşhisi için geliştirdikleri konvansiyonel PCR çalışmasında, tırnak örneklerinden dermatofitler yönünden %37 oranında pozitiflik saptandığı görüldü. Bu tez çalışmasında geliştirilen yöntemin, pozitiflik oranı bakımından *CHS-1* geni kullanılan diğer çalışmalardan daha başarılı olduğu görüldü. Bu tez çalışmasında geliştirilen LAMP yönteminde ise kıl örneklerinden, *T.mentagrophytes* %94,54 (52/55) oranında pozitiflik saptanması LAMP yönteminin diğer iki PCR tabanlı yöntemle göre daha başarılı olduğunu gösterdi. Bununla birlikte yapılan çalışmalarda tırnak örneklerinde etken miktarının düşük olduğunu bildirmektedir (Garg ve ark., 2007; Litz ve Cavagnolo, 2010). Bu iki çalışmada kullanılan örnekler tırnak örneği olduğu için tez çalışmasında ise kıl örnekleri kullanıldığı ve yüksek oranda pozitiflik saptandığı için moleküler yöntemler ile mantar teşhisinde kıl örneğinin tırnak örneğine göre daha uygun bir materyal olduğu onaylandı.

Notomi ve ark. (2015), tarafından optimum LAMP ısı ve süresi sırasıyla 65°C ve 60 dk olarak bildirildiğinden (Notomi ve ark., 2015), bu tez çalışmasında optimizasyon aşamasına başlandığında ilk olarak bu ısı ve reaksiyon süresi kullanıldı. Sonrasında saha denemelerine geçmeden önce saha şartlarında deneyi en kısa sürede tamamlamak için süre ile ilgili optimizasyon çalışması yapıldı. Bu çalışma sonucunda MC-3 ve TM-3 primer setleri ile 30 dk'da sonuç alındığı için bu primer setleri seçildi ve reaksiyon süresi uygun görüldüğünde içerikle ilgili farklı optimizasyon koşulları denenmedi. Yapılan literatür araştırması sonucunda, birçok farklı araştırmacının farklı hedeflere yönelik olsa da optimizasyonu benzer şekilde yaptığı görüldü (Endo ve ark., 2004; Yo ve ark., 2016). Geliştirilen farklı yöntemlerdeki süreler ile bu tez çalışmasında elde edilen süre karşılaştırıldığında tez çalışması kapsamında

geliştirdiğimiz yöntemin süresinin Ohori ve ark. (2006)'nın (60 dk), Scheel ve ark. (2014)'nın (90 dk), Yo ve ark. (2016)'nın (148.5 dk)'nın çalışmalarından daha kısa olduğu görüldü. Ortaya çıkan süre farkının nedeninin duyarlılığı ve özgüllüğü iki kat arttıran loop primerlerinin kullanımının olduğu daha önceki çalışmalarda bildirilmektedir (Nagamine ve ark. 2002; Notomi ve ark., 2000; 2015). Scheel ve ark. (2014) ve Ohori ve ark. (2006)'nın çalışmalarında kullanılan gen bölgesinin tek kopya olmasından dolayı loop primerleri tasarlayamadıkları ve bu sebeple teşhis süresinin uzun olmuş olabileceği düşünüldü. Bu çalışmada loop primerlerinin süre açısından önemli bir parametre olduğu ve bu çalışmada tasarladığımız loop primerlerinin süreyi 30 dk'ya indirdiği anlaşıldı.

Yapılan farklı çalışmalarda kıl örneklerinden fungal DNA ekstraksiyonu için çeşitli yöntemler kullanıldığı (Brillowska ve ark., 2007; Faggi ve ark., 2005; Tang ve ark., 2016; Tripathy ve ark., 2017; Yo ve ark., 2016), bu yöntemlerin zaman alıcı ve pahalı olmasının saha şartlarında uygulanabilirliğini engellediği görüldü. Kıl örneklerinden ekstraksiyon yaparken araştırmacıların genellikle ticari kit kullanması ve direkt olarak kıl örneğinden ticari kit kullanmadan DNA ekstraksiyonu yapılan bir LAMP çalışması bulunması, bu tez çalışmasında geliştirilen hızlı fungal DNA ekstraksiyon yöntemine zemin hazırladı. LAMP yönteminin sahada uygulanması amacıyla alternatif olarak geliştirilen kıl örneğinden ekstraksiyon yönteminin inhibitörlerden daha az etkilenen, LAMP gibi duyarlılığı ve özgüllüğü yüksek yöntemlerde rahatlıkla kullanılacak bir yöntem olduğu görüldü. İlk defa geliştirilen bir yöntem olduğu düşünülen bu yöntemin kıl örneğine uygulanması sonucu elde edilen LAMP tespit limiti değeri (100 pg) ile ticari kit ile yapılan ekstraksiyon sonrası elde edilen değer (10 pg) arasında 10 katlık fark olduğu görüldü. Zhang ve ark. (2010)'nın kullandığı ticari kit ve geliştirdikleri hızlı ekstraksiyon yöntemi arasında da 10 katlık fark olduğu görüldü. Bu 10 katlık farkın ticari kit ile yüksek kalitede saflaştırma yapmayı sağlayan kolon yönteminin kullanılmasından kaynaklandığı düşünüldü.

Geliştirilen yöntem saha örneklerine uygulandığında, diğer araştırmacıların (Endo ve ark., 2004; Khan ve ark., 2017; Souza ve ark., 2017; Yo ve ark., 2016)

bulduğu özgüllük oranı (%100) ile bu tez çalışmasında geliştirilen yöntemin özgüllük oranının aynı olduğu görüldü. LAMP yönteminin mikolojik ekim yönteminden ve PCR'dan daha özgül olduğu da bu şekilde doğrulanmış oldu. *M.canis* ve *T.mentagrophytes*'a ait saha izolatlarından elde edilen ve saklanan DNA'lar ve deneme kiti ile yapılan çalışmalarda 4 adet (2 adet *M.canis*, 2 adet *T.mentagrophytes*) örneğe ait DNA, LAMP yöntemiyle negatif olmasına rağmen konvansiyonel mikolojik ekim yöntemiyle pozitif bulunmasının sebebinin deteksiyon limitinin altında kalan DNA miktarlarından kaynaklabileceği düşünüldü. Bunun dışında gerçek pozitifliğin saptanamama nedeninin saklama koşullarından da kaynaklanmış olabileceği, bu süre içerisinde DNA'nın degrede olmuş olabileceği öngörüldü.

Kıl örnekleri ile yapılan çalışma sonunda, *M.canis* için %94,73, *T.mentagrophytes* için %91,66 oranlarında bulunan duyarlılık oranları ve %100'lük özgüllük oranı geliştirilen LAMP yönteminin direkt kıl örneklerine başarıyla uygulanabileceğini gösterdi. Konvansiyonel yöntem ile negatif olarak değerlendirilen ve LAMP yöntemi ile pozitiflik saptanan örneklerde, konvansiyonel mikolojik ekim yöntemiyle elde edilen sonuçların hatalı olabileceği sonucuna varıldı. Bunun gibi teşhis hatalarının daha önce de farklı araştırmacılar tarafından belirlenmiş olduğu ve konvansiyonel mikolojik ekim yöntemi ile teşhis edilemeyip LAMP yöntemi ile teşhisi yapılmış örneklerin bulunabileceği anlaşıldı (Scheel ve ark., 2014; Yo ve ark., 2016).

Bu tez çalışmasın kapsamında geliştirilen yöntem ile direkt DNA, kültür ve kıl örneklerine ait özgüllük sonuçlarının herbiri için %100 olduğu belirlendi. Bununla birlikte tespit limiti değerlerinin (kıl örneğindeki 10 katlık fark hariç) birbirine yakın bulunması, bu örneklerden herhangi birinin kullanılarak yapılacağı teşhiste benzer sonuçların alınacağını gösterdi. Yapılan validasyon çalışmalarından da elde edilen verilere göre de klinik örnek farketmeksizin LAMP yönteminin bu üç örnek türünde de doğru sonuç verdiği görüldü. Benzer sonuçlar Scheel ve ark. (2014), Tang ve ark. (2016) ve Yo ve ark. (2016)'nın farklı hedeflere yönelik geliştirmiş oldukları LAMP yöntemlerinden de alındığı için, LAMP yönteminde örnek türünün fark yaratmayacağı ve bu yöntemin gerek saha gerekse laboratuvar ortamında kullanılabileceği anlaşıldı.

Bu bilgiler ışığında bu tez çalışmasında geliştirilen LAMP yöntemi, tanı ile tedavi arasındaki süreci kısaltan bir yöntem olarak öne çıkmaktadır. Özetle bu tez çalışmasında dünyada ilk kez *M.canis* ve *T.mentagrophytes*'in sahada teşhisine yönelik LAMP yöntemi geliştirildi. Bununla birlikte geliştirilen yöntemin direkt mantar kolonisinden de başarılı sonuçlar verdiği anlaşıldı.



5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Microsporum canis ve *Trichophyton mentagrophytes* tanısında doğru ve kısa sürede sonuç elde etmek klinik açıdan önemlidir. Yanlış yapılan teşhis, tedaviyi geciktirmekte ve etkenlerin yayılma sürecini hızlandırmaktadır. Hem halk hem de hayvan sağlığı açısından önemli olan bu durumun önlenmesi için hızlı, doğru ve duyarlı etken teşhisi ihtiyacı bulunmaktadır. Bu ihtiyaca yönelik geliştirilen moleküler tabanlı testler bulunsun da Notomi ve ark. (2000), tarafından geliştirilen ve sonraki yıllarda yine Nagamine ve ark. (2002), tarafından optimize hale getirilen Spiral Aracılı İzotermal Çoğalma [Loop-mediated isothermal amplification] yöntemi direkt olarak klinik örneklerden etken tespiti yapabilmesi, duyarlılığı ve özgüllüğü daha yüksek olması, inhibisyonların yaşanmaması, çok kısa sürede sonuç alınabilmesi, düşük maliyeti, her uygulayıcının uygulayabileceği kadar kolay olması, özel ve yüksek maliyetli cihaz gerektirmemesi açısından her laboratuvar ortamında uygulanabilecek bir yöntem olarak rutin laboratuvar uygulamalarına girmektedir.

Bu tez çalışmasında dünyada ilk kez, sahada şartlarında *M.canis* ve *T.mentagrophytes*'in teşhisine yönelik kolay uygulanabilir, hızlı tanı yöntemi olan LAMP yöntemi geliştirilmesi amaçlandı. Direkt olarak kıl örneklerine uygulanan bu yöntem ile *M.canis* için duyarlılığı (%94,73) ve özgüllüğü (%100) yüksek, deteksiyon limiti 100 spor/ml olan LAMP yöntemi geliştirildi. *T.mentagrophytes* için ise yine yüksek duyarlılığa (%95,45) ve özgüllüğe (%100) sahip olan deteksiyon limiti 100 spor/ml olan yöntem elde edildi. Sonuç olarak dünyada ilk kez *M.canis* ve *T.mentagrophytes*'i hızlı teşhis edebilen, sahada kullanılabilir bir LAMP yöntemi geliştirilmiş oldu.

Elde edilen yöntemin sahada uygulanabilirliğinin de gösterildiği bu tez çalışması sonunda LAMP yönteminin hayvan ve halk sağlığı açısından önemli diğer etkenlerin teşhisinde de kullanılabileceği gösterildi.

ÖZET

***M.canis* ve *T.mentagrophytes*'in teşhisi için LAMP kiti geliştirilmesi**

Bu tez çalışmasında hayvanlardan en çok izole edilen dermatofit etkenleri olan *M.canis* ve *T.mentagrophytes*'in, klinik örneklerden hızlı teşhisine yönelik bir LAMP yönteminin geliştirilmesi ve sonrasında geliştirilen bu yöntemin saha şartlarında uygulanabilirliğinin gösterilmesi hedeflendi. Çalışmada, yöntemde kullanılmak üzere primer tasarımı için *CHS-1* gen bölgesi seçildi. Bu gen bölgesine yönelik tasarlanan primerler ile süre optimizasyonu yapıldı. Süre optimizasyonundan sonra geliştirilen LAMP yöntemi referans materyaller ile denendi. Yöntemin özgül ve duyarlı olduğu belirlendi. Tüm deneylere, çıplak gözle objektif olarak değerlendirmeye olanak sağlayan HNB boyası eklenerek ve reaksiyon süresi sonunda renk değişimi objektif olarak değerlendirildi. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'na gönderilen konvansiyonel mikolojik ekim yöntemi ile teşhisi yapıldıktan sonra kültürlerden izole edilmiş 108 (64 *M.canis*, 44 *T.mentagrophytes*) adet DNA ile geliştirilen yöntem denendi. Bu denemeden sonra LAMP yönteminin saha şartlarında kullanılabilirliğini arttırmak amacıyla geliştirilen kıl örneklerinden hızlı fungal DNA ekstraksiyonu yöntemi geliştirildi. Ankara Üniversitesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı stoklarında bulunan 100 adet kıl örneğiyle bu ekstraksiyon yönteminin ardından LAMP yöntemi uygulanarak valide edildi. Yapılan validasyon çalışmalarından elde edilen veriler yardımıyla geliştirilen yöntemin duyarlılığı ve özgüllüğü ve tekrarlanabilirliği hesaplandı.

Yapılan çalışmalar sonucunda geliştirilen yöntemin kıl örneklerinden tespit limiti *M.canis* için 100 spor/ml, *T.mentagrophytes* için 100 spor/ml, kültür örneklerinden 10 spor/ml ve 10 spor/ml, DNA örneğinden 0,00048 ng/μl ve 0,00048 ng/μl olarak bulundu. Geliştirilen yöntem hazır DNA'lara uygulandığında özgüllüğün her iki etken için de %100, duyarlılığın *M.canis* için 96,87, *T.mentagrophytes* için 95,45 bulundu. Paralel olarak geliştirilen hızlı ekstraksiyon yöntemi ile yapılan çalışmada, özgüllüğün her iki etken için de %100, duyarlılığın *M.canis* için 94,73, *T.mentagrophytes* için 91,66 olduğu belirlendi.

LAMP yöntemi ile konvansiyonel mikolojik yönteminin sonuçları ve bu tez kapsamında geliştirilen yöntemin sonuçları karşılaştırıldığında elde edilen sonuçlara göre geliştirilen yöntemin saha şartlarında uygulanabilir olduğu, duyarlılık ve özgüllük değerlerinin diğer yöntemler ile karşılaştırılabilir olduğu görüldü. Bu tez çalışmasında dünyada ilk defa 30 dk'da *M.canis* ve *T.mentagrophytes*'in teşhis edilebildiği duyarlı ve özgül bir LAMP yöntemi tasarlanmış oldu. Geliştirilen bu LAMP yönteminin *M.canis* ve *T.mentagrophytes*'in düşük bütçeli laboratuvarlar ve veteriner kliniklerinde hızlı, güvenilir, doğru bir şekilde teşhis edilebilmesini sağlayacağı ve teşhis ile tedavi arasında geçen sürenin minimuma indirilmesi sonucunda gereksiz ilaç kullanımının engellenebileceği ve tedavi başarısının artırılmasını sağlayacağı sonucuna varıldı.

Anahtar Sözcükler: Hızlı teşhis, LAMP, *Microsporum canis*, *Trichophyton mentagrophytes*.

SUMMARY

Development of LAMP technique for diagnosis *M.canis* and *T.mentagrophytes*

The aim of this study was to develop a LAMP assay for rapid screening of *M. canis* and *T. mentagrophytes* which are most commonly isolated dermatophyte causative agents from animals, and to demonstrate the applicability of this assay under field conditions.

The CHS-1 gene region was selected for primers design to be used in the study. The duration optimization was performed by using primers designed for this gene region. Then, the developed LAMP assay was tested by using reference materials. The assay was found to be specific and sensitive. In all trials, the color change was evaluated by adding HNB dye which allows objective evaluation by the naked eye at the end of the reaction. A total of 108 DNA (64 *M.canis*, 44 *T.mentagrophytes*) were tested after being identified conventionally at the Microbiology Department, Faculty of Veterinary Medicine, Ankara University. Then, a rapid fungal DNA extraction method from hair samples was developed in order to increase the usability of LAMP assay under field conditions. A total of 100 hair samples were tested by the developed LAMP assay after being extracted by using the above-mentioned extraction method. The sensitivity, specificity, and repeatability of the developed assay were calculated after using the data obtained from validation studies.

As a result, the detection limits of *M.canis* and *T.mentagrophytes* were 100 spores/ml and 100 spores/ml in hair samples, 10 spores/ml and 10 spores/ml in culture samples, 0.00048 ng/μl and , 0.00050 ng/μl in DNA samples respectively. When the developed assay was applied to the previously prepared DNAs of *M.canis* and *T.mentagrophytes*, the specificity was 100% and 100%, the sensitivity was 96.87% and 95.45, respectively. In parallel with the rapid extraction method developed in the study, the specificity was 100% and 100%, the sensitivity was 94.73 and 91.66 for *M.canis* and *T.mentagrophytes* respectively. The comparison of the results obtained from the LAMP assay, conventional mycological methods and the assay developed in this study, revealed that the developed assay was applicable under field conditions and the sensitivity and specificity values were comparable with other methods. In this study, a sensitive and specific LAMP assay was developed for the first time in the world in which *M.canis* and *T.mentagrophytes* can be identified in 30 minutes.

In conclusion, the developed LAMP assay could enable *M.canis* and *T.mentagrophytes* to be identified quickly, reliably, accurately in laboratories which lacks for fundings and veterinary clinics, the unnecessary medication use could be prevented and the treatment success would be increased as a result of minimizing the time between diagnosis and treatment.

Key Words: LAMP, *Microsporum canis*, Rapid-diagnosis, *Trichophyton mentagrophytes*.

KAYNAKLAR

- AINSWORTH G C (1976) *Introduction to the history of mycology*. 1st edition. Melbourne: Cambridge University Press.
- ARABATZIS M, L E S BRUIJNESTEIJN VAN COPPENRAET, E J KUIJPER, G S DE HOOG, A P M LAVRIJSEN, K TEMPLETON, E M H VAN DER RAAIJ-HELMER, A VELEGRAKI, Y GRÄSER, R C. SUMMERBELL (2007) Diagnosis of common dermatophyte infections by a novel multiplex real-time polymerase chain reaction detection/identification scheme. *British Journal of Dermatology* **157**(4):681–689.
- BOND R (2010) Superficial veterinary mycoses. *Clinics in Dermatology* **28**(2):226–36.
- BRILLOWSKA-DĄBROWSKA A, DITTE MARIE SAUNTE VE MAIKEN C A (2007) Five-hour diagnosis of dermatophyte nail infections with specific detection of *Trichophyton rubrum*. *Journal of Clinical Microbiology* **45**(4):1200–1204.
- CABANES F J, ABARCA M L, BRAGULAT M R (1997) Dermatophytes isolated from domestic animals in Barcelona , Spain. *Mycopathologia* **137**:107–13.
- CAFARCHIA C, ROBERTA I, MARIA S L, GRÄSER Y, DOMENICO O (2013). Molecular epidemiology, phylogeny and evolution of dermatophytes. *Infection, Genetics and Evolution* **20**(September):336–51.
- CHANG C C, CHIEN C C, SHIH C W, HUI H L, YANG H L, CHII W L (2012) Diagnostic devices for isothermal nucleic acid amplification. *Sensors (Switzerland)* **12**(6):8319–37.
- CHERMETTE R, LAERTE F, JACQUES G (2008) Dermatophytoses in animals. *Mycopathologia* **166**(5–6):385–405.
- ENDO S, TAKASHI K, GIANNINA R, AYAKO S, KOJI Y (2004) Detection of gp43 of *Paracoccidioides brasiliensis* by the loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method. **234**:93–97.
- FAGGI E, PINI G, ENZA C (2005) Use of magnetic beads to extract fungal DNA. *Mycoses* **48**(1):3–7.
- FAGGI E, PINI G, ENZA C, CHIARA B, ELISA D, FRANCESCA M (2001) Application of PCR to Distinguish Common Species of Dermatophytes. **39**(9):3382–85.
- LEMING A (1929). On antibacterial action of culture of *Penicillium*, with special reference to their use in isolation of *B. influenzae*. *Br J Exp Pathol* **(1923)**:226–36.
- GARG J, RAGINI T, ATUL G, PRADYOT P, GULATI A K, NATH G (2009) Rapid detection of dermatophytes from skin and hair. *BMC Research Notes* **2**:55-58.
- GARG J, RAGINI T, SANJAY S, GULATI A K, ATUL G, PRADYOT P, NATH G (2007) Evaluation of pan-dermatophyte nested PCR in diagnosis of onychomycosis. *Journal of clinical microbiology* **45**(10):3443–45.
- GARRIDO-MAESTU A., AZINHEIRO S, CARVALHO J, ABALDE-CELA S, CARBÓ-ARGIBAY E, DIÉGUEZ L, PIOTROWSKI M, KOLEN Y V (2017) Combination of Microfluidic Loop-Mediated Isothermal Amplification with Gold Nanoparticles for Rapid Detection of *Salmonella* spp . in Food Samples. *Frontiers in Microbiology* **8**(Nov):1–8.

- GIL-LAMAIGNERE C, E. ROILIDES J H, MÜLLER F M C (2003) Molecular typing for fungi - A critical review of the possibilities and limitations of currently and future methods. *Clinical Microbiology and Infection* **9(3)**:172–85.
- GOTO M, EIICHI H, ATSUGO O, AKIO N, KEN I H (2009) Colorimetric detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by using hydroxy naphthol blue. *BioTechniques* **46(3)**:167–72.
- HIBBETT D S, MANFRED B, JOSEPH F B, MEREDITH B, CANNON F, OVE E E, SABINE H, TIMOTHY J, PAUL M K, P. BRANDON M, DAVID J. ve ark. (2016) A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. **111**:509–47.
- HOWARD D (2002). Pathogenic Fungi in Humans and Animals. Ss. 230–31 içinde *Pathogenic Fungi in Humans and Animals*. **16**. Marcel Dekker Ink.
- ALIOTTA J M, PELLETIER J J, JENNIFER L W, HUIMIN K, MORAN S, JACK S, ALIOTTA M (1996) Thermostable Bst DNA polymerase I lacks a 3 ' exonuclease activity. *Genetic Analysis: Biomolecular Engineering* **12**:185–95.
- KANO R, Y. NAKAMURA T W, WATANABE S, TAKAHASHI H, TSUJIMOTO H, HASEGAWA A (1997) Phylogenetic analysis of 8 dermatophyte species using chitin synthase 1 gene sequences. *Mycoses* **40(11–12)**:411–14.
- KANO R (2004) Chitin Synthase (CHS) Gene Analysis of Dermatophytes. *Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi* **45(2)**:47–86.
- KANO R, YUKA N, SHINICHI W, ATSUSHIKO H (2000) Detection of *Microsporum canis* in the skin scrapings and hairs of dogs with dermatophytosis based on sequences of the chitin synthase 1 gene. *Microbiology and Immunology* **44(7)**:605–7.
- KENDRICK B(2006) *Fungi and the History of Mycology*. British Columbia.
- KHAN M, BENJIN L, YUE J, QIYONG W, QINGHE C, MONTES H M, NIÑO-VEGA G A. 2017. Evaluation of Different PCR-Based Assays and LAMP Method for Rapid Detection of *Phytophthora infestans* by Targeting the Ypt1 Gene. *Frontiers in Microbiology* **8(Oct.)**:1–11.
- LITZ C E, CAVAGNOLO R Z (2010) Polymerase chain reaction in the diagnosis of onychomycosis: A large, single-institute study. *British Journal of Dermatology* **163(3)**:511–14.
- MAKIMURA K, YOSHIKO T, TAKASHI M, ATSUSHIKO H, YOSHITO T, HANAZAWA R Y O, KATSUHISA U, HIUGA S (1999) Phylogenetic Classification and Species Identification of Dermatophyte Strains Based on DNA Sequences of Nuclear Ribosomal Internal Transcribed Spacer 1 Regions, *Journal Of Clinical Microbiology*,. **37(4)**:920–24.
- MCVEY M S, KENNEDY M, CHENGAPPA M (2013) *Veterinary Microbiology*. 3rd Edition. Wiley-Blackwell.
- MICHAUD R (2011) *Companion Animal Zoonoses*. First Edit. Iowa: John Wiley & Sons.
- MORI Y, NAGAMINE K, TOMITA N, VE NOTOMI T (2001) Detection of Loop-Mediated Isothermal Amplification Reaction by Turbidity Derived from Magnesium Pyrophosphate Formation. **154**:150–54.
- NAGAMINE K, HASE T, NOTOMI T (2002) Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. **24**:223–29.
- NOTOMI T, YASUYOSHI M, NORIHIRO T, HIDETOSHI K (2015) Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): principle , features , and future prospects. **53(1)**:1–5.

- NOTOMI T, HIROTO O, HARUMI M, TOSHIHIRO Y, KEIKO W, NOBUYUKI A, TETSU H (2000) Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research*, **28**(12).
- OHORI A, SHIGEO E, AYAKO S, KOJI Y, KYOKO Y, MASASHI Y, KATSUHIKO K, MAKOTO M, KAZUKO N (2006) Rapid identification of *Ochroconis gallopava* by a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method. *Veterinary Microbiology* **114**:359–65.
- PEDERSEN J, D. LIU, R. BAIRD, S. COLOE E (2015) Application of PCR to the identification of dermatophyte fungi. *Journal of Medical Microbiology* **49**(6):493–97.
- SAMANTA I (2015) *Veterinary Mycology*, Saunders, India.
- SAUNDERS N, MARIA Z, IAN S, RUHI S, ALISON B, JOANNA E, BARRY V, ANDREW S, JACOB M G, PETER M, MALCOLM G. 2013. Guidance on the development and validation of diagnostic tests that depend on nucleic acid amplification and detection. *Journal of Clinical Virology* **56**(3):344–54.
- SCHEEL C M, YITIAN Z, RAQUEL C T, BETHANY A, ARUNMOZHI B S, ANASTASIA P. 2014. Development of a Loop-Mediated Isothermal Amplification Method for Detection of *Histoplasma capsulatum* DNA in Clinical Samples. *Journal of Clinical Microbiology* **52**(2):483–88.
- SEKI M, PAUL E K, EUN J K, MAKOTO O, SATOSHI H, VE DONG W K 2018. Loop-Mediated Isothermal Amplification Methods for Diagnosis of Bacterial Meningitis. *Frontiers in Pediatrics* **6**(Mar):1–6.
- SOUZA M D, TETSUHIRO M, KANAE S, ANNA S, SHAFFERMAN L, ANNA S, SHAFFERMAN L (2017) Comparison of DNA Microarray , Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) and Real-Time PCR with DNA Sequencing for Identification of *Fusarium* spp . Obtained from Patients with Hematologic Malignancies. *Mycopathologia* **182**(Aug):7–8.
- SUN J, NAJAFZADEH M J, VICENTE V, LIYAN X, DE HOOG G S (2010) Rapid detection of pathogenic fungi using loop-mediated isothermal amplification, exemplified by Fonsecaea agents of chromoblastomycosis. *Journal of Microbiological Methods* **80**(1):19–24.
- TANG Q, SHUGUANG T, NONG Y, XI Z, XIAODONG J, HONGYAN Z, QUN S, LI H (2016) Development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification method for rapid detection of *aspergillus fumigatus*, *Journal of Clinical Microbiology*, C. 54.
- TEL Y O, AKAN M (2008) Kedi ve köpeklerden dermatofitlerin izolasyonu”. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* **55**:167–71.
- TIRYAKI Y, KORKMAZGIL B G, EYİGÖR M, AYDIN N (2015) The Use of Polymerase Chain Reaction in Laboratory Diagnosis of Dermatophytosis. *Mikrobiyoloji Bulteni* **49**(2):201–9.
- TRIPATHY S K, MANASMITA M, DINESH M I, DEVRAJ L, DAYANIDHI M, ARJUN P, DIGBIJAYA S R M, K R RESHMI RAJ (2017). Exploring Rapid and Efficient Protocol for Isolation of Fungal DNA. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* **6**(3):951–60.
- VERRIER J, KRA L (2012) Dermatophyte identification in skin and hair samples using a simple and reliable nested polymerase chain reaction assay. *British Association of Dermatologist* **(168)**:295–301.
- YO A, MIKACHI Y, TAKAKO N, JUN I, VE KOICHI M (2016) Detection and identification of *Trichophyton tonsurans* from clinical isolates and hairbrush samples by loop-mediated

isothermal amplification system. *Journal of Dermatology* **43**(Nov/2015):1037–43.

YOUNG J, ANNE H (2014) *Identification of pathogenic fungi*. C.59. Health Protection Agency.

ZHANG Y J, ZHANG S, LIU X Z, WEN H A, WANG M (2010) A simple method of genomic DNA extraction suitable for analysis of bulk fungal strains. *Letters in Applied Microbiology* **51**(1):114–18.



ÖZGEÇMİŞ

I-Bireysel bilgiler

Adı Soyadı: Gültekin Ünal

II-Eğitimi

Lisans: Veteriner Hekim (Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi, 2016)

Lisans: Jeoloji Mühendisliği (İstanbul Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi (2009-2011)

Yabancı Dil: İngilizce

III-Ünvanları

Veteriner Hekim

IV- Mesleki Deneyimi

- Bioeksen Ar-Ge Teknolojileri, Ankara Uygulama Bölge Sorumlusu (2017,devam ediyor)
- Kanatlılardan ve Gıdalardan salmonella kontrol ve eradikasyonu programları geliştirilmesi, Tübitak 1003, 2. aşama (Kasım 2016-Mayıs 2017)
- Part-Time Asistan Öğrenci, Patoloji A.B.D (2013-2016)
- Hannover Veteriner Üniversitesi, IAESTE Stajyeri
- Laboratuvar Asistanı, Synevo laboratuvarları (03.2013-08.2013)

V- Üye olduğu bilimsel kuruluşlar

Veteriner Mikrobiyoloji Derneği

VI- Bilimsel İlgi Alanları, Yayınları

Mikrobiyoloji, Viroloji, Biyoteknoloji, Zoonozlar, Epidemiyoloji

Seminer: Mantar hastalıklarının teşhisinde moleküler yöntemler ve kullanım alanları

Yayınları:

- Diagnosis of Salmonella Gallinarum and Pullorum via qPCR ,Özlem Kardoğan, İnci Başak Kaya, Arda Arman, Gültekin Ünal, Mustafa Kolukırmık, Mayıs 2019, 5th International Poultry Meat Congress

- Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi Virüsünün Moleküler Tanısında İki Farklı Kitin Karşılaştırılması, Yasemin Coşgun, Fatma Bayrakdar, Burcu Gürer Giray, Gültekin Ünal, Arif Yavuz, Esmâ Ödevli, Mustafa Kolukırk, Gülay Korukluoğlu, Selçuk Kılıç. November 2018 Conference: Turkish Microbiology Congress At: Antalya
- Solunum Yolu Virüslerinin Moleküler Tanısı İçin Cihaz ve Kit Geliştirilmesi. Fatma Bayrakdar, Volkan Demir, Gültekin Ünal, Arif Yavuz, Gözde Girgin Gümüş, Ayşe Başak Altaş, Canan Ketre, Mustafa Kolukırk, Gülay Korukluoğlu, Selçuk Kılıç. November 2018, Conference: The XXXVIII. Turkish Microbiology Congress, Antalya, TURKEY
- Genotyping of Brucella abortus and Brucella melitensis of animal origin by Real-Time PCR. Gültekin Ünal, Hamit Kaan Müştak, Mustafa Kolukırk, Selçuk Kılıç, Oct 2018, Veteriner Microbiology Kongresi, Antalya
- HIV-1 İle Enfekte Kişilerde Abakavir Hipersensitivitesi ile İlişkili HLA-B57:01 Allel Prevalansının SNP ve RT-PCR ile İncelenmesi. Tülin Demir, Süleyman Yalçın, Gültekin Ünal, Selçuk Kılıç, Nov. 2017, TMC Kongresi, Antalya