



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



**DERMATOFİTLERİN KONVANSİYONEL VE MALDI-
TOF YÖNTEMİ İLE TANIMLANMALARI VE SIVI
MİKRODİLUSYON YÖNTEMİYLE ANTİFUNGAL
DUYARLILIK PROFİLLERİ**

Nihal ALEM TEKİNASLAN

VETERİNERLİK MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Barış SAREYYÜPOĞLU

ANKARA

2022

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DERMATOFİTLERİN KONVANSİYONEL VE MALDI-
TOF YÖNTEMİ İLE TANIMLANMALARI VE SIVI
MİKRODİLUSYON YÖNTEMİYLE ANTİFUNGAL
DUYARLILIK PROFİLLERİ**

Nihal ALEM TEKİNASLAN

VETERİNERLİK MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Barış SAREYYÜPOĞLU

ANKARA

2022

ETİK BEYAN

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Dermatofitlerin Konvansiyonel ve MALDI-TOF Yöntemiyle Tanımlanmaları ve Sıvı Mikrodilasyon Yöntemiyle Antifungal Duyarlılık Profilleri” 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: Nihal ALEM TEKİNASLAN

Tarih: 01.06.2022

İmza:

KABUL VE ONAY

Ankara Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Mikrobiyoloji Anabilim Dalında

Nihal ALEM TEKİNASLAN tarafından hazırlanan “Dermatofitlerin Konvansiyonel ve MALDI-TOF Yöntemiyle Tanımlanmaları ve Sıvı Mikrodilasyon Yöntemiyle Antifungal Duyarlılık Profilleri” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından DOKTORA TEZİ olarak OY BİRLİĞİ ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi:

İmza

Unvanı Adı ve Soyadı

Üniversitesi

Jüri Başkanı

İmza

Unvanı Adı ve Soyadı

Üniversitesi

Raportör

İmza

Unvanı Adı ve Soyadı

Üniversitesi

Üye

İmza

Unvanı Adı ve Soyadı

Üniversitesi

Üye

İmza

Unvanı Adı ve Soyadı

Üniversitesi

Üye

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
Kabul ve Onay	iii
İçindekiler	iv
Önsöz	vi
Simgeler ve Kısaltmalar	vii
Şekiller	ix
Çizelgeler	x
1. GİRİŞ	1
1.1. Mikolojinin Tarihçesi	1
1.2. Mantarların Sınıflandırılması	3
1.3. Mantarların Yapısı	5
1.4. Dermatofitlerin Etiyolojisi	8
1.5. Dermatofitlerin Epidemiyolojisi	15
1.6. Dermatofitlerin Patogenezi	20
1.7. Dermatofitlerin Hayvan ve İnsanlarda Klinik Teşhisi	23
1.8. Dermatofitlerin Laboratuvar Teşhisi	26
1.8.1. Klinik Örnek Alma	26
1.8.2. Wood Lambası	27
1.8.3. Direkt Mikroskopik İnceleme	27
1.8.4. Kültür ve İdentifikasyon	28
1.8.5. Moleküler Yöntemler	30
1.8.6. Maldi Tof MS	31
1.8.6.1. Maldi Tof Ms ile Mantarların Tanımlanması	37
1.8.6.2. Maldi Tof Ms ile Dermatofitlerin Tanımlanması	38
1.9. Tedavi	41
1.9.1. Antifungal İlaçlar	42
1.9.2. Antifungal Duyarlılık Testleri	48
1.10. Koruma	51
2. GEREÇ ve YÖNTEM	53
2.1. Gereç	53
2.1.1. Kullanılan Besiyerleri	53
2.1.2. Antifungal Duyarlılık Testinde Kullanılan İlaçlar	57
2.1.3. Boyalar ve Kimyasal Solüsyonlar	58
2.1.4. Kullanılan Cihazlar	59
2.2. Yöntem	59
2.2.1. Yeniden Canlandırma	59
2.2.2. Üre Hidroliz Testi	60
2.2.3. Maldi Tof MS ile Dermatofitlerin Tanımlanması	60

2.2.4. Antifungal Duyarlılık Testleri	61
3. BULGULAR	64
4. TARTIŞMA	77
5. SONUÇ ve ÖNERİLER	89
ÖZET	91
SUMMARY	92
KAYNAKLAR	93
ÖZGEÇMİŞ	106



ÖNSÖZ

Dermatofitler, insan ve hayvanlarda deri, tırnak ve kılların stratum corneum tabakasına yerleşerek dermatofitoz denilen infeksiyon meydana getirirler. Dermatofitozlar hayvanlardan insanlara ve insanlardan hayvanlara bulaşabilen zoonotik infeksiyonlardır. Bu yüzden dermatofitlerin tanımlanması halk sağlığı açısından önemlidir. Bu tez çalışmasında dermatofitlerin geleneksel yöntemlerle ve yeni bir yöntem olan MALDI-TOF MS ile identifikasyonları karşılaştırılmış ve antifungal duyarlılık profilleri değerlendirilmiştir.

Doktora eğitimim boyunca bilgi ve deneyimleriyle yoluma ışık tutan, desteğini esirgemeyen danışman hocam Sayın Prof. Dr. Barış SAREYYÜPOĞLU'na;

Daha önce danışmanlığımı yapan bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım Sayın Prof. Dr. Müjgan İZGÜR'e;

Yetişmemde emeği geçen, bilgi ve tecrübesiyle tezimin her aşamasında desteğini benden esirgemeyen Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü, Ulusal Mikoloji Referans Laboratuvarı Sorumlusu değerli hocam Sayın Doç. Dr. Nilgün KARABIÇAK'a;

Tez çalışmamdaki katkılarından dolayı Sağlık Bakanlığı, Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü, Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları ve Biyolojik Ürünler Daire Başkanı Dr. Edibe Nurzen NAMLI BOZKURT'a;

Katkılarından dolayı Dr. Kimyager Yasemin NUMANOĞLU ÇEVİK'e ve Kimyager Tolga ÇALIŞKAN'a;

Tezimin her aşamasında sevgi ve sabrıyla her türlü desteğini benden esirgemeyen, sevgili eşim, en iyi arkadaşım Bilim Uzm. Bio. Göksel TEKİNASLAN'a;

Motivasyon kaynaklarım canım kızım Naz Ece TEKİNASLAN ve canım oğlum Göktuğ Efe TEKİNASLAN'a:

Beni bugünlere getiren sevgi ve fedakarlıklarını her daim hissettiğim bana her zaman destek olan annem Binnur ALEM ve babam Mehmet ALEM'e;

Tez sürecinde yanımda olan ailem ve arkadaşlarıma;
Teşekkürlerimi sunarım.

SİMGELER VE KISALTMALAR

AFST	Antifungal Susceptibility Testing
CLSI	Cinical and Laboratory Standards Institute
DIM	Dermatophyte Identification Medium
DTM	Dermatophyte Test Medium
ECV	Epidemiological Cutoff Value
EUCAST	European Comittee on Antimicrobial Susceptibility Test
g	Gram
HCCA	μ-siyano-4-hidroksisinamik asit
ITS	Internal Transcribed Spacer
KOH	Potasyum hidroksit
MALDI-TOF MS	Matrix-Assisted Laser Desorption–Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry (Matriks Aracılı Lazer Dezorpsiyon İyonizasyon-Uçuş Zamanı Kütle Spektrometrisi)
M	Molar
μl	Mikrolitre
MEK	Minimum Efektif Konsantrasyon
MİK	Minimal İnhibisyon Konsantrasyonu
ml	Mililitre
mM	Milimolar
μg	Mikrogram
MOPS	3-N-morpholine-propane sulfonic acid
NaOH	Sodyumhidroksit
SDA	Sabourraud Dextrose Agar
SSDA	Siklohegzimidli Sabouraud Dekstroz Agar
PDA	Patates Dekstroz Agar
pH	Power of Hydrogen
rDNA	Ribozomal DNA
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
°C	Santigrat Derece

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. Çeşitli aseksüel sporlar A. Artrospor B. Blastospor C. Klamidospor	7
Şekil 1.2. Çeşitli Konidyosporlar A. Mikrokonidyum B. Makrokonidyum	8
Şekil 1.3. MALDI-TOF kütle spektrometrisi	34
Şekil 1.4. MALDI TOF MS yönteminin çalışma prensibi	35
Şekil 3.1. <i>T. rubrum</i> 'un SDA besiyerinde. A. Önden koloni görünümü B. Arkadan koloni görünümü	64
Şekil 3.2. <i>M. canis</i> 'in SDA besiyerinde. A. Önden koloni görünümü B. Arkadan koloni görünümü	65
Şekil 3.3. <i>T. mentagrophytes</i> 'in SDA besiyerinde. A.Önden koloni görünümü B. Arkadan koloni görünümü	65
Şekil 3.4. <i>T. rubrum</i> 'un PDA besiyerinde. A. Önden koloni görünümü B. Arkadan koloni görünümü	65
Şekil 3.5. <i>M. canis</i> 'in PDA besiyerinde. A. Önden koloni görünümü B. Arkadan koloni görünümü	66
Şekil 3.6. <i>T. mentagrophytes</i> 'in PDA besiyerinde. A. Önden koloni görünümü B. Arkadan koloni görünümü	66
Şekil 3.7. a. Üre agarda <i>T. rubrum</i> 'un üreaz negatif aktivitesi b. Üre agarda <i>T. mentagrophytes</i> 'in üreaz pozitif aktivitesi	66
Şekil 3.8. <i>T. rubrum</i> 'un mikroskopik görüntüsü	67
Şekil 3.9. <i>M. canis</i> 'in mikroskopik görüntüsü	67
Şekil 3.10. <i>T. mentagrophytes</i> 'in mikroskopik görüntüsü	68
Şekil 3.11. <i>T. mentagrophytes</i> 'in MALDI-TOF MS spektrum görünümü	69
Şekil 3.12. <i>T. rubrum</i> 'un MALDI-TOF MS spektrum görünümü	69
Şekil 3.13. <i>M. canis</i> 'in MALDI-TOF MS spektrum görünümü	70
Şekil 3.14. Dermatofit suşunun MİK plağındaki üreme görünümü	72

ÇİZELGELER

Çizelge 1.1. Dermatofitlerin genel sınıflandırılması	4
Çizelge 1.2. Dermatofitlerin ekolojik özelliklerine göre sınıflandırılması	5
Çizelge 2.1. Antifungal ilaçların çözücü, dilüentleri ve MİK aralıkları	62
Çizelge 3.1. Dermatofit suşlarının konvansiyonel tanımlama, MALDI-TOF MS tanımlama sonuçları ve MALDI-TOF skorları	71
Çizelge 3.2. Dermatofit suşları için önerilen MALDI-TOF skorları ile düşürülmüş MALDI-TOF skorlarının karşılaştırılması	72
Çizelge 3.2. <i>M. canis</i> 'in antifungallere karşı duyarlılık profilleri	75
Çizelge 3.3. <i>T. mentagrophytes</i> 'in antifungallere karşı duyarlılık profilleri	75
Çizelge 3.4. <i>T. rubrum</i> 'un antifungallere karşı duyarlılık profilleri	76

1. GİRİŞ

1.1. Mikolojinin Tarihçesi

Milattan önce iki bin ile bin yılları arasında mantar infeksiyonlarına ait ilk bilgiler Samitha adlı Hindu kutsal yazıtlarında bulunmaktadır. Bu yazıtlarda ayak miçetomasından bahsedilmektedir. Dermatofit infeksiyonlarını Yunanlılar, oluşan lezyonların yuvarlak olması sebebiyle “herpes”, Romalılar ise lezyonları böceğe benzettiklerinden dolayı küçük böcek larvası manasına gelen “tinea” olarak isimlendirmişlerdir (Yücel, 1999). Mantarlara ait hifa yapılarını ilk olarak 1677’de Robert Hooke ve sonra 1680’de Leeuwenhoek mikroskopta incelemiş ve mantar hücrelerini tarif etmişlerdir.

Agostino Bassi 1835’de ipek böceğindeki mantar infeksiyonunu keşfetmiş ve bu muskardin hastalığının etkenine *Beauvaria bassieni* adını vermiştir. Alibert 1806’da bazı baş derisi infeksiyonlarında görülen eksudatı tanımlamak için “favus” terimini kullanmıştır. Remark 1834-1845 yılları arasında, Schöenlein ve Gruby birbirinden bağımsız olarak favusu incelemişlerdir. Robert Remark 1834’de favus kabuklarında hifa varlığını gözlemleyen ilk kişidir. Johann L. Schöenlein 1839’da favus etkeninin mantar olduğunu bildirmiştir. Remark 1845’de favus etkenini kültürde üretmiş ve hocası Schoenlein’i onurlandırmak için “*Achorion schoenleinii*” olarak isimlendirmiştir. Gurby, 1841’de favus etkenini besiyerinde izole etmiş, 1843 yılında ise Koch postulatlarını uygulayarak *Microsporum*’u etken ajan olarak tanımlamıştır. Gurby, *Microsporium audouinii* türünü ilk kez tanımlamış ve bu türün ismini yakın arkadaşı Victor Audouin’e ithaf etmiştir (Samanta, 2015).

Malmsten 1845’de *Trichophyton tonsurans* türü ile temsil edilen *Trichophyton* cinsini tanımlamıştır. 1847’de Charles Robin *Trichophyton mentagrophytes*’i tanımlamıştır (Negroni, 2010). Baerensprung 1855 yılında egzema marginatum’lu lezyonlardan izole ettiği mantara *Epidermophyton floccosum* ismini vermiştir (Yücel, 1999).

Hebra 1870’de, *Epidermophyton floccosum*’un neden olduğu tinea cruris infeksiyonunu tanımlamıştır. *Microsporum gallinae* 1881 yılında Megnin tarafından, *Trichophyton equinum* 1898 yılında Matruchot ve Dassonville tarafından tanımlanmıştır (Negroni, 2010).

Fransız dermatolog Dr. Raymond Jacques Adrien Sabouraud 1910 yılında “Les Teignes” isimli yayınında dermatofitlere neden olan etkenleri *Achorion*, *Epidermophyton*, *Microsporum* ve *Trichophyton* olarak dört grup halinde sınıflandırmıştır (Negroni, 2010).

Sabouraud dermatofitlerin sınıflandırılması, kültür metotları ve dermatofitosizlerin tedavisi üzerine önemli çalışmalar yapmış ve mikoloji tarihinde bir dönüm noktası olmuştur. Sabouraud dermatofitlerin aktif bir şekilde üremesini sağlayan ve kendi adıyla anılan bir besiyeri geliştirmiştir. Bu besiyeri birtakım değişikliklere uğramasına rağmen bugün halen dermatofitlerin ayırt edilmesinde başarıyla kullanılmaktadır.

Chester W. Emmons 1934 yılında Sabouraud’un sınıflandırmasını yeniden revize etmiş ve dermatofitleri makrokonidyumlarının yapısal özelliklerine göre *Epidermophyton*, *Microsporum* ve *Trichophyton* olarak 3 cinste sınıflamıştır. Bu gruplama mikolojinin dönüm noktası olmuştur (Negroni, 2010).

Bodin ilk kez *Microsporum canis* ve *Microsporum gypseum* olmak üzere iki *Microsporum* türü tanımlamıştır. Hindistan’da Dey ve Kakoti adlı araştırmacılar 1955’de, ilk kez laboratuvar tavşanlarının ringworm lezyonlarından *Microsporum gypseum* izole ettiklerini bildirmişlerdir. Tewari 1962’de buzağı, köpek ve kümes hayvanlarından ilk kez *Trichophyton verrucosum*, *T. mentagrophytes* ve *Trichophyton violaceum* izole edilmiştir. Kalküta’daki, Bengal Veteriner Koleji’nde köpek ve buzağılardan ilk kez *Trichophyton rubrum* izole edildiği rapor edilmiştir. Delhi’de Kandhari ve Sethi isimli araştırmacılar, 1964 yılında, köpeklerde *M. canis* enfeksiyonunun varlığını bildirmişlerdir. 1968’de Gupta ve arkadaşları domuzlarda

Microsporum nanum bulunduğunu bildirilmişlerdir. Tewari, 1969 yılında tavuk, köpek ve insanlardan *Trichophyton simii* izole etmiştir (Samanta, 2015).

Ülkemizde mikolojinin yüz yılı aşan bir geçmişi vardır. Celalettin Muhtar 1892’de el ve ayakta görülen dermatofitleri hakkındaki ilk makaleyi yayımlamıştır. Bunu 1908 yılında Talad’ın favus konusundaki yayını izlemiştir. Daha sonra 1910’da Eyüp’ün saçkıran ve Englaender’in 1916’da onkomikoz konusundaki eserleri yayımlanmıştır. 1952’de Prof. Dr. Ekrem Kadri Unat tarafından yayımlanan araştırmayla ülkemizde bulunan dermatofitlerin listesi ilk defa hazırlanmıştır (Ateş, 2007).

1.2. Mantarların Sınıflandırması

Mantarlar alemi, *Ascomycota*, *Zygomycota*, *Basidiomycota*, *Deuteromycota* olmak üzere 4 sınıfa ayrılır. *Zygomycota*, *Ascomycota* ve *Basidiomycota* eşeyli üreme gösterir. Dermatofitlerin çoğu sadece eşeysiz çoğalan mantarları barındıran “*Deuteromycota*” sınıfında bulunmaktadır (Warnock, 2009). Bu sınıf, *Microsporum*, *Trichophyton* ve *Epidermophyton* olarak üç cinste gruplanır. *Microsporum* cinsi 18, *Epidermophyton* cinsi 2 ve *Trichophyton* cinsi 21 türe sahiptir. Türlerin birbirinden ayrımı için öncelikle kültürdeki üreme özelliklerine, kolonilerin morfolojisine, makroskopik ve mikroskopik özelliklerine bakılır. Daha sonra pigment üretimi, üreaz aktivitesi, bazı besin maddelerine olan gereksinimleri göz önünde bulundurularak değerlendirme yapılmaktadır (Gözüböyük, 2013 ve Tümbay, 1983).

Zaman içerisinde dermatofitlerin isimlendirilmesinde bazı değişiklikler olmuştur. Dawson ve Gentles toprak kökenli keratofilik mikroorganizmaların eşeyli şekillerinin de bulunabileceğini bildirmiştir. Bu nedenle, eşeyli evresi de olan bu grup *Ascomycotina* sınıfına yerleştirilmiştir. Bugüne dek *Deuteromycotina* sınıfında yer alan *Trichophyton* cinsinden 11, *Microsporum* cinsinden 10 türün eşeyli evreleri saptanmış, bunlarda sırası ile *Arthroderma* ve *Nannizzia* olarak tanımlanmıştır (Ateş, 2007).

Günümüzde ise eşeyli üreyen dermatofitler *Ascomycota* filumu, *Onygenales* takımı ve *Arthrodermataceae* familyasında cinsi içinde sınıflandırılmıştır (Samanta, 2015).

Çizelge 1.1. Dermatofitlerin genel sınıflandırılması.

Alem	Mantar
Bölüm	Ascomycota
Sınıf	Euascomycetes
Takım	Onygenales
Aile	Arthrodermataceae
Cins	<i>Epidermaphyton</i> , <i>Microsporum</i> , <i>Trichophyton</i>
Tür	<i>T. tonsurans</i> , <i>M. canis</i>

Dermatofitler üç ekolojik sınıfa ayrılmaktadır. Bu ayırım doğal yaşam kaynakları ve konak seçimine göre yapılır:

1. İnsandan insana direkt veya indirekt olarak bulaşabilen antropofilik dermatofitler.
2. Genellikle hayvanları enfekte edern ancak insanlara da bulaşabilen zoofilik dermatofitler.
3. İnsan ve hayvanlarda nadiren hastalık yapan toprakta yaşayan jeofilik dermatofitler.

Çizelge 1.2. Dermatofitlerin ekolojik özelliklerine göre sınıflandırılması (Samanta, 2015).

Antropofilik	Jeofilik	Zoofilik
<i>Epidermophyton floccosum</i>	<i>Microsporum gypseum</i>	<i>Microsporum canis</i>
<i>Trichophyton rubrum</i>	<i>M. nanum</i>	<i>M. equinum</i>
<i>T. tonsurans</i>	<i>M. persicolor</i>	<i>M. gallinae</i>
<i>T. schoenleinii</i>	<i>M. vanbreuseghemii</i>	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>
<i>T. violaceum</i>	<i>M. cookie</i>	<i>T. simii</i>
<i>T. megninii</i>	<i>Trichophyton terrestris</i>	<i>T. verrucosum</i>
<i>Microsporum audouinii</i>		<i>T. equinum</i>

Uluslararası İnsan ve Hayvan Mikolojisi Derneği (ISHAM) çalışma grupları geniş çaplı dermatofit araştırmaları yapmaktadır. Temel taksonomik özellikler, son yıllardaki dizileme ve moleküler biyolojik yöntemlerin gelişmesi ile tür düzeyinde değişiklikler yapılmaktadır (Graser ve ark., 2018). Örnek olarak De Hoog ve ark. (2017), *Arthrodermataceae* ailesini yeniden filogenetik olarak sınırlandırmıştır. Güncel duruma göre dermatofitler; *Arthroderma*, *Epidermophyton*, *Microsporum*, *Lophophyton*, *Nannizzia*, *Paraphyton* ve *Trichophyton* cinslerini içermektedir (Graser ve ark., 2018).

1.3. Mantarların Yapısı

Mantarlar, ökaryotik hücre yapısında bulunan, genellikle hareketsiz aerobik mikroorganizmalardır. Mantarlar, maya ve küfler olmak üzere ikiye ayrılırlar. Mayaların üremeleri küremsi yapıda ve tek hücre şeklindedir. Küfler ise çok hücreli filamentöz iplikçikler şeklinde ürerler. Küflerde görülen filamentöz yapılara hifa denir. Hifalar, mantar türlerine bağlı olarak; bölmeli (septumlu) hifalar, bölmesiz (septumsuz) hifalar, raket hifalar, nodüller cisimcik, taraksı cisim, spiral cisimcik ve favus şamdanı gibi çeşitli şekillerde oluşurlar. Hifaları dallanması ve birbirlerine

sarılması bazen de birleşmesi ile miselyumları oluştururlar. Miselyumlar vejatatif gövdeyi oluştururlar. Mantar kolonisi içerisinde bazı hifalar beslenmeyi sağlamak üzere üzerinde yaşadığı substratın içine doğru uzanmışlardır. Bunlar beslenmeyi sağlar ve vejatatif hifa olarak adlandırılırlar. Dışarıda kalan diğer bölümüne ise (aerial hifa) kendilerine özel organizasyonlar oluşturarak çoğalmada görev alırlar. Bunlara ise reproduktif hifa veya fertil hifa denir Bazı maya türü mantarlarda ise hücrelerin birbirine yapışık kalması ile zincirlerden oluşan ipliksi yapıya yalancı hifa (pseudohypha) denir (Arda, 2015 ve Murray, 2015).

Mantar hücresine bakıldığında dışarıdan içeriye doğru yapılar şöyle sıranır; hücre duvarı, sitoplazma zarı, sitoplazma ve çekirdek. Hücre duvarı yapısında glukanlar, mannanlar ve kitin vardır. Sitoplazma membranında insan hücre membranına benzer şekilde sterol bulunur. Sitoplazma ise golgi aparatı, endoplazmik retikulum, ribozom, mitokondri, vakuoller ve çeşitli granülleri içerir. *Cryptococcus* gibi bazı mantarlarda hücre çeperinin dışında polisakkarid yapıda bir kapsül bulunur (Topçu, 2002).

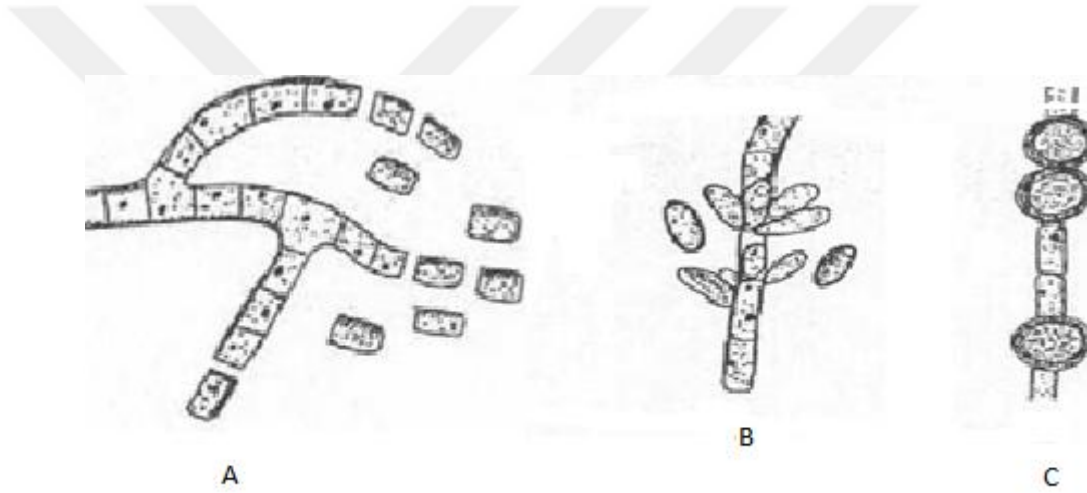
Mantarlar eşeyli (seksüel) ve eşeysiz (aseksüel) olmak üzere 2 şekilde çoğalırlar. Mantarlarda üremeyi sağlayan hücreye spor denir. Mantarlar zigospor, basidiyospor, askospor, ve oospor adı verilen sporları oluşturarak eşeyli ürerler. Artrospor, klamidospor, blastospor ve konidiosporla ise eşeysiz olarak ürerler (Arda, 2015). Eşeyli (seksüel) olarak üreyen mantarlar, tam (perfect, kusursuz) mantarlar olarak isimlendirilir. *Ascomycetes*, *Basidiomycetes* ve *Zygomycetes* sınıflarındaki bazı türler tam mantarları oluşturmaktadır. Tam olmayan (imperfect) mantarları, perfect (tam) olanlardan eşeysiz şekilde spor oluşturmaları ayırır. Sporlar hifaların uçlarında ve duvarlarında serbest bir şekilde tomurcuklanma veya bölünme ile meydana gelirler. Bu sporlara konidiyum denir. Mantarların üreme siklusları konidiyumlarda gerçekleşir (Topçu, 2002).

Mantarlarda 5 tür konidyum görülür. Bunlar;

1-) Blastokonidyum (Blastospor): Maya ve maya benzeri mantarlarda ana hücreden tomurcuklanma ile oluşur.

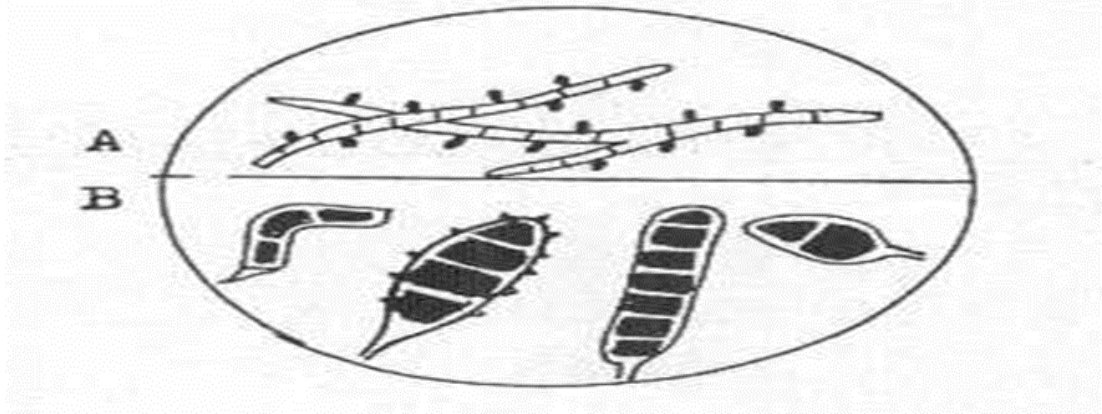
2-) Artrokonidyum (Artrospor): Bir hifadaki septumların sıkışıp oluşan hücrelerin septum hizasından ayrılması ile oluşur.

3-) Klamidokonidyum (Klamidospor): Hifada oluşan kalın duvarlı, granüler sitoplazmalı, dış koşullara ve vejetatif hücrelere göre daha dirençli konidyumdur.



Şekil 1.1. Çeşitli aseksüel sporlar A.Artrospor B. Blastospor C.Klamidospor (Arda, 2015).

4-) Makrokonidyum ve Mikrokonidyum: Saplı veya sapsız hifa bağlanan konidyumlardır. Makrokonidyumlar genellikle çok hücreli, mikrokonidyumlar ise genellikle tek hücrelidir. Cins ve türe göre değişmek üzere farklı şekil gösterirler.



Şekil 1.2. Çeşitli konidyosporlar A. Mikrokonidyum B. Makrokonidyum.

5-) Sporangiyokonidyum (Sporangiospor): Bölmesiz hifa ucunda sporangium adı verilen kese içindeki konidyumlardır. Zygomycetes'te görülür (Tümbay, 2014).

Mantarlar üreme özelliklerine göre, Monomorfik mantarlar ve Dimorfik mantarlar olmak üzere ikiye ayrılırlar. Küf veya maya biçiminde üreme gösteren mantarlara monomorfik mantarlar denir. Dimorfik mantarlar ise doğal ortamlarında ve oda ısısındaki besiyerlerinde küf, in-vivo ve 35-37 °C'de maya şeklinde üreyen mantarlardır. Mayanın küfe, küfün maya dönüşümüne termal dimorfizm denir. Dimorfik mantarlar doğada küf olarak bulunurken insan vücudunda ise maya veya sferül biçiminde bulunurlar. Dimorfik mantarlar şunlardır: *Blastomyces dermatitidis*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis*, *Sporothrix schenckii*, *Penicillium marneffe* (Ustaçelebi, 1999).

1.4. Dermatofitlerin Etiyolojisi

Dermatofitlerin oluşturdukları yüzeysel mantar infeksiyonları, dermatofitoz olarak adlandırılır. Çeşitli kütanöz infeksiyonlar meydana getirirler. Dermatofitlerin insan ve hayvanlarda oluşturdukları infeksiyonlar “Ringworm” olarak da isimlendirilir. Dermatofitler derinin stratum corneum katmanı, kıl ve tırnak keratini içinde kalır ve derin dokulara inmezler. Kan yoluyla yayılmazlar. Dermatofitler

eşeysiz üreme özelliklerine göre incelenir. Dermatofitlerin tanımlanmalarında ilk olarak mikroskopik görünüşleri, Sabouraud Dekstroz Agar'daki koloni özellikleri, konidyumları, pigmentasyonları değerlendirilir. Yardımcı olarak beslenme gereksinimlerinin değerlendirildiği testler, ısıya tolerans özellikleri, üre hidrolizi ve kıl delme deneyleri gibi fizyolojik testler de yapılabilir (Greer, 1994).

Dermatofitler morfolojik özellikleri ile ilişkili olarak *Trichophyton*, *Microsporum* ve *Epidermophyton* olmak üzere üç cins altında sınıflandırılmışlardır.

***Epidermophyton* Cinsi**

Epidermaphyton türleri 1907 yılında Sabouraud tarafından tanımlanmıştır. Bu cinse ait 2 tür bilinmektedir. *Epidermaphyton floccosum* ve *Epidermaphyton stockdaleae*. Sadece *E. floccosum* patojeniktir. *E. floccosum* kılı infekte etmez, saçsız deri ve tırnakta enfeksiyona neden olur. Mikrokonidyumları yoktur. Makrokonidyumları muz salkımına benzer şekilde, lobut ya da tenis raketi biçiminde yuvarlak uçlu, hafif kalın duvarlı ve düzgün yüzeylidir. Makrokonidyumlar hifaya doğrudan bağlanırlar. Eski kolonilerde ara ve uç klamidosporeler görülür. Besiyerlerinde 10 günde ürerler. Kolonileri yeşilimsi-kahverengi veya hâkî renktedir. Koloni örgüsü süete benzer. Koloninin ortası kabarık ve kıvrımlıdır. Koloni çevresi yassı, düz olup hifalar besiyerine giren saçaklar oluşturur. Koloni tabanı, sarımsı-kahverengidir. Yaşlanma ile koloni yüzeyinde beyaz, pleomorfik misel öbekleri belirir. İn-vitro üreme için özel besin gereksinimi yoktur. *E. floccosum* antropofilik dermatofittir. Lezyonları Wood ışığı altında floresans vermez (Samatha, 2015 Tümbay, 2014 ve Weitzman, 1995).

***Microsporum* Cinsi**

Microsporum cinsindeki türlerin üreme süreleri 7 ila 10 gün arasındadır. Saçlı deri, saçsız deri ve tırnak enfeksiyonlarına sebep olurlar. Kolonileri yassı ve yayılıcıdır. Koloni yüzey, sık pamuğumsu örgüdedir. Koloni rengi beyazdan kreme

kadar değişen tonlardadır. Koloni tabanı parlak altın sarısından kahverengimsi sarıya kadar değişen tonlarda olabilir. Makrokonidyum ve mikrokonidyumları bulunur. Mikrokonidyumları az sayıda gözyaşı veya armut şeklindedir ancak mikrokonidyumların tanısıl önemi yoktur. Çok sayıda makrokonidyumları bulunur. Makrokonidyumları mekik şeklinde ve 5 ila 15 hücrelidir. Makrokonidyum duvarları kalın ve pürtüklüdür. Makrokonidyumlar türlere göre farklılık gösterirler. Örneğin *M. canis* ucu sivri, pürtüklü fiçı şeklinde, 1-15 hücreliyken *M. gypseum* ise yuvarlak uçlu, daha az bölmelidir. *M. audouinii* 'nin çoğu zaman mikrokonidyumları yoktur, makrokonidyumları ise nadir görülür. Ancak uç klamidosporeler ile taraksı hifalar tanı koydurucudur (Koneman,1997; Tümbay, 2014 ve Weitzman, 1995).

M. canis zoofilik bir dermatofittir. Özellikle kedi ve köpeklerde infeksiyona sebep olurlar. Kedi ve köpeklerle temas eden insanlarda da infeksiyon yaparlar. Tinea capitis, Tinea corporis, Tinea unguium etkenidir. Kılta ektotriks infeksiyon yapar. *İn-vitro* kıl delme deneyi olumsuzdur. Lezyonları Wood ışığı altında parlak yeşilimsi floresans verir. Üremeleri için özel besin gereksinimi yoktur (Tümbay, 2014). Üremeleri 6 ila 10 gün arasındadır. Kolonilerinin yüzeyi beyaz pamuğumsudur. Koloni yüzeyi sarı renkli olup zamanla kahverengine döner. Mikrokonidyumları az ve armut şeklindedir. Makrokonidyumları çok sayıda iğ şeklinde 6-15 bölmelidir. İlk izolasyon sırasında sporülasyon az olabilir. Pişmiş beyaz pirince pasaj ile sporülasyon sağlanabilir.

M. gypseum jeofilik bir dermatofittir. Özellikle toprakla oynayan çocuklarda ve tarımla uğraşanlarda infeksiyon yapar. Saçlı deri ve saçsız deride insanlarda Tinea capitis ve Tinea corporis neden olur. Kılta ektotriks infeksiyon yapar. *İn-vitro* kıl delme deneyi olumludur. Lezyonları Wood ışığı altında floresans vermez. Üremesi özel besin gereksinimi yoktur. Ortalama 6 günde ürerler. Üreyen kolonileri yassı ve yayılıcıdır. Koloni örgüsü süete benzerden granüllere kadar değişir. Koloni rengi koyu kremden sarımsı-kahverengine, devetüyü renginden açık tarçın rengine kadar değişir. Bazı tüerlerde ortada beyaz tüylü göbek görülür. Bazı kültürlerde koloni çevresinde dar beyaz periferik bir alan vardır. Koloni tabanında sarı-kahverengi veya kırmızı kahverengi pigment vardır. Çok sayıda makrokonidyum görülür.

Makrokonidyumlar simetrik, elips şeklinde 4 ila 6 hücreli septalıdır. Mikrokonidyumları küçük tek hücreli ve ovaldır (Cervantes, 2003 ve Tümbay, 2014).

M. audounii ekolojik özelliklerine göre antropofilik bir dermatofittir. Saçlı deri ve saçsız deride yerleşim gösterir. Genellikle çocuklarda tinea capitis salgınlarına yol açar. Erişkinlerde infeksiyonu nadirdir. Yavaş ürerler. Koloni yüzeyi yassı, beyaz, kadife görünümlüdür. Koloni tabanı pembe-şeftali rengindedir. Patates Dekstroz Agar'da şeftali rengi pigment oluşturur. Pirinç besiyerinde iyi üreyemezler. Bu özelliği ile *M. canis*'ten ayrılır. Mikrokonidyumları genellikle yoktur. Makrokonidyumlarının duvarları kalın, bölmeleri düzensiz ve iğ şeklindedir. Saçlarda ektotriks infeksiyona sebep olur. Wood ışığında parlak yeşil floresans verir (Gözüböyük, 2013).

M. nanum Sabouraud Dekstroz Agar'da 5-7 günde ürerler. Kolonileri ince, pudramsı ve yaygındır. Kolonilerin kenarları saçaklı olup pembe, kahverengi, sarı ve beyaza kadar değişen renkler gösterir. Koloni tabanı kırmızı kahverengidir (Larone, 2002). Mikrokonidyumları çomak şeklindedir. Makrokonidyumları armut şeklinde bol miktardadır. Soil-Hair Agarda mikro ve makrokonidyumlar Sabouraud besiyerine göre daha fazla miktarda ürerler. *M. nanum* kıl delme testi pozitifdir. *M. nanum* hem jeofilik hem de zoofilik bir türdür (Derincegöz, 2016).

***Trichophyton* Cinsi**

İnsanda mantar enfeksiyonlarının büyük kısmından sorumludurlar. Saç, deri ve tırnakta enfeksiyon oluştururlar. Malmsten tarafından 1845'de identifiye edilmişlerdir. SDA besiyerinde ortalama 1-2 haftada koloni yapıları ortaya çıkar. Kolonileri kabarık, tüylü, tanecikli, parlak veya düz olabilir. Koloni yüzeyi genelde beyaz, deve tüyü, sarı veya krem renkli olabilir. Kolonin tabanı türe göre değişen farklı renklerde bulunur. Mikrokonidyum ve makrokonidyumları vardır. Makrokonidyumları az, mikrokonidyumları çok sayıda gelişir. Makrokonidyumlar silindir, uçları künt, kalem, puro, çomak veya fusiform şeklinde olabilir.

Mikrokonidyumlar küremsi, yuvarlak, çomak ve göz yaşı şeklinde bulunabilir. Mikrokonidyumlar türe özgüdür. Hifanın yanında saplı veya sapsız, tek tek veya üzüm salkımı şeklinde bulunurlar (Derincegöz, 2016 ve Özkütük, 1999).

T. rubrum dünyada en yaygın görülen antropofilik dermatofittir. Özellikle saçsız deri ve tırnak infeksiyonları yapar. Morfolojisine bakıldığında en çok yayasyon gösteren dermatofit çeşidir. Farklı tipte koloniler meydana getirir.

1. Tüylü (downy) tip: Dünyada ve Türkiye’de en sık izole edilen formdur. Tüylü tip granüler tipten gelişmiştir. Koloni yüzeyi yassı veya hafif kabarıktır. Koloni rengi beyazdan kreme kadar değişen tonlardadır. Koloni örgüsü başlangıçta süete benzer, zamanla tüylenir. Koloni tabanı, başlangıçta sarı-kahverengi iken zamanla şarap kırmızısı rengine dönüşür. Mikrokonidyumları lobut veya gözyaşı şeklindedir. Genellikle makrokonidyum görülmez, nadiren görülen makrokonidyumlar ince, düzgün duvarlı olup kalem şeklindedir. İnsanlarda Tinea pedis, Tinea corporis, Tinea unguium etkenidir. Endotriks veya ektotriks infeksiyon yapar. Lezyonları Wood ışığı altında floresans vermez. *İn-vitro* kıl delme deneyi olumsuzdur. Üreaz deneyi olumsuzdur. *İn vitro* üreme için özel besin gereksinimi yoktur.

2. Granüler tip: Güneydoğu Asya ve Avustralya’da görülür. Koloni yüzeyi pudramsı veya granülerdir. Koloni örgüsü süete benzer. Koloni rengi beyaz veya krem rengi olabilir. Koloni tabanı pembemsi-kırmızımsı renktedir. Çok sayıda, şekilleri lobut ya da armut şeklinde mikrokonidyumları vardır. Makrokonidyumları silindirik veya kalem şeklindedir. Tinea corporis etkenidir. Lezyonları Wood ışığı altında floresans vermez. Üreaz deneyi olumludur. *İn-vitro* üreme için özel besin gereksinimi yoktur.

3. Melanoid tip: Tüylü tipe benzer. Besiyerine yayılan kahverengi melanoid pigmenti vardır. Mikrokonidyumları hifaların kenarında ve gözyaşı şeklindedir.

4. Dysgonik tip: Bu tip stabil değildir. Kolaylıkla tüylü tipe döner. Koloniler yavaş gelişir ve kırmızı renklidir.

5. Sarı tip: Koloni yüzeyi tüylü tipe benzer. Kırmızı pigment bulunmaz. Koloni tabanı sarı görünümündedir (Solgun, 2007 ve Tümbay, 2014).

T. mentogrophytes dünyada en yaygın bulunan ikinci dermatofit türüdür. Saçlı deri, saçsız deri ve tırnakta enfeksiyon oluşturur. Antropofilik ve zoofilik suşları olan insanlarda ve hayvanlarda enfeksiyon meydana getiren bir dermatofittir.

Zoofilik suşların kolonileri yassı ve basıktır. Koloni rengi beyaz, krem veya sarımsı renktedir. Koloni örgüsü pudramsıdır. Koloni tabanı başlangıçta sarı-kahverengi olup zamanla kırmızımsı kahverengine dönüşür. Kümeler yapmış üzüm salkımı şeklinde mikrokonidyumlar bulunur. Spiral hifalar görülür. Makrokonidyumları ince duvarlı olup lobut veya puro şeklindedir. Kılta ektriks enfeksiyon yapar. İnsanlarda tinea capitis ve tinea corporis etkenidir. Enfeksiyonları yangılı olup tinea capitis profunda (kerion celsi) yapar.

Antropofilik suşları, sık tüylü ve krem renkli koloni oluştururlar. Koloni örgüsü pudramsıdan süete benzer örgüye kadar değişebilir. Koloni tabanı, pembemsi kahverengi olup zamanla koyu kırmızı kahverengine dönüşür. Çok sayıda armut şeklinde mikrokonidyum görülür. Az sayıda spiral hifa bulunur. Makrokonidyumlar ender görülür, ince ve düzgün duvarlıdır. Tinea pedis ve Tinea unguium etkenidir. Tinea capitis yapmaz. Lezyonlar wood ışığı altında renk vermez. İn vivo kıl delme deneyi ve üraz deneyi pozitifdir (Gözüböyük, 2013 ve Tümbay, 2014).

T. violaceum antropofilik bir dermatofittir. Sıklıkla saçlı deriyi infekte eder. Türkiye’de insanlarda tinea capitisin *M. canis*’ten sonra sıklıktaki etkenidir. Çok yavaş üreyerek koloni oluştururlar. Koloni yüzeyi koyu menekşe rengindedir. Koloni kabarık, küme şeklinde ve yüzeyi kıvrımlıdır. Koloni tabanı mor renktedir. Genellikle makro ve mikrokonidyumları görülmez. Üreme için tiamine kısmen

gereksinim gösterirler. Mikroskopik görünümünde hifalar genişçe yılankavi, çok dallı ve düzensizdir. Genç hifalar iyi boyanır. Yaşlı hifalar boyanmaz, içlerinde yağ damlacıkları ve granüller görülür (Bıyık, 2008 ve Tümbay, 2014).

T. verrucosum zoofilik bir dermatofittir. Sığır ve evcil hayvanlarda enfeksiyon yapar. İnsanlara sığırlardan bulaşır. En çok saçlı deri, sakal derisi ve tırnağı infekte eder. Lezyonları çok yangılıdır. Kılta iri ektotriks yapar. 21 gün gibi bir sürede yavaş üreyip küçük ve çıplak koloniler oluştururlar. Koloni ortası kabarık ve yüzeyi kıvrımlı ve buruşuktur, çevresi basıktır. Koloni rengi genellikle beyazdır. Koloni tabanı renksizden krem ve somon tonlarına kadar değişir. 37°C’ de inkübasyon üremeyi arttırır. Tüm kökenlerin üreme için tiamine ihtiyacı vardır. Kökenlerin %80’i ise tiamin ve inozitole gereksinimi vardır. Mikroskopisinde hifalar geniş ve düzensizdir. Çok sayıda geyik boynuzu şeklinde sonlanan hifalar görülür. Çok sayıda ara ve uç klamidosporeler görülür. Makrokonidyumlar ender görülür, tipik olarak fare kuyruğu veya çalı fasulyesi şeklindedir (Laron, 2002 ve Tümbay, 2014).

T. schonleinii antropofilik bir dermatofittir. Favus (kellik) etkenidir. Çocuklarda saçlı deride enfeksiyon yapar. Yavaş üreme gösterir. Koloni bal peteğine benzer, balmumumsu görünümündedir, kabarık ve kıvrımlıdır. Koloni örgüsü süete benzer, kısa tüylüdür. Koloni rengi kremden sarıya, portakal rengine ve kahverengine kadar varan tonlardadır. Besiyeri içine doğru üreme nedeniyle oluşan koloni besiyerini çatlatır. Mikroskopik yapısına bakıldığında hifalar tipik olarak çivi başı veya favus şamdanları şeklinde sonlanır. Makrokonidyum ve mikrokonidyum görülmez. Klamidosporeleri vardır. Kılta endotriks enfeksiyon yapar. Enfeksiyon bölgesinde skutulum meydana gelmesi, derinin kabuklanması ve dökülen saç yerine yenisinin gelmemesi en önemli özelliğidir (Gözüböyük, 2013; İlkit, 2010 ve Solgun, 2007).

T. tonsurans antropofilik bir dermatofittir. Genellikle saçlı deride enfeksiyon yapar. Bazen tırnak ve saçsız deri tutulumu da görülebilir. Daha çok çocuklarda tinea kapitisin epidemik şeklinden sorumludur. Saçta endotriks enfeksiyon yapar. Lezyonlar wood ışığında floresans vermez. Kolonileri yavaş ürer.

Makrokonidyumları nadirdir. Mikrokonidyumları gözyaşı şeklinde veya genişleyerek balon şeklinde olabilir. Ara ve uç klamidosporeler sıkça görülür. Spiral hifalar ve artrosporelere rastlanabilir. Tiaminli ortamda iyi ürer (Gözüböyük, 2013 ve Saniç, 1999).

1.5. Dermatofitlerin Epidemiyolojisi

Dermatofitosiz, dünyada pet ve çiftlik hayvanlarında en yaygın görülen deri hastalıklarından biridir. Hayvanlarla yakın temas ve evde pet hayvanı bakımının yaygınlaşması insanlar için dermatofit infeksiyonlarına ait önemli bir risk faktörüdür. Bulaşma; tüylerle direkt temas sonucu, fomitler vasıtasıyla veya topraktaki sporeler ile çevreden bulaşma şeklinde olmaktadır. İnsanlardaki dermatofit infeksiyonlarının %80'inden fazlasının zoofilik olabileceği bildirilmiştir (İlhan ve ark., 2016 ve Selvi, 2020). Zoofilik bu türler, insanlarda daha çok kafa, el, yüz, kollar gibi vücudun açık yerlerinde infeksiyon meydana getirirler ve lezyonları yangılıdır (Özkütük, 1999). Zoofilik dermatofitlerden bazıları belli hayvan konaklarının derisine uyum sağlamışlardır. Örneğin *M. canis* kedi ve köpeklerde, *M. nanum* domuzlarda, *M. persicolor* tarla farelerinde, *T. verrucosum* sığırlarda, *T. erinacei* kirpilerde, *T. simii* maymunlarda hastalık meydana getirebilmektedir (Derincegöz, 2016). *T. mentagrophytes* rodentlerde, *T. equinum* atlarda, *M. gallinae* kanatlılarda özellikle kümes hayvanlarında yaygın olarak bulunmaktadır (Chermett ve ark., 2008 ve Selvi, 2020).

Dermatofitozların prevalansı, coğrafi bölgelere ve doğal rezervuarlarda iklim, sıcaklık, bağıl neme göre değişir. İtalya'da, *M. canis* köpeklerden izole edilen en yaygın dermatofittir. Köpeklerden izole edilen jeofilik dermatofit türlerinin (*M. gypseum* ve *T. terrestre*) prevalansının ise %2,2 ile %8,7 arasında değiştiği bildirilmiştir. Bu varyasyonun, coğrafi bölgeler arasındaki sıcaklık ve iklim farklılıklarından kaynaklandığı belirtilmiştir (Mattei ve ark., 2014).

Kedilerdeki dermatofit enfeksiyonlarının %90'ından fazlasına *M. canis* neden olur. *M. canis* köpekler, sığırlar, atlar, domuzlar, keçiler, tavşanlar, kobaylar, maymunlar, kaplanlar ve fareler gibi diğer hayvan türlerini de infekte eder (Fyrum ve ark., 2013). Portekiz, Lizbon'da yapılan bir çalışmada, dermatofitoz pozitif olan 89 kedinin %82'sinin *M. canis* ile infekte olduğu gösterilmiştir (Bernardo ve ark., 2005). *M. canis*'in subklinik enfeksiyonu, uzun tüylü yavru kedilerde de görülmüştür. Endonezya'da yapılan bir araştırma, dermatit enfeksiyonu olan 30 kediden 17'sinin (%56,7) *M. canis*'in oluşturduğu dermatofitoz olduğunu bildirmiştir (İndarjulyanto ve ark., 2017). Ayrıca dermatofitoz dişi hayvanlarda erkeklere göre daha sık meydana gelmektedir. Bu nedenle hayvanlarda dermatofitoz prevalansında cinsiyet ve yaş önemli rol oynamaktadır (Paryuni ve ark., 2020). Köpeklerde 1970-2002 yılları arasında yapılan retrospektif bir çalışmada 66 vakada (66/3854, %1,7) *T. mentagrophytes* bulunurken, 840 vakada (840/3854, %21,8) *M. canis* tanısı konmuştur (Pinter ve Stritof, 2004). Batı Türkiye'de köpeklerde ve kedilerde dermatofit dağılımını belirlemek için yapılan bir çalışmada, 326'lık bir örneklem boyutunda test edilen örneklerin %14,4 'ünün dermatofitoz için pozitif olduğunu bulmuştur (Şeker ve Doğan, 2011). İtalya'da, bildirilen dermatofitoz prevalansı köpeklerde %7,5-20,5 ve kedilerde %24,7-33,3'tür (Gallupi ve ark., 2013). Doğu Hindistan'da yapılan başka bir çalışmada köpeklerden alınan 1209 numuneden ve kedilerden alınan 292 numuneden sırasıyla 253'ü (%20,93) ve 109'u (%37,33) dermatofit sporları için pozitif bulunmuştur (Debnath ve ark., 2015). Bakü'de yapılan bir araştırma, 193 köpek ve kediden 108'inin dermatofit ile enfekte olduğunu göstermiştir (Roshanzamir ve ark., 2016). Dermatofitoz sadece küçük hayvanlarda değil, diğer hayvan türlerinde de görülür. Mısır, Beheira'da çiftlik hayvanlarında yapılan bir dermatofitoz araştırması, farklı hayvan türlerinden toplanan 150 örneğin %74'ünün dermatofit pozitif olduğunu göstermiştir. Bildirilen en yüksek dermatofitoz vaka oranları koyunlarda (%78), ardından mandalarda (%76), sığırlarda (%72) ve atlarda (%68) meydana gelmiştir (Haggah ve ark., 2017). Suudi Arabistan'da dişi develerle yapılan çalışmada alınan 200 örnekten, %11,5'lik bir dermatofitoz prevalansı bulunmuştur. İlginç bir şekilde, daha yüksek insidans genç yaştaki develerde görülmüştür (Almuzaini ve ark., 2015). Mısır'da 200 Arap atıyla yapılan bir çalışmada dermatofitoz prevalansının % 27,5 olduğu, en fazla görülen

dermatofit türlerinin sırasıyla *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton verrucosum* ve *Microsporum canis* olduğu bildirilmiştir (Hamad ve ark., 2019). Ürdün, Irbid'deki sığır çiftliklerinde dermatofitoz prevalansının %10 ila %100 arasında değiştiği bildirilmiştir. Bu çalışma, ayrıca 375 sığırdan 115 (%30,6)'inin tipik bir makroskopik dermatofitoz lezyonuna sahip olarak tanımlandığını göstermiştir (Al-Ani ve ark., 2002). Ankara'da yapılan bir çalışmada 2014-2017 yılları arasında kedi, köpek, at, papağan ve buzağılardan toplanan 395 numuneden 117 (%29,62)'sini dermatofitoz yönünden pozitif olduğu bildirilmiştir (Karacan-Sever ve ark., 2021). İtalya'da cins açısından, Yorkshire teriyerleri, diğer cinslere göre, *M. canis*'in neden olduğu dermatofitozda %46,4'lük bir prevalansa sahiptir. Bu, uzun saçlarından ziyade spesifik olmayan kutanöz savunmalar, sebum ve terdeki kalitatif ve/veya kantitatif farklılıklar ile açıklanabilir. İran kedileri sadece *M. canis* ile enfekte olurken, Avrupalı ve yarı melez cinsler de jeofilik dermatofit türlerinden etkilenmiştir. İran kedilerinde *M. canis* enfeksiyonunun yüksek prevalansı, *M. canis*'in kolayca yayılabileceği büyük gruplarda bir arada tutulma olasılıklarının daha yüksek olmasıyla açıklanabilir. Avrupalı ve melez kedilerde jeofilik dermatofit türlerinin varlığı, onların özel yaşam tarzları yani dış ortamda toprakla temas halinde yaşama eğilimleri ile açıklanabilir (Mattei ve ark., 2014). Atlarda dermatofitoz kış aylarında baskındır ve hızla bir salgına dönüşebilir. Mantar sporları hastalıklı bir hayvandan veya sağlıklı bir taşıyıcıdan diğerlerine bulaşabileceğinden, kapalı ortamlarda ve/veya ahırlarda veya binicilik okullarında bulaşma kolaydır (Moretti ve ark., 2013).

Dermatofitler tüm dünyada dağılım gösterir ve artrokonidyumların, hifaların ya da bu elemanları içeren keratinli materyalin, enfekte bir konaktan enfekte olmamış duyarlı bir konağa aktarılması ile enfeksiyon oluşabilir. Dermatofitler pullanarak dökülen deri materyalinde ya da saç kılında uzun yıllar canlı kalabilir ve enfeksiyon ya doğrudan temas ya da cansız cisimler aracılığıyla bulaşabilir (Murray, 2015). Dermatofitler insanlarda doğal deri bariyerinin ortadan kalkmasına sebep olup çatlaklardan stratum corneuma girerek enfeksiyon oluştururlar.

Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) verilerine göre, dermatofitozlar dünya nüfusunun yaklaşık %25'ini etkiler ve yetişkinlerin %30 ila %70'i bu hastalıkların asemptomatik taşıyıcılarıdır (Petrucelli ve ark., 2020). Her iki cinsiyetten ve her yaştan bireyler dermatofitoza duyarlıdır, ancak tinea kapitis daha çok ergenlik öncesi çocukların, tinea kruris ve tinea pedis ise esas olarak yetişkin erkeklerin hastalığıdır. Dermatofitozlara sıcak ve nemli bölgelerde daha sık rastlanılır. Dermatofitozların özellikle tropikal ve subtropikal bölgeler olmak üzere tüm dünyada görülmesine rağmen, bazı dermatofit türleri coğrafik dağılımları ve insanlardaki virülansları açısından bireysel farklılıklar sergileyebilir. Örneğin *Trichophyton concentricum* Güney Pasifik Adaları ve Asya'da sınırlı iken *T. tonsurans* Amerika'da tinea kapitisin başlıca etkeni olarak *M. audouinii*'nin yerini almıştır (Murray, 2015). Bölgesel olarak görülme aralığı değişmekle birlikte antropofilik türler dünyanın genelinde yayginken jeofilik ve zoofilik türler belirli bölgelerde bulunma eğilimi gösterirler (Saniç, 1999). Dünya genelinde tüm dermatofitozların %80 ila %90'ından *T. rubrum* ve *T. mentagrophytes* sorumludur (Murray, 2015). Bazı dermatofit türleri belirli bölgelerde daha geniş yayılım gösterirler. Örneğin Akdeniz bölgesinde *T. violaceum*; Orta Doğu'da *T. schoenleinii*; Amerika'nın kuzeyi ve batı Avrupa'da *T. tonsurans*; Asya'da, Afrika'da ve Balkanlarda *M. ferrugineum* daha sık görülür (Saniç, 1999).

Dermatofitlerin prevalansı insan hareketliliği, sosyal ve ekonomik farklılıklara göre değişim gösterebilir. Asya ve Afrika'ya özgü dermatofitler olan *T. soudanense*, *T. violaceum*, *M. audouinii*'nin oluşturduğu dermatofitozlar göçler ile Avrupa ve Kuzey Amerika kıtalarına yayılmıştır. 19. yüzyılda Avrupa'da tinea capitis en yaygın dermatofitoz iken 20. yüzyılın sonlarına doğru tinea pedis daha yaygın hale gelmiştir. Türkiye'de en yaygın görülen klinik tablo tinea pedis, en sık izole dermatofit ise *T. rubrum*'dur (Tunçoğlu, 2009). Türkiye'de dermatofitozlar bölgelere göre değişkenlik gösterir. Köy kaynaklı Tinea capitis lezyonlarından en sık *T. schoenleinii*, şehir kaynaklı olanlar ise genellikle *T. violaceum* ve *M. canis* izole edilmektedir (Saniç, 1999). Güneydoğu ve Doğu Anadolu Bölgelerinde Tinea capitisin en sık nedeni *T. violaceum*, *T. schoenleinii*, *T. verrucosum*'dur (Öksüz, 2002).

M. audouinii, *T. tonsurans*, *T. violaceum* ve *T. schoenleinii*'nin etken olduğu Tinea capitisin 1900'lü yıllarda Avrupa'da çok yaygın görüldüğü bilinmektedir. Yaşam kalitesinin artması, hijyenin sağlanmasıyla bu türlerin oluşturduğu infeksiyon önlenmiş ve bu coğrafyada 2. Dünya savaşıdan beri bu türlerin meydana getirdiği tinea capitis rastlanmamıştır. Günümüz dünyasında tinea capitis salgınlarında etken olarak saptanan tür *M. canis*'tir (Bıyık, 2008 ve Devliotou ve ark., 2001). Benzer bir durum Japonya ve çevresinde endemik olan *M. ferrugineum*'da da görülmektedir (Bıyık, 2008 ve Kwon–Chung, 1992). *M. ferrugineum*'dan kaynaklanan dermatofitoz yaşam koşullarının iyileştirilmesiyle son yıllarda neredeyse eradike edilmiştir (Kwon–Chung, 1992). Fakat gelişmiş ülkelerde *T. rubrum*'un etken olduğu tinea pedis infeksiyonları giderek artmaktadır (Bıyık, 2008 ve Özkütük ve ark., 2007).

Dermatofitler farklı konaklarda farklı şekillerde infeksiyon meydana getirirler. *M. audouinii*'nin birçok Kuzey Avrupalı ve Kuzey Avrupa kökenli Amerikalı çocuklarda diğer çocuklara oranla daha az inflamasyon oluşturduğu bildirilmiştir. *T. tonsurans*'ın etken olduğu tinea capitis infeksiyonları İspanyol çocuklarda hafif seyrettiği, siyahi çocuklarda ise genelde çok inflamasyonlu geliştiği görülmektedir (Bıyık, 2008 ve Rippon, 1988).

Sosyal ve ekonomik koşullar, cinsiyet, yaş, iklim dermatofit infeksiyonlarının insidansını etkileyen diğer faktörlerdir (Nelson ve ark., 2003 ve Solgun, 2007). Tinea capitis kalabalık ortamlarda bulunanlarda ve düşük sosyo-ekonomik özellik gösteren toplumlarda daha sık görülmektedir (Solgun, 2007). Tinea capitis genellikle çocukluk çağında görülen bir hastalıktır (Hay, 1992; Macura, 1993 ve Solgun, 2007). Bunun aksine tinea inguinalis genellikle erişkin erkeklerde görülür. Özellikle kapalı ayakkabı kullananlarda, askerlerde, spor salonları, yüzme havuzları, yurtlar gibi ortak alanları kullananlarda görülmektedir. Sıcaklığın ve nem oranının yükseldiği mevsimlerde de tinea pedis vakalarında artma gözlemlenir (Masri-Fridling, 1996 ve Weitzman, 1995). Tinea pedis görülme oranı erkeklerde daha yüksektir (Nelson ve ark., 2003 ve Perea ve ark., 2000). Tinea inguinalis, tropikal bölgelerde daha sık görülür. Tinea inguinalis görülmesini kolaylaştıran faktörler: şişmanlık, ıslak mayo,

dar giysilerdir. *Tinea barbae* ise kırsal bölgelerde hayvan yetiştiren erkeklerde sık rastlanılır (Solgun, 2007).

Dermatofitlerin yayılmasında ekolojik özelliklerinin de önemi vardır. Antropofilik dermatofitler genellikle tüm dünyada yayılım gösterirken, jeofilik ve zoofilik türler belli coğrafyalarda genellikle sporadik infeksiyonlar meydana getirirler. Antropofilik dermatofitler, insandan insana direkt ya da indirekt yollarla bulaşabilir. Jeofilik türlerde konidyum yapımı fazla iken zoofilik ve antropofilik türlerde ise konidyum yapımı az görülmektedir. Ayrıca zoofilik ve jeofilik dermatofitler güçlü inflamatuvar yanıt gösteren lezyonlar meydana getirirler. Buna karşın, antropofilik türler daha az şiddette inflamatuvar yanıt gösteren lezyonlar oluştururlar (Solgun, 2007).

Dermatofitler çevre koşullarına karşı çok dirençlidirler. 12 aydan daha uzun süre canlı kalabilir (Songer ve Post, 2004). Ancak özellikle kreosol, iyot ve klor içeren dezenfektanlara karşı duyarlıdır (McVey ve ark, 2013 ve Selvi, 2020).

1.6. Dermatofitlerin Patogenezi

Dermatofitler, keratinize dokularda infeksiyon oluştururlar. İnfeksiyonun meydana gelişinde konağa ait faktörler, mikotik ve çevresel faktörler önemli rol oynar (Arda, 2015). İnfeksiyonun ilerlemesi, mantarın metabolik ürünlerinin konakta oluşturduğu reaksiyona, lezyonun anatomik yerleşimine, infeksiyon meydana getiren suşun virülansına ve çevresel etkenlere bağlı olarak değişir (Weitzman, 1995).

Dermatofitlerin infeksiyon süreci, sırasıyla “artrokonidyumların keratinositlere bağlanması”, “penetrasyon” ve “konak yanıtı” ile meydana gelir (Fetil ve Güneş, 1999; Gözübüyük, 2013). Uygun koşullar altında, mantarın konağa temasından 1 saat sonra, mantar hücre duvarında bulunan adezinlerin vasıtasıyla epidermal adezyon meydana gelir (Jartarkar ve ark., 2022). *İn-vitro* temastan 2 saat sonra artrokonidyumların fibriller yapılarıyla keratinositlere yapışması tamamlanır. Bunu,

keratini sindiren ve aynı zamanda güçlü bir immünojenik uyaran olarak da işlev gören proteazlar, serin subtilisin ve fungalizinin vasıtasıyla meydana gelen penetrasyon izler (Jartarkar ve ark., 2022).

Daha sonra mantar çoğalarak canlılığı bulunmayan keratinize deri, tırnak ve saça tutunur. Mantarların canlı epidermis tabakasına tutunamamalarının sebebi serumun mantarları durdurucu etkisindendir. Serumda bulunan doymamış transferrin dermatofitlere karşı korunmada önemli rol oynar. Büyüyen hifalar altında, invazyon sırasında mantar tarafından salgılanan keratinaz ve diğer proteolitik enzimler keratinositleri sindirmeye başlar. Hifanın uzaması ve çoğalmasıyla meydana gelen mekanik etkiler, travma ve maserasyon mantarın penetrasyonunu kolaylaştıran diğer faktörlerdir (Matrinez-Rossi ve ark., 2017 ve Solgun, 2007).

Dermatofitlerin patojeniteleri, enzim meydana getirme kabiliyetleriyle yakın ilişkilidir. Dermatofitler, keratinaz, proteinaz, elastaz, peptidaz, kollajenaz, deoksirbonükleaz, lipaz gibi enzimleri sentezler. Bu enzimler vasıtasıyla konak yapılarını yıkıma uğratar ve bunlardan besin kaynağı olarak faydalanırlar. Bu enzimler arasında keratinaz mantarın konak dokusuna invazyonunda en önemli virülans faktörüdür. Dermatofitlerden salgılanan proteazlar ise büyük gen ailelerinin üyeleridir. Bunlar mantara besin sağlamasında, konak dokuya invazyonda, konak savunma mekanizmalarının kontrol edilmesinde görev alırlar. Elastaz enzimi infeksiyonun daha inflamatuvar olmasına sebep olurken lipaz enzimi konak dokuya yayılmada yardımcıdır (Al-Janabi ve Al-Khikani, 2020 ve Tunçoğlu, 2009).

Mantar hücre duvarında bulunan mannan da majör virülans faktörlerinden biridir. Mononükleer hücrelerle *in-vitro* inkübasyona bırakıldığında lenfoblast yapımını inhibe ettiği, mitojenlere ve diğer antijenik uyarıcılara karşı lenfosit proliferasyonunu baskıladığı bulunmuştur (Weitzman, 1995). Mannan antijeni keratinosit büyümesini baskılayarak epidermal yenilenmeyi yavaşlatır ve kronik infeksiyonlar için ortam yaratır (Erbakan, 1989 ve Fetil ve Güneş, 1999).

Dermatofitlerin patogeneğinde konağın immün cevabında önemli rolü vardır. Konağın immün cevabı mantar enfeksiyonun stratum korneum tabakasıyla sınırlı kalmasına neden olur (Solgun, 2007; Wagner ve Sohnle, 1995). Epidermal yenilenme hızı, mantarın büyüme hızını, lezyonun genişliğini ve enfeksiyonun süresini etkilemektedir. Enfeksiyonun erken dönemlerinde yenilenme hızı artar. Bu artış mantarın deriden atılmasına sebep olur. Mantarın enfeksiyonu gerçekleştirebilmesi için büyüme hızı, epidermal yenilenme hızına eşit veya bundan fazla olmalıdır (Gözüböyük, 2013). Çeşitli mantar enzimleri ve proteinleri keratin degradasyonuna katılır. PacC ve Hfs1 gibi transkripsiyon faktörleri ve ayrıca ısı şoku proteinleri, mantar-konak etkileşiminin erken aşamalarında derinin asidik pH'ının algılanmasında ve buna adapte edilmesinde rol oynar. Dermatofit büyümesi sırasında, hücre dışı pH asidikten alkaline kayar. Bu, bilinen keratinolitik proteazların çoğunun optimal aktivite sergilediği bir ortam yaratır (Matrinez-Rossi ve ark., 2017). Doymamış transferin demir bağlama kapasitesinden ayrı olarak, hifaları bağlayarak mantarın büyümesini durdurur. Yağ bezlerinden salgılanan yağ asitleri de inhibitör etki gösterir (Fetil ve Güneş, 1999; Gözüböyük, 2013 ve Kuştımur, 2004). Dermatofitlere karşı konak savunmasında makrofaj, nötrofil, lenfosit ve mast hücreleri de önemli görev alırlar. Dermatofitlerde glikopeptitler ve keratinazlar olmak üzere 2 önemli antijen sınıfı bulunmaktadır. Glikopeptitlerin protein bölümü hücresel immün yanıtı, polisakkarit bölümü ise humoral immüniteyi uyarır. Humoral bağışıklık etkisizdir. Bunun sebebi enfeksiyon yerinin vasküler sistemden uzak olmasıyla açıklanmaktadır. Dermatofit enfeksiyonlarının eradikasyonunda başlıca rolü hücresel immünite oynar (Tunçoğlu, 2009).

Antropofilik olarak değerlendirilen dermatofit türleri kronik tedavisi zor ve nispeten de inflamatuvar olmayan enfeksiyonlar oluşturmaya eğilimli iken zoofilik ve jeofilik dermatofitler güçlü bir konak yanıtı oluşturma eğilimindedirler. Bu türler oldukça inflamatuvar seyreden ve tedaviye iyi yanıt veren lezyonlar oluştururlar. Bazı durumlarda bu enfeksiyon kendiliğinden iyileşebilir (Murray, 2015).

Farklı tür ve farklı suşlar enfeksiyonun seyri üzerine etki ederler. *T. mentagrophytes* kompleksinin pürüklü alt türünün etken olduğu enfeksiyonda

inflamasyona rastlanırken, *T. mentagrophytes* var. *interdigitale* kronik enfeksiyona neden olur. *T. rubrum* enfeksiyonları ise genellikle kronik olarak seyreder. Bu enfeksiyonların inflamatuvar olmayan kabuklu lezyonlarında çok az dermal infiltratlı hiperkeratoz görülür. Diğer taraftan *T. verrucosum*'un oluşturduğu keriyonda; lenfositlerin, plazma hücrelerinin, nötrofillerin ve eozinofillerin yoğun dermal infiltrasyonu tipiktir (Bıyık, 2008).

Trikofitin reaksiyonu, enfeksiyon sırasında meydana gelebilen ve derideki aşırı duyarlılığı tanımlayıcı bir terimdir (Bıyık, 2008). Trikofitin deri testi, aktif veya geçirilmiş dermatofitozu gösterir (Ustaçelebi, 1999). Sağlıklı kişilerde başka enfeksiyon etkelerinden kaynaklanan çapraz reaksiyonlardan veya daha önce temas edilen bir dermatofitten dolayı aşırı duyarlılık reaksiyonu gözlenebilir (Padhye ve Summerbell, 2005). Dermatofitlere karşı deride aşırı duyarlılık reaksiyonu görülebilir. Buna id reaksiyonu denir (Saniç, 1999 ve Tunçoğlu, 2009).

Dermatofit enfeksiyonlarının yayılmasını ve ilerlemesini etkileyen diğer etmenler; cinsiyet, yaş, genetik faktörler, ırk, endokrin ve metabolik faktörler, sıcaklık, mikro çevre ve yarışmacı organizmalar olarak sınıflandırılabilir (Gözüböyük, 2013 ve Kuştımur, 2004).

1.7. Dermatofitlerin Hayvan ve İnsanlarda Klinik Teşhisi

Hayvanlarda dermatofitlerin neden olduğu klinik bulgular, enfeksiyona sebep olan suşa, türlerin virülansına, çevresel faktörlere ve konakçı bağışıklığına göre değişkenlik gösterir. Genelde *Trichophyton* türleri, *Microsporum* türlerinden daha şiddetli klinik belirtiler oluştururlar. Konakçı yanıtı, türe ve kıl örtüsü tipine bağlı olarak değişkenlik gösterebilir *M. canis*'in sebep olduğu dermatofitozlar, köpeklerde kedilerden daha şiddetli seyrederler. Kedilerde görülen lezyonlarda, ağrı ve kaşıntı şikayeti bulunmaz. Lezyonlar düzensizdir, kıllar dökülmüş ve çeşitli şekillerde kepeklenen bölgeler bulunur. Kepeklenen bölgede deri yüzeyi sigara külü görünümündedir. Kedilerde dermatofitozların görüldüğü bölgeler; baş, kulaklar ve

vücudun distal bölgeleridir. Köpeklerde *Microsporum*'ların oluşturduğu enfeksiyonlar, kedilerdeki enfeksiyona benzer görünümündedir. Lezyonların eritomatoz kenarları bulunabilir. *M. canis* dışındaki dermatofitlerin oluşturduğu lezyonlar, çoğunlukla şiddetlidir. *M. persicolor* önemli yüz lezyonlarına sebep olur (Derincegöz, 2016 ve Thomsett, 1986).

Dermatofitoz vakalarındaki lezyonlar, her hayvan türü için değişkendir. En yaygın klinik semptomlar kıl dökülmesi, deride kabuklanma, eritem ve kaşıntıdır. Yapılan çalışmalar, köpeklerde dermatofit enfeksiyonunun yüz, bacak ve/veya kuyrukta lokalize lezyonlara neden olduğunu göstermiştir. Enfekte olmuş köpeklerin klinik olarak derilerinde multifokal alopesi, eritem, papül, püstül, pul ve kabuk gibi belirgin bir oluşum ile ringworm olarak bilinen lezyonlar bulunmaktadır. *M. canis* enfeksiyonuyla, enfekte bölgede alopesi (1-3 mm) ile sonuçlanır ve özellikle inflamatuvar reaksiyon uzun sürerse kalıcı alopesi meydana gelir. Dermatofitlerin neden olduğu lezyonlar, enfekte eden dermatofit türleri, virülans faktörleri, enfeksiyon alanı, ikincil enfeksiyonlar ve çevresel koşullar dahil olmak üzere çeşitli faktörlere bağlı olarak hafif ila şiddetli olabilir. Tavşanlarda mantar enfeksiyonunun neden olduğu makroskopik lezyonlar arasında yüz, göz kapakları, kulaklar, tırnaklar, bacaklar ve sırt bölgesinde sarımsı beyaz kuru kabuk oluşumu, alopesi ve eritem bulunmaktadır. Dermatofitlerle enfekte Bali sığırlarının (*Bos javanicus*) derisinde hiperkeratoz, pullar ve kabuk ile birlikte yuvarlak şekilli, beyaz, gri veya siyahımsı kahverengi lezyonlar (hiperpigmentasyon) bulunur (Paryuni ve ark., 2020). Atlarda, göğsün üst kısmında, yanlarda, omuzlarda, travmaya maruz kalan vücut bölgelerinde ve eyer, dizgin ve koşum takımı ile temasta bulunan yerleri dermatofitlere karşı hassastır. *T. equinum*, *M. canis* ve *T. mentagrophytes* atları enfekte eden en yaygın mantarlardır, ancak bazen *M. gypseum* enfeksiyonları da gözlenir. *T. equinum* ve *M. canis*'in neden olduğu dermatofitoz, özellikle genç hayvanlarda, kısa süre sonra dökülen, ince, pul pul, grimsi pullarla kaplı, altta kuru bir integument bulunan alopesik bir alan bırakan küçük dikenli saç kümeleri ile karakterizedir. *T. verrucosum*'un neden olduğu sığır dermatofitozunda lezyonlar baş, üst göğüs, sağrı, gergedan, intermaksiller boşluk ve göz çevresinde lokalizedir. Lezyonlar çoktur, ancak nadiren tüm vücudu kaplar veya birleşir (Moretti ve ark., 2013).

Dermatofit enfeksiyonunun klinik semptomlarının, enfekte olan dermatofit türüne, vücudun enfekte bölgesine ve konakçının türüne bağlı olarak değiştiği sonucuna varılabilir. Genel olarak dermatofit enfeksiyonları lezyon oluşumunda deride alopesi, kabuk, papül, püstül ve eritem görülür ve genellikle ringworm olarak bilinen yuvarlak şekildedir (Paryuni ve ark., 2020).

Dermatofitozlar, insanlarda dermatofit türü, inokulum büyüklüğü ve konağın bağışık durumu gibi çeşitli faktörlerden etkilenebilen ve oldukça geniş bir aralıkta kendini gösteren klinik bulgularla ortaya çıkabilir (Murray, 2015). İnsanlarda dermatofitlerin sebep olduğu klinik görünüm, etkilenen anatomik bölgeye “tinea” kelimesinin ilave edilmesiyle isimlendirilir (Solgun, 2007). Tinea capitis, baş saçlı derisi ve saçları tutan dermatofit enfeksiyonudur. Ergenlik öncesi dönemde görülürken erişkin dönemde nadir rastlanır. Etkenler arasında sıklıkla *M. canis*, *T. tonsurans*, *T. violaceum* ve *T. verrucosum* tanımlanmaktadır. Enfeksiyon, hijyen koşullarının kötü olmasıyla bulaşır (Ely ve ark., 2014; Gözübüyük, 2013 ve Larone, 2002). Tinea barbae, yetişkin erkeklerde sakal ve bıyık bölgesinde görülen dermatofitozudur. Genellikle zoofilik dermatofitler etkendir. En sık *T. verrucosum* izole edilir. Çiftlik işçileri arasında sık görülür (Hainer, 2003 ve Tunçoğlu, 2009). Tinea facialis, yüzün sakalsız bölgesinin dermatofitozudur. Güneş ışığının yüze temasından sonra artan kaşınma ve yanma tipik belirtileridir. Lezyonları; bazen renksiz bazen de kırmızı, dairesel ve yama görünümündedir (Bıyık, 2008). Daha çok zoofilik dermatofitler etkendir. Dünyada en çok *Microsporum canis*’le bağlantılı olarak gelişir (Tüzün, 2008). Evcil hayvanlardan bulaş olmasına sık rastlanılır. Otokülasyonla da bulaş olabilmektedir (Baykal, 2004 ve Degreef, 2008). Tinea corporis kollarda, bacaklarda, yüzün sakalsız bölgelerinde ve gövde derisinde görülen dermatofit enfeksiyonudur. En sık olarak *T. rubrum* izole edilir. Alın, yanak, boyun, el sırtı gibi açık bölgeleri tutar. Tinea corporis en sık çocuklarda ve genç erişkinlerde görülür (Kovitwanichkanont ve Chong, 2019). Pet hayvanlarından, topraktan ve vücutta bulunan başka bir dermatofit kaynağından otinokülasyon yoluyla bulaşabilir (Weitzman, 1995). Tinea pedis, ayakta gelişen, Atlet ayağı olarak da bilinen dermatofit enfeksiyonudur. Tinea pedis en yaygın görülen dermatofit enfeksiyonudur (Gül, 2014). Maraton koşucuları, askerler ve madencilerde sık

görülür (Ely ve ark., 2014; İlkit, 2015 ve Pires ve ark., 2013). Tinea unguium, tırnaktaki dermatofit enfeksiyonlarıdır. Yetişkin erkeklerde daha sık görülür. Ayak tırnaklarında el tırnaklarına kıyasla daha fazla görülür. En çok görülen etkenler arasında *T. rubrum* ve *T. mentagrophytes* gelmektedir (Asz-Sigall, 2016; Degreaf, 2008; Ely ve ark., 2014 ve Kovitwanichkanont ve Chong, 2019).

1.8. Dermatofitlerin Laboratuvar Teşhisi

1.8.1. Klinik Örnek Alma

Dermatofitoz tanısında ilk ve en önemli adım, uygun nitelik ve nicelikte klinik örneğin alınmasıdır. Lezyon, klinik alınmadan önce %70'lik etil alkol ile silinmelidir. Alkol lezyonda bulunabilecek flora üyesi diğer organizmaları veya önceden uygulanmış krem veya pudrayı uzaklaştırır, etken mantarın kolayca belirlenmesini sağlar. Ayrıca etkenin mantar kültüründe saf halde üremesine yardım eder. Bu amaç için steril bistüri, lanset, mikroskop lamı, saç veya diş fırçasının kullanımı uygundur. Klinik örnekler, saçlı deride: lezyon alanındaki rengini kaybeden veya kırılmış saçlar steril bir cımbız ile çıkartılır. Yüzey epiteli steril bistüri ile kazınarak, saçsız deride: lezyonun aktif kenar bölgesinden steril bistüri ile kazınarak ve varsa vezikül tepeleri kesilerek, tırnakta: infekte bölgenin beyaz renkli dejenere kısmının derince kazınması ile elde edilir.

Hayvanlarda örnek olarak kıl, tüy, deri ve tırnak kazıntısı alınır. Hayvanlardan tüy örneği alınırken MacKenzi diş fırçası tekniği de kullanılabilir. Bu teknikte steril diş fırçası tüylere sürülür. Burun üstü, alın, kulak boyun, gövde, bacak ve kuyruk nazikçe fırçalanır. Çok miktarda örnek alınması gereken vakalarda veya tutulması zor olan hayvanlar için bu yöntem kullanılabilir. Önce etkilenmemiş bölge sonra lezyonlu bölge fırçalanmalıdır. Fırçalama süresi 3 ila 7 dakika olmalıdır (Di Matti ve ark., 2018; Moriello, 1990; Pihet ve Le Govic, 2017 ve Selvi, 2020).

Lezyonun birçok bölgesinden örnek alınmalıdır. Örnek miktarı mümkün olduğunca fazla olmalıdır. Klinik örnek steril bir petriye veya laboratuvarda steril kâğıt içerisine alınabilir. Hastaya ilişkin bilgilerle etiketlenir ve laboratuvara ulaştırılır (İlkit, 2021; Tümbay, 1983 ve Weitzman, 1995).

1.8.2. Wood Lambası

İlk kez 1903 yılında Baltimore Robert tarafından bulunan Wood ışığı uzun dalga boyuna sahip ultraviyole bir ışıktır. Kuşkulu olgularda kıllar, karanlık odada dalga boyu 365nm olan Wood ışığı altında incelenir. Düşük duyarlılıkta bir yöntem olmasına karşın ön tanıya yardım eden bir tekniktir. Klinik örnek almadan önce lezyonlar wood ışığı ile incelenmeli ve klinik örnekler floresans veren bölgeden alınmalıdır. Floresans varlığı infeksiyonun kanıtıdır. *M. canis*, suşlarının yaklaşık %60'ı ürettiği zaman triptofan metabolitleri meydana getirir. Bu metabolitler karanlıkta ultraviyole ışığı altında parıldama verir. *M. canis*, *M. audouinii*, *M. ferrugineum* gibi türlerin oluşturduğu infeksiyon parlak yeşil renkte, *T. schoenleinii*'nin oluşturduğu infeksiyon ise buz mavisi renkte floresans verir. Diğer türler ise floresans vermez. Wood lambası doğru materyalleri almada yararlıdır Wood ışığı ile inceleme, özellikle Tinea capitis'in tanısında yararlanılan bir yöntem olup daha çok kıl dışı infeksiyonda tanıya yardımcıdır (Asawanonda, 1999; İlkit, 2021; Noble ve ark., 1998; Melihoğlu, 2019 ve Moriello, 2001).

1.8.3. Direkt Mikroskopik İnceleme

Dermatofitozların laboratuvar tanısında çabuk, ucuz ve etkili yöntemlerden birisidir. Kültür sonucunun uzun sürmesi nedeniyle direkt mikroskopik inceleme büyük önem taşımaktadır. Klinik örneklerde dokunun eritilmesi ve keratinize örnekte mantar elemanlarının açığa çıkması için %10-15'lik potasyum hidroksit (KOH) ile incelemesi uygundur. Lam üzerine konulan klinik örneğe bir damla bu çözeltilerden birisi eklenerek preparat hazırlanır. Preparat alevden birkaç kez geçirilerek hafifçe

ısıtılır. Preparatın olgunlaşmasını sağlamak için 15-20 dakika beklenir. Bu basamak klinik örneğin içerdiği protein artıklarını eriterek mantar elemanlarının ortaya çıkmasına yardım eder. Daha sonra preparat önce x10, sonra x40 objektifle incelenir. Bu preparasyonlarda laktofenol pamuk mavisi de kullanılabilir. Dermatofitler: epitel hücreleri arasında veya üzerinde duvarları paralel ve bölmeli hifalar, artrospor veya sporlar olarak görülür. İyi hazırlanmış preparatlarda çeşitli organelleri ve yağ damlalarını da görmek mümkün olur. Ayrıca, KOH'in bu özelliğinden yararlanılarak farklı yöntemler de geliştirilmiştir. Bunlar:

- (i) %10 KOH + Parker'in mavi-siyah mürekkebi,
- (ii) %10-25 KOH + %5-10 gliserin (preparatın kurumasını önler, özellikle tırnak örneklerinde),
- (iii) %20 KOH + %36 dimetil sülfoksitkalkoflor (ısıtma gereksiz),
- (iv) KOH + Kongo kırmızısı veya metilen mavisi ve
- (v) KOH +kalkaflor beyazı

Kalkoflor beyazı mantar hücresi duvarında bulunan kitindeki β -1,3 ve β -1,4 polisakkarit yapılara özgül olarak bağlanır ve floresans verir. Kalkoflor beyazı ile direkt mikroskopi, dermatofitlerin tespitinde hassas ve spesifiktir. Ancak floresans mikroskobu gerekliliği bir dezavantajdır (İlkit, 2021; Khalid, 2019; Pihet ve Le Govic, 2017 ve Selvi, 2020).

1.8.4. Kültür ve İdentifikasyon

Dermatofitlerin cins ve türü kültür yöntemiyle belirlenebilir. Direkt mikroskopik inceleme sonucu mantar hifaları görülse de görülme de klinik örnekler mutlaka kültür işlemine alınmalıdır. Kültür, uygun besiyerlerine öze yardımıyla örneklerin yerleştirilmesidir. Kültürde, örnekler, besiyerlerine yüzeyi geniş olacak şekilde ve bol miktarda ekilmelidir. Ekim için hangi besiyeri kullanılacak olursa olsun örnekler çift ekilmelidir. Ekimlerin biri oda sıcaklığı olan 26°C'de, diğeri 37°C'de 1-4 hafta bekletilmelidir. Bazı dermatofit türleri 37°C'de

daha iyi ürerler. *T. verrucosum* 37°C’de oda sıcaklığına göre daha iyi ürer. Mantar etkenlerinin elde edilmesi için kullanılan en yaygın besiyeri Sabouraud Dekstroz Agar (SDA)’dır. SDA’ya bakterilerin üremesini baskılamak için antibiyotik olarak kloramfenikol ve gentamisin, saprofitik mantarların üremesini önlemek için sikloheksimit ilave edilir. Sikloheksimit çok yavaş üreyen dermatofitleri baskılayabildiği için sikloheksimitsiz besiyerine de ekim yapmak gerekir.

Dermatofit izolasyonunda SDA’ya alternatif besiyerleri de kullanılır. Patates Dekstroz Agar (PDA) bazı dermatofitlerin konidyal gelişimini ve pigment oluşmasını artırır. Bu da identifikasyonda kolaylık sağlar. Diğer bir besiyeri Dermatofit Test Medium (DTM)’dur. Bu besiyerinde klortetrasiklin, gentamisin, sikloheksimit ve pH indikatörü fenol kırmızısı bulunur.

Dermatofitlerin bu besiyerlerinde üremeleri sonucu besiyeri rengi kehribar sarısından kırmızıya döner. DTM’nin içinde bulunan antibakteriyel ve antifungallerin inhibe edemediği birçok bakteri ve mantar türünün bulunması ve kolonin tabanında meydana gelen pigmentasyonun renk değişikliğinden dolayı görülememesi bu besiyerinin dezvanatajıdır. Bu besiyerinde yaşanan sorunları çözmek için Dermatofit İdentifikasyon Medium (DIM) geliştirilmiştir. DIM’un duyarlılığının %99, özgüllüğünün ise %95,7 olduğu bildirilmiştir (Aboul-Ella ve ark., 2020 ve Salkin ve ark, 1997;).

Lucille K. Gearg ve Margarita Silvo-Hutner, *Trichophyton* türlerini besin (vitamin ve amino-asit) gereksinimlerine göre identifiye edebilen Trichophyton agar 1-7’yi geliştirmişlerdir. Bu gereksinimi test etmek için temel besiyeri olarak kazeinli agar (No. 1) kullanılır. Bu besiyerine inozitol, inozitol-tiyamin, tiyamin ve nikotinik asit gibi vitaminler (No. 2, 3, 4 ve 5) eklenmiş besiyerleri kullanılır. Amino-asit gereksinimini göstermek için kullanılan temel besiyeri amonyum nitratlı agardır (No. 6). Buna da histidin (No. 7) eklenir, kontrol olarak katkı maddesi konulmayan besiyerleri (No. 1 ve 6) kullanılır (İlkit, 2021).

Dermatofitlerin identifikasyonunda morfolojik özelliklerinin değerlendirilmesinin yanısıra kıl delme ve üre hidrolizi gibi fizyolojik testler de yapılır (Solgun, 2007). Bunun yanında pirinç besiyerinde üreme, arpa tanelerinin üzerinde üreme, tuz toleransı, sorbitol asimilasyonu ve bromkresol purple milk solid agarda üreme, ısı toleransı, fermentasyon testleri gibi çeşitli fizyolojik ve biyokimyasal testlerde yapılabilir (Ateş, 2007).

Tür düzeyinde tanı hemen daima dermatofitin koloni ve mikroskopik özelliklerine göre konur. Koloni, yüzey ve taban rengi, pigment bulunması, yüzey topografisi, kıvrım özellikleri ve inkübasyon süresi yönünden değerlendirilir. Mikroskopik özellikleri ise, kültürden hazırlanan preparatların laktofenol pamuk mavisi ile boyanarak mikroskopta incelenmesi ile belirlenir. Makroskopik ve mikroskopik özellikleri belirlenen dermatofitler, mantar atlaslarından yararlanılarak tanımlanır (Brash, 2014; İlkit, 2021 ve Larone, 2011).

1.8.5. Moleküler Yöntemler

Moleküler yöntemlerin, dermatofitlerin klinik örneklerden direkt olarak saptanmasında ve kültürde üreyen suşların identifikasyonunda geleneksel yöntemlere göre daha hızlı ve daha doğru sonuç verdiği belirtilmektedir (Tiryaki ve ark., 2015). Moleküler yöntemler dermatofitlerdeki genetik farklılıkların belirlenmesi temeline dayanmaktadır. Bu yöntemler fenotipik özellikleri belirleyen yöntemlere göre daha duyarlı ve kesindir. Çünkü genotipik özellikler genellikle sabit olup, dış ortam şartlarından daha az etkilenirler. Son zamanlarda nükleik asit amplifikasyon teknolojisinin gelişmesi dermatofitlerin mikolojik yönden identifikasyonunun hızlanmasını, güvenilir ve net sonuçlar alınmasını sağlamıştır (Bıyık ve ark., 2013). Moleküler yöntemler, yalnız klinik örneklerden mantarları identifiye etmek için değil tür tayini, epidemiyolojik tiplendirme, ilaç direnci ve salgınları izlemek için de kullanılmaktadır (Kuştimur ve ark., 2001).

Dermatofitlerin tanımlanmasında da en yaygın kullanılan DNA bölgeleri; ribozomal DNA (rDNA) üzerinde ribozomal RNA'nın (rRNA) küçük alt ünitesini (18S), büyük alt ünitesini (28S) ve 5,8S rRNA'yı kodlayan gen bölgeleri, 18S rDNA ile 5,8S rDNA arasında kalan ITS1 (Internal transcribed spacer) bölgesi ve 5,8S rDNA ile 28S rDNA arasında kalan ITS2 bölgeleridir. ITS1 ve ITS2 bölgeleri ve aralarında kalan 5,8S rDNA bölgesi mantar DNA'sının aşırı değişken bölgeleri iken, 18S ve 28S rDNA bölgeleri korunmuş bölgelerdir (Tiryaki, 2011).

Günümüzde mitokondriyal DNA (mtDNA), 18S ve 28S ribozomal RNA'yı (rRNA) kodlayan gen bölgeleri, ITS1, ITS2 ve non-transcribed spacer (NTS) bölgelerinin kesilmiş bant uzunluğu farklılığı (RFLP); rastgele başlatıcılı PCR (AP-PCR, RAPD ya da DNA fingerprinting); çoğaltılan parça uzunluğu farklılığı (AFLP); yuvalanmış PCR (nested PCR); çoklu PCR (multiplex PCR); LightCycler PCR; Hibridizasyon gibi birçok moleküler yöntem dermatofitlerin tanımlanmasında kullanılmaktadır (Bıyık ve ark., 2013).

Dermatofitlerin tür düzeyinde tanısında en sık kullanılan referans yöntem ITS bölgesinin dizi analizidir. Bir dönem "altın standart" olarak kabul edilen bu yöntemin gerçekçi tanı için yeterli olmadığı, B-tubulin, kalmodulin ve EF1-a bölgelerinin de dizi analizinin yapılması ile birlikte daha gerçekçi sonuçlar alındığı bildirilmiştir (İlkit, 2021).

1.8.6. MALDI-TOF MS

Matriks Aracılı Lazer Desorpsiyon İyonizasyon Uçuş Zamanı Kütle Spektrometrisi (MALDI-TOF MS) mikroorganizma tanımlanmasında kullanılan hızlı, güvenilir, düşük maliyetli yeni bir yöntemdir. MALDI-TOF MS doğru sonuç veren, kullanımı basit ve normal laboratuvar iş akışına dahil edilmesi kolay bir spektrum oluşturma ve değerlendirme tekniğidir. Laboratuvar tanısında evrimsel bir adım olarak kabul edilir. Aynı zamanda moleküler tekniklerin yüksek maliyeti, uygulama ve sonuçların analizi sırasında ihtiyaç duyulan deneyim ile geleneksel

yöntemlerin uzun zaman alımı ve düşük özgülük gibi dezavantajlarını ortadan kaldırır. Bakteri, maya gibi birçok mikroorganizmanın tanımlanmasında kullanılan bu teknik son yıllarda çeşitli araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalar sonucunda referans spektrum kütüphanelerinin oluşturulması ve rutin laboratuvar koşullarına adapte edilmesiyle dermatofit identifikasyonunda da başarı sağlamıştır (Aboul-Ella ve ark., 2020).

Bu yöntemde mikroorganizmalara ait biyomoleküllerin (protein, peptid, şeker) ve büyük organik moleküllerin (polimer, makromolekül) iyonize edildikten sonra elektrik alandan geçirilerek protein profilleri çıkarılır. Bu profil spektralarına ait grafiksel görüntülerin sistemin veri tabanındaki referans organizmaya uyumuna göre mikroorganizmalar identifiye edilir (Yılmaz ve ark., 2014).

Kütle spektrometrisi kullanılarak mikroorganizmaları tanımlamaya yönelik ilk girişimler 1975 yılında bakterilerin tanımlanmasıyla başlamıştır (Anhalt ve Fenselau, 1975). Bununla birlikte bozulmamış proteinleri analiz etmek mümkün olmamıştır. Sağlam makromoleküllerin analizi için teknoloji 1980'lerde parçalanmamış protein analizine izin verecek şekilde geliştirilmiştir. Tanaka ve ark. (1985)'de biyolojik makromoleküllerin kütle spektrometrik analizini sağlayan ultra ince metal tozu ve giserol kullanan bir yumuşak desorpsiyon iyonizasyonu yöntemini geliştirmişlerdir. Bu buluş onlara daha sonra kimya Nobel ödülünü kazandırmıştır (Frangsmyr ve Tanaka, 2003). Aynı zamanlarda Hillenkamp ve Karas (1988), organik bir matriks kullanarak yumuşak desorpsiyon iyonizasyonunu bildirmişlerdir. Matriks ve ultraviyole ışını kullanarak alanin amino asitini iyonize etmişler ve bununla bilim dünyasına matriks aracılı lazer desorpsiyon iyonizasyon (MALDI) kavramını kazandırmışlardır. Cain ve ark. (1994)'de kütle spektrometri yöntemi olarak uçuş zamanını kullanmışlardır. Bu çalışmayla ilk kez MALDI-TOF MS ile ilk kez bakterilerin tanınması gerçekleştirilmiştir (Ölmez, 2020).

MALDI-TOF MS'in hızlı ve düşük maliyetli tanımlama yapabilmesi nedeniyle geleneksel ve moleküler tanımlama yöntemlerine göre öne çıkmasına sebep olmuştur. MALDI-TOF MS, tıp alanında sadece mikroorganizmaların

identifikasyonunda değil spesifik biyokimyasal belirteçlerin tanımlanması yoluyla tümörlerin, romatoid artrit, Alzheimer hastalığının ve alerjilerin teşhisine de katkıda bulunmuştur (Marvin ve ark., 2003).

MALDI-TOF MS cihazı üç kısımdan meydana gelmektedir. Bunlar;

1. İyonizasyon kaynağı: MALDI soft iyonizasyon kaynağıdır.

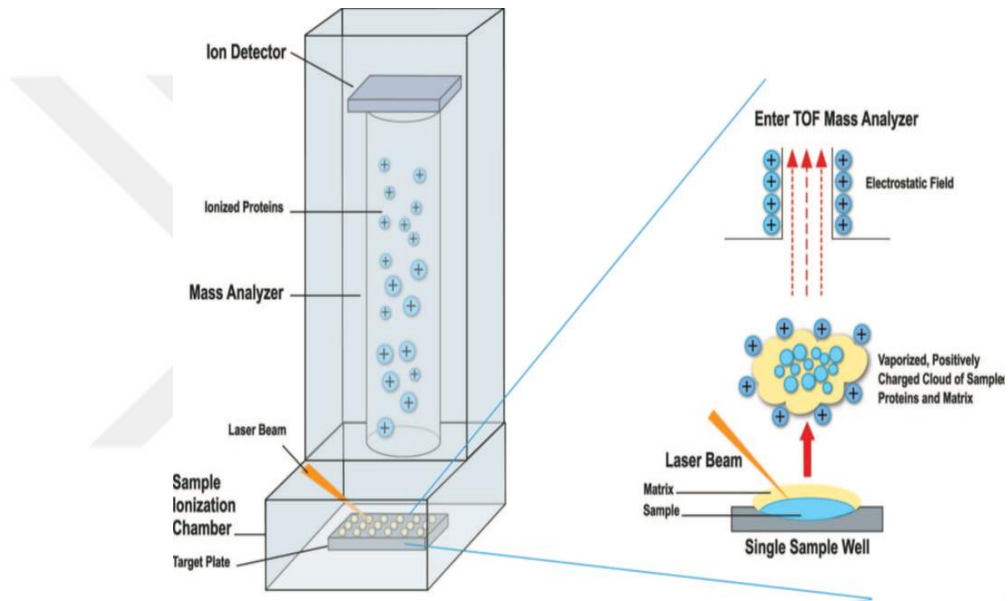
2. Kütle analizörü: Lazer desorbsiyon sistemleri çeşitli kütle analizörleri ile kombine edilebilir. MALDI ile birlikte genellikle kütle spektrometresi olarak TOF (time of flight) kullanılır.

3. Algılama bölümü: İyonların kütlelerinin yüküne (m/z) oranının kareköküne bağlı olarak bir analiz yapılmakta, biyomoleküler yoğunluklarına ve bu orana göre sınıflanmaktadır.

Ticari olarak 4 farklı MALDI-TOF MS sistemi bulunmaktadır. Bunlar; Bruker Biotyper (Bruker-Daltonik, ABD), Axima/Saramis (Shimadzu, Japonya), Vitek Ms (Biomerieux, Fransa) ve Andromas (Andromas SAS, Fransa) sistemleridir (Ölmez, 2020).

MALDI-TOF MS yönteminde çok az miktarda (10^4 ila 10^6) hazırlanan mikrobiyal biyokütle bile etkeni tanımlamak için yeterlidir. MALDI-TOF MS yönteminde öncelikle numune MALDI plate'nin üzerindeki kuyucuğa konur. MALDI plate'i numune (kan, idrar, Bos gibi vücut sıvıları veya bunların kültürleri yapıldıktan sonra elde edilen bakteri veya mantar kolonileri) ve matriksin karıştırıldığı metal bir plakadır. Numunenin üzerine matriks eklenir ve karışım kurumaya kristalleşmeye bırakılır. Matriks enerji emici, vakumda iyonlar oluşturmak için kolayca buharlaşabilen, düşük buhar basıncına sahip, lazer ışını tutup ortamın ısınmasını, moleküllerin buharlaşmasını sağlayan, organik, aromatik, zayıf asidik bir kimyasaldır. Matriks ayrıca numune moleküllerinin, lazer ışınlarıyla doğrudan

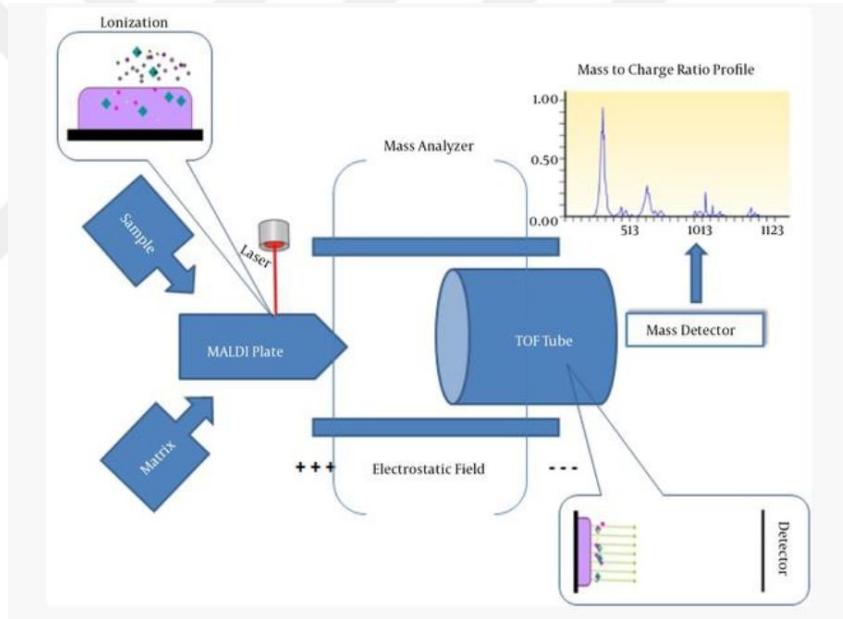
odaklanması yoluyla yok edilmesini önler ve iyonlaşmayı kolaylaştırır. MALDI-TOF MS yönteminde kullanılan matriksler 4- hidroksi α - siyanocinnamik asit (4HCCA), 2, 5 dihidroksibenzoik asit (DHB), 3,5- dimethoxy-4- hidroksicinnamik asit (sinapinik asit) ve ferrulik asittir (Çuhadar, 2019). Analiz sırasında oluşan piklerin kalitesi kullanılan matriksin türüne bağlı olarak değişmektedir. 2,5 dihidroksibenzoik asit ve α - siyano-4- hidroksisinnamik asit genellikle 10kDa'dan daha küçük, sinapinik asit ve ferrulik asit ise 15kDa'dan daha yüksek kütlelerin analizi için uygundur (Yılmaz, 2014).



Şekil 1.3. MALDI-TOF kütle spektrometrisi (Patel, 2015).

Matriks, lazer enerjisini emerek ısı enerjisine çevirir. Oluşan ısı analitteki moleküllerin proton (H^+) kazanarak veya kaybederek iyonize olmasına sebep olur. İyonizasyon işlemi neticesinde moleküller katı veya likit halden iyonize serbest gaz halindeki molekül şekline geçerler. Uçuş zamanlı kütle analizinde, meydana gelen iyonların cihaz içinde dedektöre varmak amacıyla belli bir yolda ilerlemeleri prensibi kullanılır. Bu amaçla moleküllerin 1 metre uzunluğundaki boru içerisindeki dedektöre hareketlerini hızlandırmak için 20 kV elektrik potansiyeli üreten elektrotlar ile voltaj uygulanır. Cihaz içinde oluşan vakumlama, hava molekülleri ile iyonların temasını önlemektedir. Bu sebeple iyonların hızı, kütle ve molekülün

yüküne bağlı olarak gösterilir. Bu sistemin uygulanmasında moleküller benzer şekilde yüklendiklerinden yük genellikle 1'dir (Posteraro ve ark., 2013 ve Yılmaz, 2020). İyonlar uçuş tüpünde hareket ederken, bir reflektör (iyon aynası) vasıtasıyla en arkada bulunan dedektöre yansıtılır. Küçük iyonlar daha hızlı hareket ederek büyük iyonlara göre dedektöre daha erken ulaşır. Dedektör iyonların uçuş süresini hesaplayarak (uçuş zamanı kütle spektrometrisi, TOF MS) analite ait bir kütle spektrumu meydana getirir. Oluşan spektrumlar her mikroorganizma türüne özgü olduğundan bu spektrumlara kütle parmak izi denir. Bu spektrumlar daha sonra cihazın veri tabanında bulunan mikroorganizmalara ait tüm spektrumlarla karşılaştırılarak identifikasyon tamamlanır (Clark ve ark.,2013; Ölmez, 2020 ve Singhal ve ark., 2015).



Şekil 1.4. MALDI-TOF MS yönteminin çalışma prensibi (Calderaro ve ark., 2014).

Spektrumları karşılaştıran yazılım, gözlemlenen ve saklanan veri setleri arasındaki benzerliklere dayalı olarak sayısal bir değer (skor değeri) üretir. Bu puan değeri, tanımlamanın geçerliliği hakkında bilgi verir. 2,0'ın üzerindeki bir puan değeri genellikle geçerli bir tür seviyesi tanımlaması olarak kabul edilir. 2,0 ile 1,7 arasındaki değerler, güvenilir cins seviyesi tanımlamalarını temsil eder. Ayrıca

yazılım, uygunluk kontrolleri için en iyi eşleşmenin yanında ek sonuçları da görüntüler. Mevcut algoritmalar, tüm hesaplama analizinin neredeyse gerçek zamanlı olarak gerçekleştirilmesine izin verir. Bu nedenle, yalnızca bir numune ölçülecekse, 5-7 dakika içinde işlenebilir ve tür düzeyinde bir tanımlama sağlar. 96 izolat içeren bir hedef plaka kullanılırsa, ilk örneğin plakaya yüklendiği zaman noktasından başlayarak yaklaşık 1 saat içinde sonuçlar alınabilir. MALDI-TOF MS'de analiz sürecinden sonra, kullanılmış MALDI plate'i makineden çıkarılır. Tek kullanımlık hedef plakalar normal laboratuvar atıklarına atılabilirken, yeniden kullanılabilir versiyonlar daha fazla kullanım için temizlenir. Tavsiye edilen temizleme prosedürlerinin çoğu, plakanın etanol ve TCA solüsyonları ile işlenmesiyle başlar ve mekanik temizleme adımlarını içerir (Wieser, 2012).

MALDI-TOF MS, 2 ila 20kDa arasındaki kütle ağırlığına sahip molekülleri tespit eder (Lollivier, 2017). MALDI-TOF MS ile yapılan tanımlamada her mikroorganizma için farklı bir spektrum elde edilmesinin sebebi, her hücrede bulunan ve türe özgü olan ribozomal proteinlerdir. Ribozomal proteinler mikrobiyal üreme ve çevre koşullarından en az etkilenen yapılardır. Bu yüzden ribozomal proteinler mikrobiyoloji laboratuvarlarındaki tanımlama işlemleri için en uygun yapılardır. MALDI-TOF MS ile identifikasyon yapılacağında her daim taze kültürler tercih edilmelidir. Çünkü rRNA zamanla parçalandığı için eski koloniden alınan örnek, pik sayısı ve pik yoğunluğunu düşürmektedir (Edward, 2010 ve Yılmaz, 2020).

Vejetatif bakterilerin matriks solüsyonu ile karışması lize olmalarına ve dolayısıyla protein içeriğinin açığa çıkmasına sebep olur. Virüs, mantar, bakteri sporları ve Actinomycesler gibi özel bazı bakterilerin matriks solüsyonu ile karışmaları lize olmaları için yeterli gelmemektedir. Bu mikroorganizmaların matriks solüsyonundan önce güçlü organik asitlerle ya da alkolle muamele edilmesi veya protein ekstraksiyonlarının yapılması gerekmektedir. Asıl olan hangi MALDI-TOF MS cihazı kullanılacaksa o veri tabanına sahip olan üretici firmanın önerilerine uygun olarak örneklerin hazırlanmasıdır (Yılmaz ve ark., 2014).

MALDI-TOF MS yöntemiyle mikroorganizmaların tanımlanmasının birkaç dakika sürmesi ve uygulamasının basit olması konvansiyonel yöntemlerle karşılaştırıldığında mikroorganizma identifikasyonunu oldukça hızlandırmaktadır. Ayrıca MALDI-TOF MS cihazının bir kez satın aldıktan sonra sonraki çalışmaların maliyetinin düşük olması bu yöntemin bir diğer avantajıdır (Ölmez, 2020).

MALDI-TOF MS yönteminde bazen etken mikroorganizmanın yanlış tanımlanması veya tanımlanamaması yöntemin kendisinden değil sistemin veri tabanında mikroorganizmaya ait yeterli referans spektrumların olmamasından ileri gelmektedir. Bu yüzden veri tabanlarının geliştirilmesiyle ilgili çalışmalar yapılmalıdır (Bilgin, 2019 ve Eigner ve ark., 2009).

MALDI TOF MS yönteminde aynı koşullarda, aynı mikroorganizmayla analiz tekrar edilse bile aynı yoğunlukta spektrumlar elde edilmeyebilir. MALDI TOF cihazından kaynaklanan farklılıklar, kullanılan matriks solüsyonu, incelenen kolonin yaşı, kullanılan besiyerinin cinsi, inkübasyon koşulları gibi birçok değişken elde edilen spektrumların birebir aynı olmasını etkilemektedir. Bunun için üretici firmanın önerileri mutlaka göz önünde bulundurulmalıdır.

1.8.6.1. MALDI-TOF MS ile Mantarların Tanımlanması

Konvansiyonel yöntemlerle mantar identifikasyonu yapmak haftaları alırken, MALDI-TOF MS yöntemiyle kısa zamanda tür bazında tanımlama yapmak mümkün olmaktadır. Yapılan çalışmalar maya tanımlanmasında MALDI-TOF MS'in başarı oranının %85-%100 arasında olduğunu göstermektedir (Bizzini ve ark., 2010 ve Van Veen ve ark., 2010). Özellikle *Candida* cinsi mantarlar tür bazında doğru olarak tanımlanabilmekteyken, *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp., *Fusarium* spp. ve dermatofitler yetersiz referans spektrumları nedeniyle daha az oranda tanımlanmaktadırlar. Filamentöz mantarların identifikasyonunda da başarılı bir

tanımlama için analiz öncesinde protein ekstraksiyonu yapılması gerekir (Yılmaz ve ark., 2014).

Mantarların kaliteli MALDI-TOF kütle spektrumlarını elde etmek için, hücrelerin %70 formik asit içerisinde parçalanması ya da mekanik bozulmaya tabii tutulması gerekmektedir. %70 formik asit ekstraksiyonunun yapılması matriks solüsyonu uygulamasından önce yapılmalıdır (Thell ve ark., 2011). Etanol veya formik asit kullanılan yöntemlerin ekstraksiyon etkinliği ve spektrum kalitesi yüksektir (Drevinek ve ark., 2012).

Klinik laboratuvarlarda, MALDI-TOF MS tabanlı mantar tanımlaması, bakteriyel tanımlamadan daha yavaş bir hızda gelişmiştir. Klinik laboratuvar ortamında mayaların tanımlanmasına ilişkin 2009'da yayınlanan 267 klinik izolat ve 18 tip koleksiyonu suş üzerinde Markelein ve ark. yaptığı çalışma yeni ufuklar açmıştır. Rutin laboratuvar da filamentli mantarların tanımlanması için standart bir MALDI-TOF MS prosedürünün geliştirilmesi birkaç yılı daha gerektirmiştir. Gerçekte, aynı kültürde farklı mantar yapılarının (hifa ve / veya conidia) birlikte bulunmasıyla örneklendiği gibi filamentöz mantarların doğal biyolojik karmaşıklığı, bunların tanımlanmasını zorlaştırır (Lollivier, 2017).

1.8.6.2. MALDI-TOF MS ile Dermatofitlerin Tanımlanması

Dermatofitlerin tanımlanması, dermatofitlerin kültürlerde nispeten yavaş büyümesi, çok çoğalmaması ve sıklıkla pigment üretmesi nedeniyle zordur. Dermatofitlerin MALDI-TOF MS tanımlaması, ağırlıklı olarak, kültür ortamı tipi, inkübasyon süresi, protein ekstraksiyon prosedürü, kütle spektrometresi cihazı ve referans spektrum kütüphanesi dahil olmak üzere rutin laboratuvar işleminde yer alan kritik faktörlerden etkilenebilir.

Kültür Ortamı

Bazı araştırmacılar tarafından MALDI-TOF MS aracılığıyla bakteri tanımlamasının kültür koşullarının etkilemediğini bildirmişlerdir (Carbonelle ve ark., 2007 ve Pennenace ve ark., 2010). MALDI-TOF MS aracılığıyla dermatofitlerin tanımlanmasında kültür koşulları fungal fizyolojiyi ve protein ekspresyon profilini derinden etkileyebilir ve dermatofit MALDI-TOF spektrumlarının kültür ortamının türünden etkilenir (Lollivier, 2013).

İnkübasyon Süresi

Dermatofitler kültür ortamında büyütülürken zamanla mantarlar belirli makroskopik ve mikroskopik özellikler geliştirir. Hücre duvarının bileşimindeki modifikasyonun eşlik ettiği farklı büyüme aşamalarından dolayı, kültürün yaşına bağlı olarak MALDI-TOF aracılığıyla çeşitli kütle spektrumları elde etme riski vardır. Çeşitli çalışmalara göre, protein ekstraksiyonundan önceki inkübasyon süresi, belirgin şekilde farklı sonuçlar vermeden 3 gün ile 3 hafta arasında değişmektedir. De Respinis ve ark. (2014), kültür inkübasyon süresinin 10 güne çıkarılmasının ve analizi tekrar etmenin tanımlama sonuçlarını geliştirmediğini bildirmiştir. Packeu ve ark. (2014), yaptıkları çalışmada dermatofit türlerinin tanımlanmasının doğruluğunun uzun bir inkübasyon süresiyle arttığını göstermiş, inkübasyon süresinin üç günden 14 güne çıkarılmasıyla %100 doğru tanımlamalara ulaşmışlardır.

Protein Ekstraksiyonu ve Matriks

Mantar hücreleri, bakteri hücrelerinden daha büyük boyuttadır ve sert bir hücre duvarına sahiptir. Dermatofitler de dahil olmak üzere mantarların hücre duvarı, esas olarak, daha az oranda protein, lipid ve polifosfatlarla birlikte taksonomik gruba (örn., Kitin, beta-glukanlar, mannanlar, galaktomannanlar, arabinogalaktanlar, ramnomannanlar) göre değişebilen polisakkaritlerden oluşur. Bakteri duvarından farklı olan bu özellikli bileşim, MALDI-TOF MS spektrumunu oluşturmak için

ilgilenilen proteinleri serbest bırakan bir ön analitik protein ekstraksiyon aşamasına olan ihtiyacı kısmen açıklamaktadır. Flamentöz mantarlar ve dermatofitler gibi parçalanması zor olan mikroorganizmalar için MS analizinden önce formik asit-asetonitril kullanan bir ilk protein ekstraksiyon adımı gerekmektedir. Çeşitli MALDI-TOF MS uygulamalarında çok sayıda matris maddesi kullanılmıştır. Dermatofit tanımlaması için en yaygın kullanılan ve önerilen matriks 4-hidroksi alfa-siyano-4-hidroksisinnamik asittir (Chapulova ve ark., 2014 ve Lollivier, 2017).

Kütle Spektrometresi

Mantarların rutin tanımlanması için kullanılan MALDI TOF MS cihazları Bruker Biotyper (Bruker-Daltonik, ABD), Axima/ Saramis (Shimadzu, Japonya), Vitek Ms (Biomerieux, Fransa) ve Andromas (Andromas SAS, Fransa) olmak üzere 4 tanedir. Bu platformların analitik metodolojileri çok benzerdir. Bu sistemler, öncelikle spektra ön işleme, bilinmeyen bir spektrum ile referans spektrumları (yorumlama kriterleri) arasındaki benzerliği karşılaştırmak ve ifade etmek için kullanılan referanslar ve algoritmalar oluşturmak için kullanılan algoritmalar açısından birbirinden farklıdır. Dermatofit tanımlaması için, bu ticarileştirilmiş kütüphaneler rutin kullanım için çok yetersizdir. Çeşitli çalışmalarda elde edilen yüksek tanımlama oranları, veri tabanlarının *in-house* referans spektrum kitaplıkları ile uygulanması nedeniyle mümkün olmuştur. Bu farklı platformlar, doğru bir referans spektrum kitaplığı oluşturmak için değişen derecelerde esnektir. En esnek iki sistem olan MALDI Biotyper ve Andromas, aynı suştan yayınlanan çoğaltılmış spektrumlar nedeniyle ortalama spektral bilgi kullanma imkânı sunar (Cassange ve ark., 2016).

Referans Spektra Kitaplığı

MALDI-TOF MS tanımlamasının ana sınırlamalarından birinin, doğruluğun referans spektrum kitaplığının kalitesine bağlı olmasıdır. Sonuçlar, tek başına standart üretici kitaplığından (ML) veya eklenmiş üretici kitaplığından (S-ML) elde edilmelerine bağlı olarak önemli ölçüde farklılık gösterir. Bu nedenle doğru ve

verimli MALDI-TOF MS tabanlı dermatofit tanımlaması için kitaplık takviyesi gereklidir. Aslında, dermatofit tanımlaması için MALDI-TOF MS'yi değerlendiren tüm çalışmalar kendi referans kitaplıklarını kullanmış, böylece ticarileştirilmiş referans spektrum kitaplıklarının ciddi sınırlamasını vurgulamışlardır. Ayrıca, başarılı tür tanımlaması, belirli bir tür için referans spektrum kitaplığındaki suş girişlerinin sayısına bağlıdır. Örneğin, Theel ve ark. (2011), ML ve S-ML kullanarak 171 izolatın sırasıyla sadece %4,7 ve %36,8'ini doğru bir şekilde tanımladı. Karabıçak ve ark. (2015), 115 izolatı ve 11 referans suşu tanımlamayı amaçlamış ve Bruker ML ve S-ML kullanarak sırasıyla %13,5'e karşılık 31'lik başarılı bir tanımlama oranı elde etmiştir. De Respini ve ark. (2014), dermatofit tanımlaması için Vitek MS Plus sisteminin performansını değerlendirmiş, üreticinin referans spektrum kitaplığını genişletmek için toplam 134 dermatofit izolatını kütüphaneye dahil etmiştir. Daha sonra 131 klinik dermatofit izolatı kullanarak bu kütüphaneyi doğruladı. MALDI-TOF MS tanımlama sisteminin etkinliği, uygun bir puanı eşiği (log score) ile geliştirilebilir. Örneğin, Theel ve ark. (2011), üreticinin 2,0 olan log skor eşiğini ve 1,7'lik bir azaltılmış log skor eşiğini kullanarak 171 izolatın sırasıyla %36,8 ve 59,6'sını doğru bir şekilde tanımladı. Aynı şekilde Karabıçak ve ark. (2015), log puanı eşiğini 2,0'dan 1,7'ye düşürerek tanımlama düzeyini %31'den %89,7'ye yükseltti.

1.9. Tedavi

Köpek ve kedilerde dermatofitozların tedavisinde topikal ve sistemik antifungaller kullanılabilir. Sistemik tedavide, itraconazol (bileşik olmayan) ve terbinafin, dermatofitoz için en etkili ve güvenli tedavilerdir. Griseofulvin etkilidir ancak itraconazol ve terbinafin ile karşılaştırıldığında daha fazla potansiyel yan etkiye sahiptir. Ketokonazol ve flukonazol daha az etkili tedavi seçenekleridir ve ketokonazolün yan etki potansiyeli daha fazladır. Lufenuron'un dermatofitlere karşı *in-vitro* etkinliği yoktur, dermatofit enfeksiyonlarının seyrini engellemez veya değiştirmez, sistemik antifungal veya topikal antifungal tedavilerin etkinliğini artırmaz ve dermatofitoz tedavisinde yeri yoktur. Kireç sülfür, enilkonazol veya bir

mikonazol/klorheksidin şampuanının haftada iki kez uygulanması, kedi ve köpeklerde yaygın dermatofitoz tedavisinde şu anda önerilen etkili topikal tedavilerdir. Hızlandırılmış hidrojen peroksit ürünleri ile klimbazol ve terbinafin şampuanları umut vericidir, ancak etkinliği belgeleyen daha fazla *in-vivo* çalışma mevcut olana kadar kesin olarak tavsiye edilemez. Mikonazol şampuanları *in-vitro* olarak etkinlik gösterir, ancak *in-vivo* olarak en çok klorheksidin ile birleştirildiğinde etkilidir (Moriello ve ark., 2017). Kerion lezyonları debridman veya diğer lokal bakım gerektirebilir ve ikincil enfeksiyonları tedavi etmek için antibakteriyel ajanların kullanımı belirtilebilir. Prednizon gibi steroidler inflamasyonda önemli bir azalmaya neden olabilir (Mattei ve ark., 2014). Ferreira ve ark. (2006) köpeklerde kerion için günde iki kez mikonazol, gentamisin ve betametazon ile topikal bir tedavi kullanmışlar ve 45 günde lezyon tamamen iyileştiğini bildirmişlerdir.

İnsanlarda dermatofit enfeksiyonlarının tedavisinde mantarın tür düzeyinde tanımlanması tedavinin etkinliği bakımından önemlidir. Lezyonun yeri, özelliği, yayılımı, antifungalin etki alanı, farmakokinetiği, ilaçların birbirleriyle etkileşimi yanında hastaya ait bilgiler değerlendirilerek ilaç seçilmelidir. Ayrıca risk ve yan etkileri dikkate alınarak uygun antifungal ilaca karar verilmelidir. Enfeksiyon belirtilerinde azalma veya tam bir iyileşme hali genellikle haftalarca veya aylarca süren uzun bir tedaviden sonra olmaktadır (Kayaalp, 1998).

1.9.1. Antifungal İlaçlar

Tibbi mantarlar ve mikozların 19. yüzyıldan beri bilinmesine karşın antifungal ilaçların klinik kullanımı yenidir. Antifungal ilaçlar, sistemik ve topikal olmak üzere klinik kullanım yönünden iki sınıfta incelenir. Bunun dışında kimyasal yapıları, hücre üzerine etkileri yönünden de sınıflandırılabilir. Memeli ve mantar hücrelerinin ökaryotik yapıda olması antifungal ilaçların kullanımını kısıtlamıştır. Antifungallerin mantar hücresinde üzerinde etkili olduğu üç hedef nokta bulunur. Bunlar; hücre zarı steroller, nükleik asit sentezi ve hücre duvar yapılarıdır.

Amfoterisin B

Amfoterisin B, 1950'lerde bulunmuş Polien grubudur. *Streptomyces nodosus*'tan izole edilmiştir. Amfoterisin B'nin 2 şekli bulunmaktadır. Geleneksel şekli amfoterisin B deoksikolatıdır. Amfoterisin B'nin lipit formülasyonu konvansiyonel formülasyonun nefrotoksik etkisini engellemek amacıyla geliştirilmiştir. Amfoterisin B mantarın en önemli membran sterolu olan ergosterole bağlanır. Bu bağlanma iyon kanallarının oluşumuna neden olur ve şekilde mantar hücre membranının ozmotik bütünlüğü hasara uğrar; bu da hücre içeriğinin sızmasına ve hücrenin ölümüne yol açar. Kolesterolle kıyaslandığında ergosterole daha çok affinite gösterir (İnci, 2021 ve Murray ve ark., 2014).

Amfoterisin B'nin etki spektrumu geniştir ve *Candida* kökenlerinin çoğu, *C. neoformans*, *Aspergillus* türleri, zigomiçetler ve endemik dimorfik patojeneler (*Blastomyces dermatitis*, *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum* ve *Penicillium marneffeii*) buna dahildir. *Aspergillus terreus*, *Pseudallescheria boydii*, *Fusarium* türleri, *Scedosporium prolificans*, *Trichosporon* türleri ve bazı esmer mantarlar Amfoterisin B'ye dirençli olabilirler (Murray ve ark., 2015).

Amfoterisin B'nin ağız yolundan emilimi çok düşüktür. Bu nedenle intravenöz yol tercih edilir. Eklem ve santral sinir sistemine girişi iyi değildir. Amfoterisin B'nin başlıca yan etkileri nefrotoksisite ve infüzyona bağlı gelişen ateş, üşüme hipotansiyon, dispne görülebilir. Nefrotoksisite yan etkisi, lipid şeklinin kullanımı ile azalma (İnci, 1999; İnci, 2021 ve Murray ve ark., 2015) göstermiştir.

Flusitozin (5-florositozin)

Sitozinin florin derivativesidir. Anti metabolit olarak işlev gören mevcut tek antifungaldir. Mantar hücreindeki DNA, RNA ve protein sentezini engelleyerek antifungal etki gösteren florlanmış bir primidin analogudur. Flusitozin sitozin permeaz aracılığıyla mantar hücrelerine girer ve sitoplazmada deaminasyonla 5-

florourasile döner. Oluşan 5-florourasil 5- floroüridik aside dönüştürülür ve sonrasında da RNA sentezi sırasında urasille yarışa girer. Sonuçta RNA'nın yanlış kodlanmasına, DNA ve protein sentezinin inhibisyonuna neden olur.

Memelilerde sitozin deaminaz bulunmadığı için 5- florourasilin toksik etki göstermez

Flusitozinin antifungal spektrumu *C. neoformans*, *Candida* türleri, *S. cerevisiae* ve bazı esmer küflere sınırlıdır. *Aspergillus* türleri, *Zygomycetes* ve diğer hyalinli küflere karşı etkili değildir (Murray ve ark., 2015).

Flusitozin suda çözünür ve oral yolla uygulandığında biyoyararlanımı oldukça yüksektir. Yarılanma ömrü 3 ila 8 saat olduğundan proteinlere bağlanması düşüktür. Flusitozinin yan etkileri; hepatoksisite, kemik iliği depresyonu ile gastrointestinal intoleranstır (İnci, 2021 ve Murray ve ark., 2015).

Azoller

Azol sınıfı antifungaller, yapısal olarak imidazoller ve triazoller olarak ikiye ayrılabilir. İmidazol sınıfında; ketakonazol, mikonazol, ekonazol, sulkanazol, klotrimazol, triazol sınıfında ise; flukonazol, itrakonazol, vorikonazol ve posakonazol yer alır. Azoller mantara ait sitokrom P-450'ye bağımlı olan lanosterol 14- α - demetilazı baskılayarak etki gösterirler. Bu enzim lanosterolün ergosterole dönüşümünde yer alır ve bunun inhibisyonu mantar hücresindeki membran sentezini bozar. Ergosterol sentezinin inhibisyonu, etken organizmaya ve kullanılan azole bağılı olarak, mantar hücresinin üremesinin inhibisyonu (fungistatik) veya hücre ölümüyle (fungisidal) sonuçlanır (Murray ve ark., 2015 ve Solgun, 2007).

Ketokonazol

İmidazol sınıfı antifungal ilaçların lipofilik bir üyesidir ve oral yolda emilim gösterir. Tinea infeksiyonlarının tedavisinde kullanılır (Niewerth ve ark., 2000). Klinik kullanımda blastomikoz, histoplazmoz, kromoblastomikoz, dermatofitozlardan başka antifungal tedavileri tolere edemeyen ya da tedavi başarısızlığı olan kişiler için önerilmektedir. Farmakokinetik ve dinamik yönden: vücutta doku ve organlara dağılımı iyidir. Beyin-omurilik sıvısına geçişi zayıftır. Proteine bağlanması %99 oranındadır. Karaciğerde metabolize olur. Son yarılanma ömrü, 8 saattir. Çeşitli organ ve dokularda yan etkileri bildirilmiştir (İnci, 2021). Ketakonazol mide ve karaciğer toksitesi, mide bulantısı, kusma ve döküntü gibi ciddi yan etkiler yapar. Yüksek dozlarda endokrin baskılanması yapabilir (Murray ve ark., 2015).

Flukonazol

Oral biyoayarlanımı yüksek ve toksitesi düşük birinci kuşak bir triazoldür. Flukonazol yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. *Candida glabrata* ve *Candida krusei*'ye karşı duyarlılığı azalmıştır. *Candida krusei* flukonazole karşı intrinsik direnç göstermektedir.

Flukonazol suda çözünebilen bir ilaç olup oral ya da intravenöz uygulanabilir. Proteinlere bağlanması düşüktür ve santral sinir sistemi başta olmak üzere tüm organ ve dokulara yayılır. Ciddi yan etkileri nadirdir (Murray ve ark., 2015).

İtrakonazol

Oral ve intravenöz uygulanabilen lipofilik bir triazoldür. İtrakonazol geniş bir antifungal etkinlik spektrumuna sahiptir. *Zygomycetes* türleri, *Fusarium* türleri, *S. prolificans* itrakonazole direnç gösterir (Murray ve ark., 2014). İtrakonazolün geniş spektrum göstermesi ve kentine yüksek ilgisinden dolayı hızlı tedavi sağlar.

Onikomikoz tedavisinde kullanılır. Tırnakta flukonazol ve terbinafine göre daha uzun zamanda kalır (Solgun, 2007). İtrakonazlün emilimi iyidir. Proteinlere bağlanma olayı yüksek olup, karaciğer yolu ile atılır, metabolizması hızlıdır. Ketokonazole göre yan etkisi daha azdır (Tunçoğlu, 2009).

Vorikonazol

Geniş spektrumlu yeni bir triazoldür. Hem oral hem de intravenöz formülasyonları vardır. Dokulara ve santral sinir sitemine geçişi yüksektir. Aspergilloz ve nütropenik olmayan hastalardaki sistemik kandidozlar için önerilen bir ilaçtır. Vorikonazol maya benzeri mantarlara karşı fungistatik, Aspergillus türlerine karşı fungisidal etkinlik gösterir (Murray ve ark., 2015).

Posakonazol

Posakonazol, invazif aspergilloz ve kandidozlarda profilaksi ve tedavi amacı ile yeğlenen bir ilaçtır. Proteine bağlanma oranı %98'dir. Ağırlıklı olarak albümine bağlanır. Hepatik yolla metabolize edilir. Deride döküntü, ishal, bulantı, kusma, karın ağrısı, hipertansiyon ve periferik ödem, baş ağrısı en sık görülen yan etkileridir (İnci, 2021).

Ekinokandinler

Ekinokandinler, mantar hücre duvarı üzerinden glukon sentezi inhibisyonu yolu ile etki eden fungusidal antifungallerdir. Kullanımda olan yarı-sentetik üç ekinokandin türevi (kaspofungin, mikafungin ve anidulafungin) vardır. Ekinokandinler özellikle nütropenik hastalarda görülen invazif kandidozların tedavisinde kullanılır. Ekinokandinlerin en önemli avantajları; *Candida* üzerine fungusidal etki göstermeleri, flukonazole dirençli *C. glabrata* ve *C. krusei* üzerine etkili olmaları, böbrek ve karaciğer toksisitesi yönünden ve ilaçlarda kombine kullanıldığında ilaç etkileşimlerinin düşük potensiyelde olmasıdır. Ekinokandinler

intravenöz uygulanmalıdır. Ekinokandinlerin etki yeri mantar hücre duvarı olduğu için doğrudan insan hücresine etkisi yoktur. Bu yüzden ekinokandinler daha az toksisiteye neden olur. Çoğunlukla, ekinokandinler iyi tolere edilir ve yan etkileri, halen klinik kullanımda olan üç ilacın hepsi için hafif ve benzerdir (İnci, 2021).

Alilaminler

Mantar hücresinde, skualen epoksidaz enzimini baskılayarak ergosterolün sentezlenmemesine sebep olurlar. Bu baskılanma neticesinde hücre içinde aşırı miktarda biriken skualen, hücre zarının görevlerini ve hücre duvar sentezini bozarak mantar hücresini öldürür. Dermatofitlere karşı fungusid etkiye sahip, lipofilik ve keratinofilik bir ilaçtır. Griseofulvin ve azollere göre daha hızlı etki gösterir. Güçlü lipofilik olması dolayısıyla deri, yağ dokusu ve tırnakta iyi dağılım gösterir. Alilaminler %80-90 oranında tinea corporis, tinea cruris, tinea pedis'e etki ederler. Terbinafin ve naftifin *dermatofitlere karşı* geniş bir spektrumu gösterir (Solgun, 2007).

Naftifin

Allilamin grubundan ilk kullanılan ilaçtır. Kornifiye epitele yüksek ilgisi vardır. *Candida* türlerinin neden olduğu duyarlı deri ve mukokutanöz mikozlarda (oral kandidoz) tercih edilir (Solgun, 2007).

Terbinafin

Allilamin sınıfında geniş etki spektrumlu lipofilik bir antifungal ilaçtır. Hem topikal hem de sistemik olarak kullanılabilir. Lipofilik olması sebebiyle dermis, epidermis, stratum korneumda yüksek konsantrasyonlara ulaşır. Özellikle tırnak mikozlarında olmak üzere dermatofitozlarda klinik kullanımı olan bir ilaçtır (İnci, 2021 ve Solgun, 2007).

Griseofulvin

Dermatofitlere bağlı infeksiyonların tedavisinde oral olarak kullanılan bir ilaçtır. Mantar hücresindeki mikrotübüllerle etkileşip mitoz inhibisyonuna yol açarak mantarın gelişimini önler. Etki spektrumu dardır, sadece dermatofitlere etkilidir. Özellikle dermatofit türlerinin neden olduğu Tinea corporis, Tinea capitis, Tinea pedis gibi yüzeysel mikozların tedavisinde kullanılır. İyi tolere edilebilen bir ilaçtır. Yan etkileri; başağrısı, bulantı, ishal, hepatotoksisite, döküntü ve nörolojik yan etkilerdir (İnci, 2021 ve Murray ve ark., 2015).

1.9.2. Antifungal Duyarlılık Testleri

Geçmişte *in-vitro* antifungal aktivitenin belirlenmesine yönelik çok sayıda çalışma yapılmış olmakla birlikte, bu amaçla kullanılan yöntemlerin standardizasyonu ve referans yöntem geliştirme çalışmaları 1980'li yıllarda başlamıştır. Bu tarihten itibaren, bağışıklık sistemi baskılanmış hasta popülasyonundaki göreceli artışla birlikte, bu olgularda gelişen invazif mikozlar, büyük önem kazanmıştır. Bu değişime paralel olarak, yeni antifungal bileşikler ya da eski antifungal ilaç gruplarının yeni türevleri geliştirilmeye başlanmış, böylece tedavide kullanılabilecek antifungal ilaçların çeşitliliği giderek artmıştır. Bu nedenle, hangi ilacın ya da ilaç grubunun hangi mantar infeksiyonları için kullanılabileceğinin ortaya konması ve etki spektrumlarının ve *in-vitro* etkinlik düzeylerinin belirlenmesi gerekmiştir. Aynı zamanda, daha önce akla gelmeyen antifungal ilaçlara direnç kavramı gündeme gelmiştir. Primer (doğal) direnç ile ilgili farkındalık artmış ve sekonder (kazanılmış) direnç önem kazanmıştır. Günümüzde giderek önem kazanan rutin amaçlı antifungal duyarlılık testi uygulamalarının ana amacı, infeksiyonun tedavisi için kullanılan ilacın klinik başarı sağlayabilme oranını önceden tahmin edebilmektir. Antifungal duyarlılık testlerinin rutinde bu amaçla kullanılmasının önemi ve yararı gösterilmiştir. Ancak, bu bilgiye paralel olarak, özellikle fırsatçı invazif mantar infeksiyonlarında, *in-vitro* direnç dışında birçok başka faktörün klinik başarı oranını etkileyebileceği de unutulmamalıdır. *In-vitro* antifungal duyarlılığın

belirlenmesinde sıklıkla mikrodilüsyon yöntemleri kullanılmakta ve sonuçlar minimum inhibitör konsantrasyon (MİK, ug/ml) değerleri ile yorumlanmaktadır. MİK, belli ilaç konsantrasyonlardaki üreme yoğunluklarının antifungal ilaç içermeyen üreme kontrol çukurundakine kıyaslanması ile saptanan bir değerdir. Üreme kontrol çukuruna göre üreme miktarındaki (bulanıklıktaki) azalmanın ne ölçüde olduğu yani en düşük konsantrasyonun MİK değeri olarak okunması ise, test edilen mantara ve antifungal ilaca göre farklılıklar göstermektedir. Minimum inhibitör konsantrasyon okuma değeri ("MIC endpoint") olarak isimlendirilen bu değerlendirme ölçütü, dereceli olarak tanımlanmaktadır. Örneğin, üremenin görsel olarak tam inhibisyonu MİK-O, üremenin üreme kontrol çukuruna göre belirgin (~%50 oranında) azaldığı duruma MİK-2 okuma değeri olarak isimlendirilir. Ekinokandin grubu antifungal ilaçların, özellikle *Aspergillus* suşlarına etkisini belirlemek amacıyla ise minimum efektif konsantrasyon (MEK, ug/ml) adı verilen değerlendirme ölçütü kullanılır. Bu, MİK değerinden farklı olarak bulanıklık değil makroskopik/mikroskopik olarak morfolojide görülen değişiklikleri saptamaya yönelik bir okuma değeridir. Bu değer, makroskopik olarak filamentöz üreme paterninin kaybolmasına, küçük, yuvarlak üreme paterninin ortaya çıkmasına, mikroskopik olarak ise, kısa, güdükleşmiş hifa görünümünün belirmesine yol açan en düşük ekinokandin konsantrasyonunu işaret eder. *In-vitro* antifungal duyarlılık testi olarak referans disk difüzyon yöntemlerinin kullanıldığı durumda ise sonuçların değerlendirme ölçütü inhibisyon zon çapları olmaktadır (Arıkan Akdağlı, 2021).

Referans Antifungal Duyarlılık Testlerinin Uygulama Alanları

Antifungal duyarlılık testlerinin başlıca 3 uygulama alanı bulunmaktadır. Bunlar, rutin amaçlı, epidemiyolojik surveyans amaçlı ve yeni ilaçların *in-vitro* antifungal etki spektrumlarını belirleme amaçlı olarak yapılan uygulamalardır. Rutin amaçlı uygulamalar, *Candida* suşları üzerinde yoğunlaşmakla birlikte özellikle *Aspergillus fumigatus* suşlarında sekonder azol direncinin dikkat çekmiş olması nedeniyle, günümüzde klinik *A. fumigatus* suşları için de antifungal duyarlılık testlerinin yapılması önerilmektedir. Bu testler, primer tedaviye yanıtızlık, tedavi altında gelişen infeksiyonlar, uzun süreli triazol kullanım öyküsü veya *Aspergillus*

için tekrarlayan kültür pozitiflikleri durumunda daha da önem kazanmaktadır. Antifungal tedaviyi yönlendirme amaçlı bu rutin endikasyonlar dışında, epidemiyolojik amaçlı duyarlılık testi uygulamaları, her merkezde periyodik olarak gerçekleştirilmelidir.

Referans Antifungal Duyarlılık Testi Yöntemleri ve Dökümanlar

Yapılan kapsamlı çalışmalar sonucunda, CLSI (Cinical and Laboratory Standards Institute) tarafından maya mantarlar için uygulanacak standart bir mikrodilüsyon yöntemi geliştirilmiş, bu gelişmeyi, yine CLSI tarafından küf mantarları için de benzer bir yöntemin ortaya konması izlemiştir. Bu yöntemlerle ilgili dokümanlar yıllar içerisinde gereken alanlarda revize edilerek bugünkü şekillerini almıştır. CLSI mikrodilüsyon dokümanlarının ardından EUCAST-AFST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing Antifungal Susceptibility Testing Subcommittee") tarafından, yine maya ve küf mantarlar için ayrı ayrı olmak üzere, CLSI mikrodilüsyon yöntemiyle kıyaslandığında bazı modifikasyonlar içeren yöntemler geliştirilmiş ve ilgili dokümanlar yayınlanmıştır.

CLSI yöntem dökümanları dışında, yöntemle ilgili açıklamaları, kalite kontrol suşları için elde edilmesi gereken sonuçları, önerilen direnç sınır değerlerini içeren CLSI ek dökümanları vardır (Arıkan Akdağlı, 2021).

CLSI ve EUCAST MİK Direnç Sınır Değerleri

CLSI / EUCAST MİK sonuçlarının yorumlanmasında kullanılan klinik direnç sınır değerleri, sadece bazı mantarlar ve antifungal ilaçlar için bulunmaktadır. Bu değerlerin saptandığı mantarların ve antifungal ilaçların sayısı giderek artmaktadır. *In-vitro* direncin belirlenmesinde birincil olarak tercih edilmesi gereken değerler, klinik direnç sınır değerleridir. Klinik direnç sınır değerlerinin mevcut olmadığı durumlarda, o mantar türü ve antifungal ilaç için saptanmış olan epidemiyolojik eşik değerler (ECV, "ECOFF"), ilgili suşun o ilaca dirençle ilişkili olası bir mutasyon

içerip içermediğine ilişkin bilgi sağlayabilmektedir. CLSI mikrodilisyon yöntemi ile saptanmış olan MIK değerlerinin yorumlanması için kullanılan güncel klinik direnç sınır değerlerine ve epidemiyolojik eşik değerlere, CLSI dokümanları ve ilgili makalelerden ulaşılabilmektedir. EUCAST yöntemi ile saptanmış olan MIK değerlerinin yorumlanması için kullanılan güncel klinik direnç sınır değerleri ve epidemiyolojik eşik değerler ise, EUCAST web sitesinde ve EUCAST dokümanlarında bulunmaktadır (Arıkan Akdağlı, 2021).

1.10. Koruma

Kedi ve köpek barınaklarında dermatofit infeksiyonu saptandığında, tüm hayvanlar dermatofit varlığı yönünden incelenmelidir. Sağlıklı hayvanlar, hastalıklı hayvanlardan ayrılmalıdır. Dermatofit görülen hayvanların tedavisine kısa sürede yapılmalıdır (Tel, 2005). Kontamine materyaller %0,5 Sodyum hipoklorit ile dezenfekte edilmelidir (Quinn ve ark., 2011). Hayvanların derileri kuru tutulmalı, yaşam alanları güneş almalı ve iyi havalandırılmalıdır (Ganguly ve Sharma, 2017). Kedilerde *M. canis* bazlı aşı kullanılmaktadır (Samanta, 2015). Kedilerin *M. canis* 'e karşı tedavisi için ölü dermatofit aşısı (Fel-O-Vax) ticari olarak bulunmaktadır. Bu aşı lezyonların önlenmesi ve tedavisinde kullanılmaktadır. Frymus ve ark. (2013), ölü *M. canis* hücre duvarı aşısının kedilerde hem humoral hem de hücre aracılı bağışıklığı uyardığını bildirmiştir (Selvi, 2020). Sığırlarda uygulanan aşı *T. verrucosum*'un LTF-130 suşu dondurarak kurutulmuş konidyumlarını ve hifaları barındıran adjuvant içermeyen canlı bir aşıdır. Hastalık önleyici ve aynı zamanda tedavi edici bir aşıdır. 2–4 haftalık buzağılara yapılması önerilir. Aşının bağışıklığı ömür boyu olmaktadır (Samanta, 2015).

Zoofilik dermatofitlerden korunmak için, hayvanlar düzenli aralıklarla kontrol edilmeli, gerekli görülürse tedavi edilmelidir. Bu hayvanlarla uğraşanlar kişisel koruyucu kıyafetler giymelidir. İnsanların toplu olarak yaşadıkları yerlerde bazı dermatofitler tinea kapitis salgınına neden olabildikleri için kişisel eşyalar ortak kullanılmamalıdır. Dermatofitoz lezyonlarından otoinokülasyonla bulaşı önlemek için el hijyenine önem gösterilmelidir (Solgun, 2007).

Bu çalışmada, dermatofit türlerinin tanımlanmasında uzun zaman alan ve deneyim gerektiren konvansiyonel yöntemlerle, doğru ve hızlı sonuç veren MALDI-TOF MS yönteminin karşılaştırılması ve çalışılacak dermatofitlerin antifungal duyarlılıklarının belirlenmesi amaçlanmaktadır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Gereç

Bu çalışmada Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü Ulusal Mikoloji Referans Laboratuvarı'na 2011-2021 döneminde çeşitli merkezlerden dermatofitoz ön tanısıyla gönderilen deri, saç ve tırnak numunelerinden konvansiyonel yöntemlerle izole edilen 82 dermatofit suşu çalışmaya dahil edilmiştir

2.1.1. Kullanılan Besiyerleri

Sabouraud Dextroz Agar (SDA) (Sigma-Aldrich, ABD)

Besiyerinin içeriği (g/l)

Pepton 10,0 g

Glukoz 40,0 g

Agar 15,0 g

SDA besiyeri için üreticinin verdiği talimatlara göre 1 litre distile suya 65 gr SDA eklendi. SDA'nın tamamı çözüldükten sonra otoklavda 121 santigrad derecede on beş dakika steril edilerek petri plaklarına dağıtıldı.

Siklohegzimitli Sabouraud Dextroz Agar (SSDA) (Sigma-Aldrich, ABD)

Besiyerinin içeriği (g/l)

Pepton 10,0 g

Glukoz 40,0 g

Agar 15,0 g

Siklohegzimit

SSDA besiyeri için üreticinin verdiği talimatlara göre 1 litre distile suya 65 gr SDA eklendi. Tamamı çözüldükten sonra otoklavda 121 santigrad derecede on beş dakika steril edildi. Daha sonra son konsantrasyonu 0.5 g/l olacak biçimde sikloheksimid ilave edildi. Petri plaklarına dağıtıldı.

Patates Dekstroz Agar (PDA) (Sigma-Aldrich, ABD)

Besiyerinin içeriği (g/l)

Patates ekstrakt agar 4,0 g

Glukoz 20,0 g

Agar 15,0 g

PDA besiyeri için üreticinin verdiği talimatlara göre 1 litre distile suya 39 g PDA eklendi. PDA'nın tamamı çözüldükten sonra otoklavda 121 santigrad derecede on beş dakika steril edilerek petri plaklarına dağıtıldı. Ayrıca yatık bir biçimde kapaklı tüplere de dağıtım yapıldı.

Üre Agar (Sigma-Aldrich, ABD)

Besiyeri içeriği(g/l)

Pepton 1,0

Glukoz 1,0

Sodyum klorid 5,0

Disodyum fosfat 1,2

Potasyum dihidrojen fosfat 0,8

Fenol kırmızısı 0,012

Agar 15

%40'lık üre solusyonu: (Sigma-Aldrich, ABD)

2.4 g besiyeri 95 ml distile su içinde eritildi tamamen çözüldü. 115°C'de 20 dakika otoklavda steril edildi. Daha sonra bekletilip 50°C'ye kadar soğduktan sonra 5 ml %40'lık üre çözeltisi ilave edildi. İyice karıştırılıp, steril tüplere dağıtıldı (Ateş, 2007 ve Solgun ve ark., 2011).

Antifungal Duyarlılık Testinde Kullanılan Besiyeri

0,165 Molar MOPS ile (3-N-morpholine-propane sulfonic acid) (Merck, Darmstadt, Germany) ile pH 7,0 olacak biçimde ayarlanmış L-glutaminli sodyum bikarbonatsız RPMI-1640 kullanılmıştır.

Besiyeri içeriği: g/l

Arjinin (serbest baz) 0,2 g

Asparajin 0,05

Aspartik asit 0,02

Sistin* 2HCL 0,0652

Glutamik asit 0,02

L-glutamin 0,3

Glisin 0,01

Histidin 0,015

Hidroksi prolin 0,02

İsolösin 0,05

Lösin 0,05

Lizin • HCl 0,04

Metiyonin 0,015

Fenilalanin 0,015

Prolin 0,02

Serin 0,03

Treonin 0,02

Triptofan 0,005

Tirozin • 2Na • 0,02883

Valin 0,02

PABA 0,001

Biotin 0,0002

Koline klorid 0,003

Folik asit 0,001

Glutatyon, redükte 0,001

myo-Inositol 0,035
Niazinamid 0,001
D-Pantotenik 0,00025
Pridoksin HCl 0,001
Riboflavin 0,0002
Tiyamin HCl 0,001
Vitamin B12 0,000005
Kalsiyum nitrat • H₂O 0,1
D-Glukoz 2,0
Potasyum klorit 0,4
Fenol kırmızısı • Na 0,0053
Magnezyum sülfat 0,04884
Sodyum klorid 6,0
Sodyum fosfat, dibazik 0,8

RPMI-1640 besiyeri'nin (glutaminli ve fenol kırmızılı, sodyum bikarbonatsız toz besiyeri) 10,4 g 900 ml distile suda çözüldü. Ardından 34,53 gr MOPS eklendi. Eriyene kadar karıştırıldı. 10 N sodyum hidroksit ile 25°C'de pH 7,0 olacak şekilde ayarlandı. Son hacim 1 litre oluncaya kadar su ilave edildi. Filtre ile çözelti steril edildi (CLSI M38-A3, 2017).

2.1.2. Antifungal Duyarlılık Testinde Kullanılan İlaçlar

Sıvı mikrodilüsyon testinde, aşağıdaki antifungal ilaçlar kullanıldı.

Ketokonazol: (Sigma –Aldrich, St. Louis, USA)

İtrakonazol: (Sigma –Aldrich, St. Louis, USA)

Amfoterisin B: (Sigma –Aldrich, St. Louis, USA)

Terbinafin: (Sigma –Aldrich, St. Louis, USA)

2.1.3. Boyalar ve Kimyasal Solüsyonlar

Laktofenol Pamuk Mavisi (Merck, Darmstadt, Germany)

Laktik asit 20 ml

Fenol Kristalleri 20 g

Gliserin 40 ml

Distile su 20 ml

Pamuk mavisi 2 ml

Ticari olarak sağlanan laktofenol pamuk mavisi kullanıldı. Fenol öldürücü ajan olarak kullanılır, gliserol kurumaya karşı etkilidir. Pamuk mavisi ise mantar yapılarını boyar.

Absolut Etanol (Merck, Milipore, USA)

%70'lik Formik Asit (Sigma –Aldrich, USA)

Asetonitril (Sigma –Aldrich, USA)

2.1.4. Kullanılan Cihazlar

Biyogüvenlik kabini

McFarland ölçüm cihazı

Spektrofotometre

Işık mikroskobu

Etüv

Vortex

MALDI-TOF cihazı

2.2. Yöntemler

2.2.1. Yeniden Canlandırma

Deri, saç ve tırnak örneklerinden izole edilmiş, -80°C’lik derin dondurucuda tüp kriyoviyallerde ve PDA besiyerinde saklanmış olan dermatofit suşları oda ısısında bekletilerek suşların çözülmesi sağlandı ve daha sonra suşlar SSDA, SDA ve PDA besiyerlerine ekim yapılarak pasajlandı. İki hafta inkübasyona bırakıldı. Her hafta suşların üremeleri kontrol edildi. Makroskobik incelemede besiyerinin ön ve arka yüzündeki koloni rengi, koloni morfolojisi, pigmentasyonu, kolonilerin üreme durumu ve üreme hızı değerlendirildi. Mikroskobik incelemede SDA ve PDA besiyerlerinde üreyen kolonilerden laktofenol pamuk mavisi ile selofan bant yöntemi kullanılarak preparat hazırlandı. Mikroskopta hifa, makrokonidyum ve mikrokonidyum yapıları incelendi. İki hafta üremeleri gözlenip yeniden canlandırılan suşların besiyerlerindeki makro ve mikro morfolojik görünümleri, 25°C ve 35°C’deki üremeleri ve üre hidrolizi özellikleri birlikte değerlendirilerek konvansiyonel olarak tür tanımlamaları yapıldı.

2.2.2. Üre Hidroliz Testi

Üre hidroliz testi için üre agar kullanıldı. Üre besiyerine ekim yapıldı. Üre agar bir hafta boyunca 25–30°C’de inkübasyona bırakıldı. İki-üç günde besiyerinde renk değişikliği olup olmadığı takip edildi. Besiyerinin renginin değişmemesi negatif, rengin pembeye dönüşmesi pozitif olarak değerlendirildi.

2.2.3. MALDI-TOF MS ile Dermatofitlerin Tanımlanması

Dermatofitlerin identifikasyonu için MALDI-TOF MS Bruker Biotyper 3.0 veri tabanı yazılımı (versiyon 3.1.2.0; Bruker Daltonik, Bremen, Almanya) kullanıldı. Dermatofitlerin yüksek kaliteli MALDI-TOF kütle spektrumlarını elde etmek için öncelikle dermatofit ekstraksiyonu gerçekleştirildi.

Dermatofitlerin Protein Ekstraksiyonu

İki ml’lik ependorf tüp içine 300 µl steril serum fizyolojik konuldu. Bir hafta önce ekilmiş suşlardan koloniler steril eküvyon çubuğu ile toplanıp ependorfa eklendi. Üzerine 0,9 ml saf etanol eklenip vorteks yapıldı. Bu karışım 2 dk 10.000 rpm’de santrifüj yapıp süpernant otomatik pipetle alınıp atıldı. Pelletin 15 dakika kuruması beklendi. Pellet üzerine 40 µl %70’lik formik asit eklenip vorteks yapıldı. Kırk µl asetronitril ilave edilip yine vorteks yapıldı. İki dakika 10.000 rpm’de santrifüj yapıp üzerindeki süpernatant alınıp başka bir ependorfa aktarıldı (Lolliever, 2017).

Süpernatantdan 1 µl alınıp MALDI platenin üzerindeki kuyucuklara konuldu ve oda ısısında kuruması beklendi. Örnek kuruduktan sonra üzerine 1 µl-siyano-4-hidroksisinamik asit (HCCA) matriks solüsyonu ilave edildi. Bu sayede örnek kristalize hale getirildi ve tekrar oda ısısında kuruması için beklendi. Kuruyan MALDI kuyularındaki örnekler cihaza yerleştirilip analiz işlemine başlandı.

Dermatofit tanımlamasının en iyi şekilde gerçekleşebilmesi için 2000-20.000 Da kütle aralığında ve pozitif iyon dengesinde ölçümler gerçekleştirildi.

2.2.4. Antifungal Duyarlılık Testi

Antifungal duyarlılık testleri dermatofitler için CLSI 'ın tavsiye ettiği M38-A3 referans sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle yapıldı. Kalite kontrol suşu olarak *Aspergillus flavus* ATCC 204304, *Candida parapsilosis* ATCC 22019 suşları kullanıldı (CLSI M38-A3, 2017).

Kullanılan Besiyeri

CLSI'nın önerileri doğrultusunda 0,165 M MOPS (Merck) ile oda ısısında pH:7,0'a tamponlanan L-glutaminli, sodyum 35 bikarbonatsız, pH indikatörü olarak fenol red'li sentetik RPMI 1640 (Biological Industries) kullanıldı.

Antifungal İlaç Dilusyonları

Ketokonazol (Sigma), itrakonazol (Sigma), terbinafin (Sigma), Amfoterisin B (Sigma) toz halde ticari olarak sağlandı. Tüm ilaçlar DMSO (dimetil sülfoksit)'da çözüldü. DMSO'da çözünen bu antifungal ilaçlar stok ilaçtır. Bu ilaçlar dilusyonları son ilaç konsantrasyonunun 100 katı olacak şekilde hazırlandı. Stok ilaç dilusyonlarını -80°C'de derin dondurucuda saklandı. Antifungal duyarlılık testine başlamadan önce önce RPMI-1640 ile 1/50 oranında sulandırıldı. Antifungal ilaçların çözücüler, dilüentleri ve çalışmanın yapıldığı MİK aralıkları (µg/ml) Çizelge 2.1'de verilmiştir.

Çizelge 2.1. Antifungal ilaçların çözücü, dilüentleri ve MİK aralıkları (µg/ml).

Antifungal ilaçlar	Çözücü	Dilüent	MİK aralıkları (µg/ml)
Amfoterisin B	DMSO	RPMI-1640	0,06-32
Ketakonazol	DMSO	RPMI-1640	0,015-32
İtrakonazol	DMSO	RPMI-1640	0,015-32
Terbinafin	DMSO	RPMI-1640	0,015-32

İnokulum Hazırlanması

Dermatofit izolatları, PDA'da 30°C'de de 4 veya 5 gün, iyi konidya gelişimi oluşuncaya kadar inkübe edildi. Kolonilerin üzeri yaklaşık 1 ml %0,85'lik serum fizyolojik ile kaplandı ve nazikçe kazıyarak süspansiyon hazırlandı. Transfer pipeti veya steril swab ile koloniler toplanıp, steril tüpe alındı. Ağır partiküllerin aşağıya çökmesi için 5-10 dk beklendi. Steril tüpün üst kısımda kalan süspansiyon yeni bir steril tüpe alınarak, 15 saniye vortekslendi. Hemositometre ile konidya sayımı yapıldı ve gerektiğinde konsantrasyon ayarlandı. Ardından süspansiyonların yoğunluğunun 1×10^3 - 3×10^3 CFU/ml olabilmesi için RPMI-1640 ile 1/ 50 oranında dilüe edildi (CLSI M38-A3, 2017).

Sıvı Mikrodilasyon Testi

Test için U tabanlı mikrolaklar kullanıldı. Besiyeri kontrolü için 12. çukura 100 µl ilaçsız RPMI-1640, 1 ve 10 arası çukurlara 100 µl inokulum ve 100 µl hazırlanan ilaçların iki katlı seri dilasyonları sırasıyla eklendi. Üreme kontrol çukuru olması için 11. çukura, 100 µl inokulum kondu. Mikrolaklar 25°C'de 5 gün inkübe edildi. Dermatofit izolatlarını inkübasyonun 4. gününden sonra değerlendirildi (CLSI M38-A3, 2017).

Değerlendirme

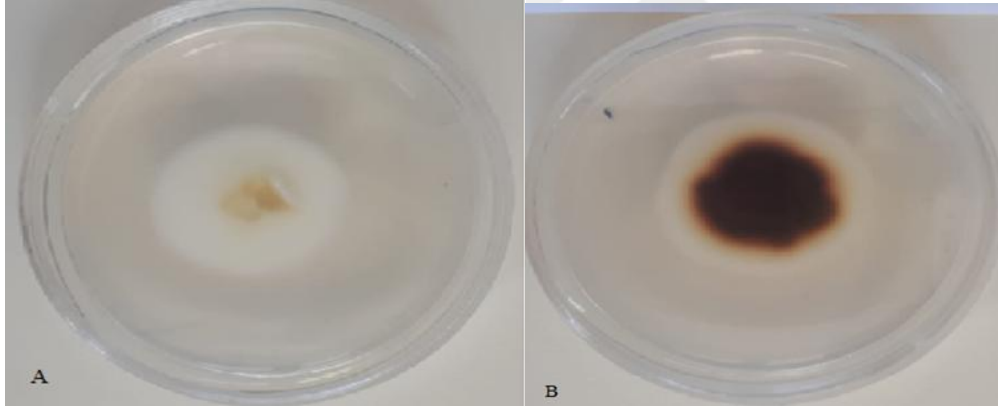
MİK sonuçları değerlendirilirken azoller ve terbinafine için üreme kuyucuğuna göre %80 ve üzeri inhibisyon olan kuyucuk, Amfoterisin B için %100 inhibisyon olan kuyucuk MİK değeri olarak okundu (CLSI M38-A3, 2017).



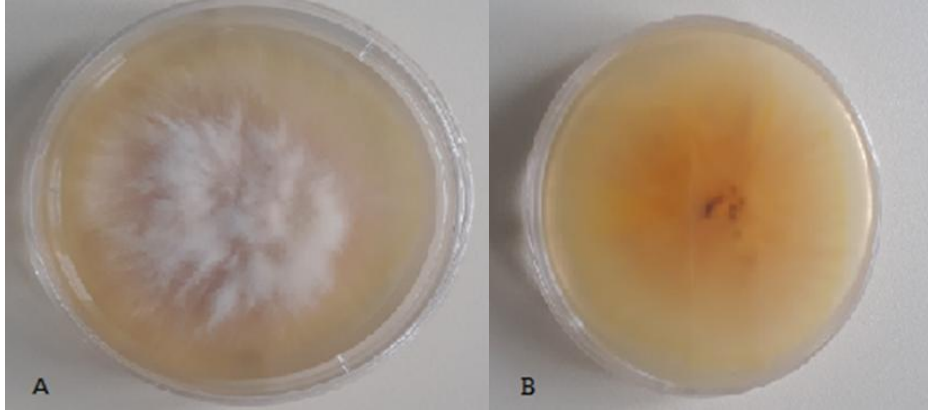
3. BULGULAR

Çalışmamızda, 15 adet *M. canis*, 23 adet *T. mentagrophytes* ve 45 adet *T. rubrum* olmak üzere 82 dermatofit izolatu bulunmaktadı. Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü Ulusal Mikoloji Referans Laboratuvarında tanımlanan ve saklamaya alınan 82 dermatofit suşu yeniden canlandırıldıktan sonra SDA ve PDA'ya pasajlanarak üremeleri ve koloni oluşumları sağlandı.

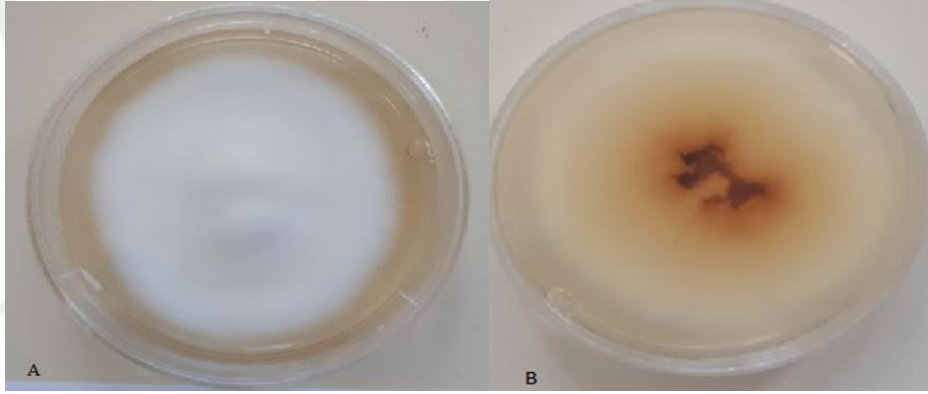
SDA'da tipik koloni oluşumları, PDA'da pigmentasyon oluşturmaları, üre agarda üreaz aktiviteleri değerlendirildi. Dermatofit suşlarının besiyerlerindeki koloni görünümü Şekil 3.1-3.6'da, üreaz aktivitesi Şekil 3.7'de gösterilmiştir.



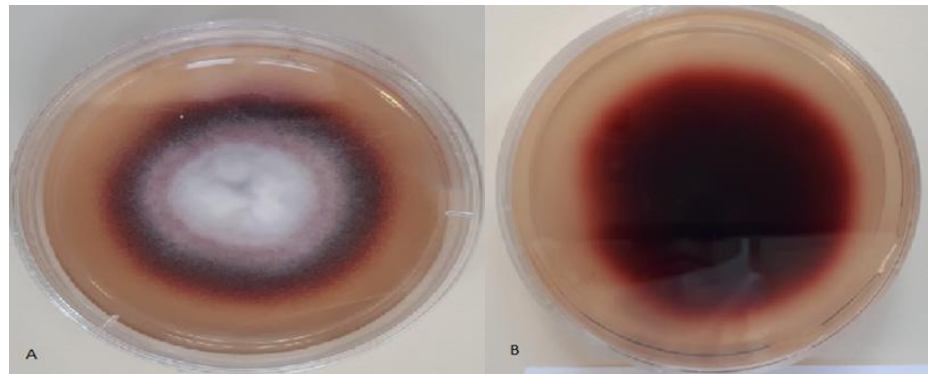
Şekil 3.1. *T. rubrum*'un SDA besiyerinde. A. Önden koloni görünümü B. Arkadan koloni görünümü.



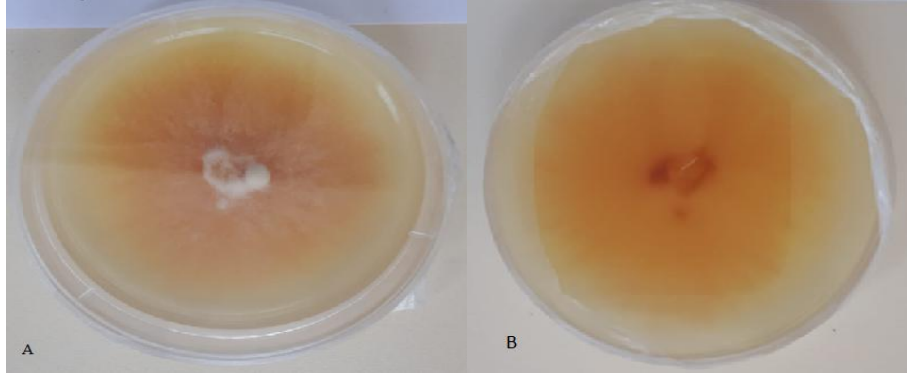
Şekil 3.2. *M. canis*'in SDA besiyerinde. A. Önden koloni görünümü B. Arkadan koloni görünümü.



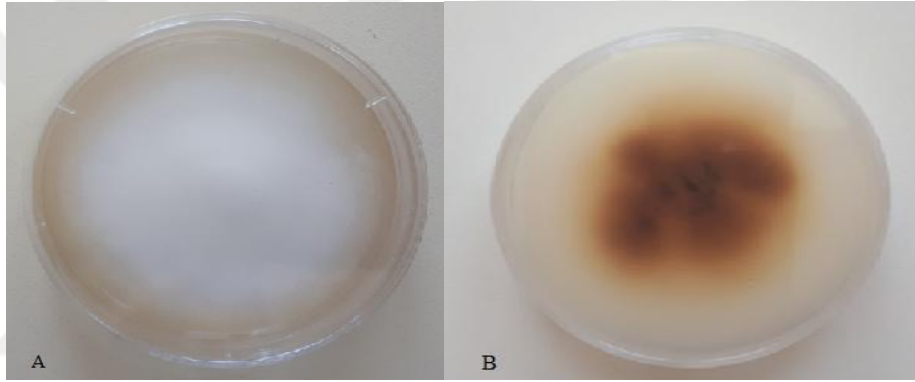
Şekil 3.3. *T. mentagrophytes*'in SDA besiyerinde. A.Önden koloni görünümü B. Arkadan koloni görünümü.



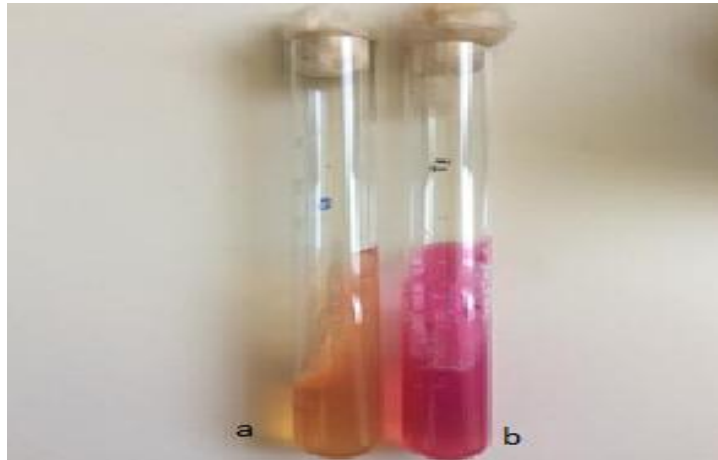
Şekil 3.4. *T. rubrum*'un PDA besiyerinde. A. Önden koloni görünümü B. Arkadan koloni görünümü.



Şekil 3.5. *M. canis*'in PDA besiyerinde A. Önden koloni görünümü B. Arkadan koloni görünümü.

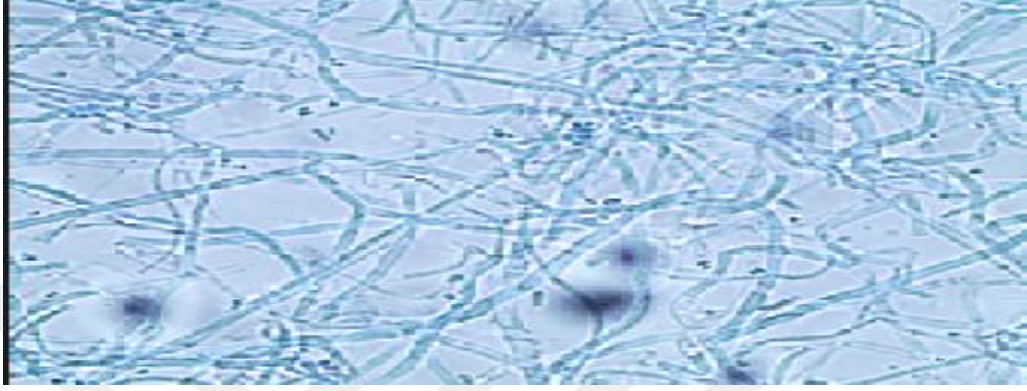


Şekil 3.6. *T. mentagrophytes*'in PDA besiyerinde A.Önden koloni görünümü B. Arkadan koloni görünümü.

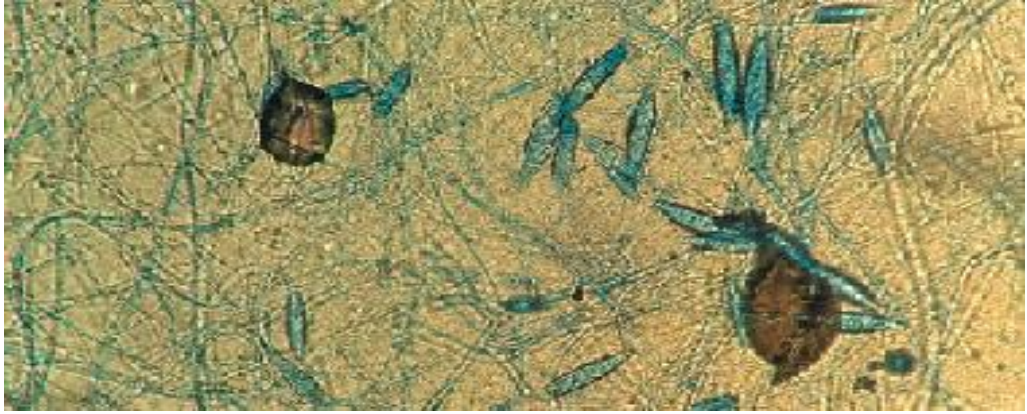


Şekil 3.7. a. Üre agarda *T. rubrum*'un üreaz negatif aktivitesi b. Üre agarda *T.mentagrophytes*'in üreaz pozitif aktivitesi.

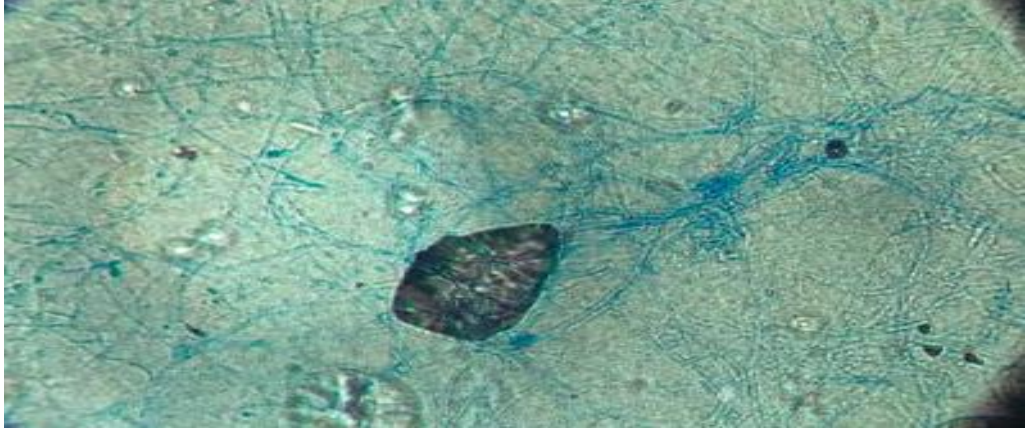
SDA ve PDA’da üreyen suşlardan laktofenol pamuk mavisi ile preparat hazırlanarak hifa yapısı, mikrokonidyum ve makrakonidyum gibi mikroskopik özellikleri incelendi. Şekil 3.8-3.10’da Laktofenol pamuk mavisi ile boyanan dermatofit izolatlarının x40’lık objektiften mikroskopik görüntüleri verilmiştir.



Şekil 3.8 *T. rubrum*’un mikroskopik görüntüsü.



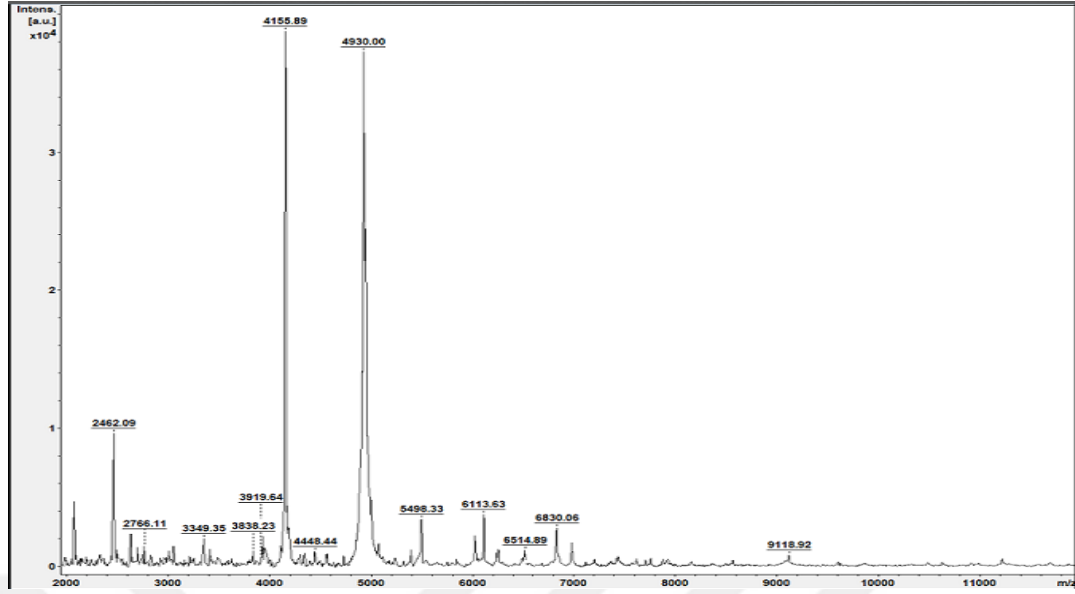
Şekil 3.9. *M. canis*’in mikroskopik görüntüsü.



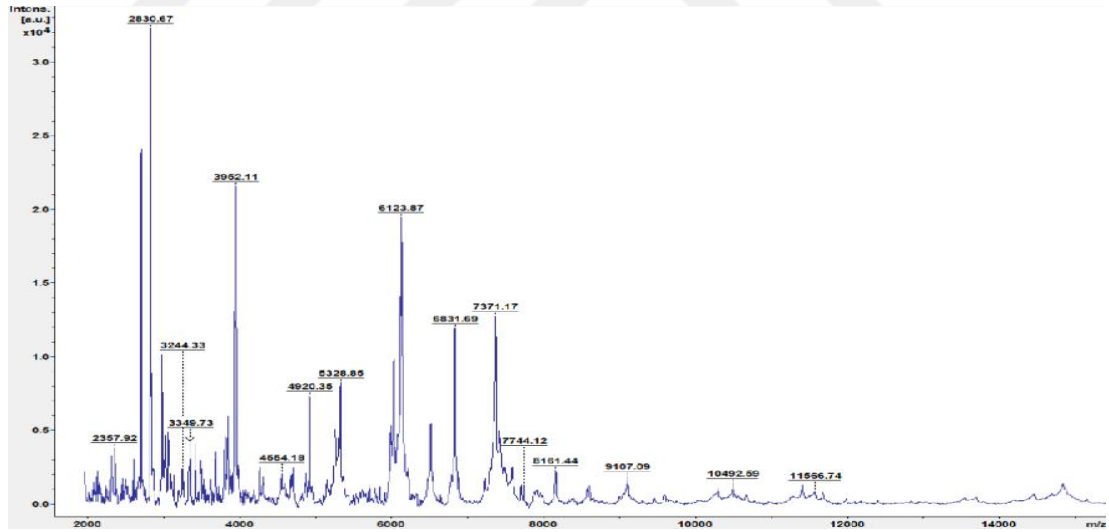
Şekil 3.10. *T. mentagrophytes*'in mikroskopik görüntüsü.

Besiyerinde yeniden üretilerek canlandırılan suşların makro ve mikro morfolojik görünüşleri, 25°C ve 35°C'de üremeleri ve üre hidrolizi gibi özellikleri değerlendirilerek yeniden konvansiyonel tür tanımlamaları yapıldı.

Dermatofit suşlarının MALDI-TOF MS ile tanımlanmasında, analiz için Biodyper Microflex LT modeli (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Almanya) kullanıldı. Protein ekstraksiyonu yapılan suşlar, MALDI platenin üzerine konularak cihaza yerleştirildi. Bruker MALDI-TOF MS cihazı her bir örnek başına 80 ila 350 lazer atışı yapılarak kütle spektrumları elde edildi. Elde edilen kütle spektrumları MALDI-TOF MS kütüphanesiyle karşılaştırılarak her bir örnek için tanımlama yapıldı. Şekil 3.11.-3.13.'te türlere ait kütle spektrumları gösterilmektedir.



Şekil 3.11. *T. mentagrophytes*'in MALDI-TOF MS spektrum görünümü.



Şekil 3.12. *T. rubrum*'un MALDI-TOF MS spektrum görünümü.

Çizelge 3.1. Dermatofit suşlarının konvansiyonel tanımlama, MALDI TOF MS tanımlama sonuçları ve MALDI-TOF skorları.

SUŞ NO	KONVANSİYONEL TANIMLAMA SONUCU	MALDI-TOF MS TANIMLAMA SONUCU	MALDI-TOF SKORU
125	<i>M. canis</i>	<i>M. canis</i>	2,036
136	<i>M. canis</i>	<i>M. canis</i>	1,389
164	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>	1,689
167	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>	1,366
168	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>	1,744
170	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>	1,827
171	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>	1,517
179	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>	1,794
181	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>	1,554
183	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>T. mentagrophytes</i>	1,429
184	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>	1,628
204	<i>M. canis</i>	<i>M. canis</i>	1,960
216	<i>M. canis</i>	<i>M. canis</i>	2,096
258	<i>M. canis</i>	<i>M. canis</i>	1,383
264	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>T. mentagrophytes</i>	2,108
268	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>T. mentagrophytes</i>	1,946
272	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>T. mentagrophytes</i>	1,610
283	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>T. mentagrophytes</i>	1,564
286	<i>M. canis</i>	<i>M. canis</i>	1,942
294	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>T. mentagrophytes</i>	2,190
298	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>T. mentagrophytes</i>	2,116
307	<i>M. canis</i>	<i>M. canis</i>	1,797
315	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>T. mentagrophytes</i>	1,935
316	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>T. mentagrophytes</i>	1,778
317	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>T. mentagrophytes</i>	2,035
319	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>	1,681
325	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>T. mentagrophytes</i>	1,600
330	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>	1,712
340	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>T. mentagrophytes</i>	1,980
350	<i>M. canis</i>	<i>M. canis</i>	1,742
352	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>T. mentagrophytes</i>	2,164
365	<i>M. canis</i>	<i>M. canis</i>	1,514
367	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>T. mentagrophytes</i>	1,846
368	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>	1,750
369	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>	1,627
370	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>T. mentagrophytes</i>	1,893
373	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>T. mentagrophytes</i>	1,788
374	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>T. mentagrophytes</i>	1,586
377	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>	1,582
382	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>	1,952
383	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>	2,008
387	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>	1,836
388	<i>M. canis</i>	<i>M. canis</i>	1,735
390	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>	1,793
391	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>	1,851
397	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>T. mentagrophytes</i>	1,796
398	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>T. mentagrophytes</i>	2,158
400	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>	1,879
402	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>	1,776
403	<i>M. canis</i>	<i>M. canis</i>	2,032
405	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>T. mentagrophytes</i>	1,816
406	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>T. mentagrophytes</i>	1,678
410	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>	1,510
412	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>	1,606
413	<i>M. canis</i>	<i>M. canis</i>	1,568
414	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>	1,798
416	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>	1,664
419	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>	1,940

Çizelge 3.1. Devam. Dermatofit suşlarının konvansiyonel tanımlama, MALDI TOF MS tanımlama sonuçları ve MALDI-TOF skorları.

SUŞ NO	KONVANSİYONEL TANIMLAMA SONUCU	MALDI-TOF MS TANIMLAMA SONUCU	MALDI-TOF SKORU
425	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>	1,863
426	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>	1,838
427	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>	1,505
430	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>	1,358
445	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>	1,580
447	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>	1,446
448	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>	1,302
449	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>	1,395
451	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>	1,745
452	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>	1,428
458	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>	1,656
459	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>T. mentagrophytes</i>	1,714
461	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>	1,568
463	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>	1,769
465	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>	1,885
473	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>	1,437
481	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>	1,408
482	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>T. mentagrophytes</i>	1,764
483	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>	1,601
484	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>	1,782
485	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>	1,717
491	<i>M. canis</i>	<i>M. canis</i>	2,263
492	<i>M. canis</i>	<i>M. canis</i>	2,323
510	<i>M. canis</i>	<i>M. canis</i>	1,946

Çizelge 3.2’de Bruker Biolytper’in önerdiği MALDI-TOF skorları ile düşürülmüş MALDI-TOF skorlarının karşılaştırılması gösterilmiştir.

Çizelge 3.2. Dermatofit suşları için önerilen MALDI-TOF skorları ile düşürülmüş MALDI-TOF skorlarının karşılaştırılması

NO	SUŞ NO	TÜR İÇİN ÖNERİLEN ≥2 SKORLAR	SUŞ NO	CİNS İÇİN ÖNERİLEN 2 İLE ≥ 1,7 ARASINDAKİ SKORLAR	SUŞ NO	TÜR İÇİN DÜŞÜRÜLMÜŞ SKORLAR (≥1,7)	SUŞ NO	CİNS İÇİN DÜŞÜRÜLMÜŞ SKORLAR ≥1,5
1	492	2.323	340	1.980	492	2.323	492	2.323
2	491	2.263	204	1.960	491	2.263	491	2.263
3	294	2.190	382	1.952	294	2.190	294	2.190
4	352	2.164	268	1.946	352	2.164	352	2.164
5	398	2.158	510	1.946	398	2.158	398	2.158
6	298	2.116	286	1.942	298	2.116	298	2.116
7	264	2.108	419	1.940	264	2.108	264	2.108
8	216	2.096	315	1.935	216	2.096	216	2.096
9	125	2.036	370	1.893	125	2.036	125	2.036
10	317	2.035	465	1.885	317	2.035	317	2.035
11	403	2.032	400	1.879	403	2.032	403	2.032
12	383	2.008	426	1.863	383	2.008	383	2.008

SUŞ NO	TÜR İÇİN ≥2 MALDİ TOF SKORLARI	CİNS İÇİN ÖNERİLEN 2 İLE ≥ 1,7 ARASINDAKİ SKORLAR	SUŞ NO	TÜR İÇİN DÜŞÜRÜLMÜŞ SKORLAR (≥1,7)	SUŞ NO	CİNS İÇİN DÜŞÜRÜLMÜŞ SKORLAR ≥1,5
13		391 1.851	340	1.980	340	1.980
14		367 1.846	204	1.960	204	1.960
15		426 1.838	382	1.952	382	1.952
16		387 1.836	268	1.946	268	1.946
17		170 1.827	510	1.946	510	1.946
18		405 1.816	286	1.942	286	1.942
19		414 1.798	419	1.940	419	1.940
20		307 1.797	315	1.935	315	1.935
21		397 1.796	370	1.893	370	1.893
22		179 1.794	465	1.885	465	1.885
23		390 1.793	400	1.879	400	1.879
24		373 1.788	426	1.863	426	1.863
25		484 1.782	391	1.851	391	1.851
26		316 1.778	367	1.846	367	1.846
27		402 1.776	426	1.838	426	1.838
28		463 1.769	387	1.836	387	1.836
29		482 1.764	170	1.827	170	1.827
30		368 1.750	405	1.816	405	1.816
31		451 1.745	414	1.798	414	1.798
32		168 1.744	307	1.797	307	1.797
33		350 1.742	397	1.796	397	1.796
34		388 1.735	179	1.794	179	1.794
35		485 1.717	390	1.793	390	1.793
36		459 1.714	373	1.788	373	1.788
37		330 1.712	484	1.782	484	1.782
38			316	1.778	316	1.778
39			402	1.776	402	1.776
40			463	1.769	463	1.769
41			482	1.764	482	1.764
42			368	1.750	368	1.750
43			451	1.745	451	1.745
44			168	1.744	168	1.744
45			350	1.742	350	1.742
46			388	1.735	388	1.735
47			485	1.717	485	1.717
48			459	1.714	459	1.714
49			330	1.712	330	1.712
50					164	1.689
51					319	1.681
52					406	1.678
53					416	1.664
54					458	1.656
55					184	1.628
56					369	1.627
57					272	1.610
58					412	1.606
59					483	1.601
60					325	1.600
61					374	1.586
62					377	1.582
63					445	1.580
64					413	1.568
65					461	1.568
66					283	1.564
67					181	1.554
68					171	1.517
69					365	1.514
70					410	1.510
71					427	1.505

Elli adet dermatofit suşu MİK yöntemi ile çalışıldı. Amfoterisin B, itrakonazol, ketokonazol ve terbinafin için MİK değerleri test edildi. Dermatofit izolatlarının antifungal duyarlılık profilleri, CLSI M38-A3'e göre çalışılmıştır. Kalite kontrol suşu olarak *T. mentagrophytes* MYA 4439, *T. rubrum* MYA 4438 ATCC suşları kullanılmıştır.



Şekil 3.14. Dermatofit suşunun MİK plağındaki üreme görünümü.

Itrakonazol, ketokonazol ve terbinafine için %80 ve üzeri inhibisyon olan kuyucuk, amfoterisin B için %100 inhibisyon olan kuyucuk MİK değeri olarak okunmuştur. Şekil 3.14 'de dermatofit suşunun MİK plağındaki üreme görünümü gösterilmiştir.

Antifungal duyarlılık çalışması yapılan 8 adet *M. canis* suşunun MİK aralıkları amfoterisin B için 0,25-1, itrakonazol için 0,015-0,25, ketokonazol için 0,015-0,5 ve terbinafin için <0,015-0,03 olarak bulundu. Çizelge 3.2'de *M. canis* suşlarının 4 antifungale karşı duyarlılık profilleri verilmiştir.

Çizelge 3.3. *M. canis*'in (n=8) antifungallere karşı duyarlılık profilleri.

Antifungaller	MİK aralıkları (µg/ml)	MİK ₅₀ (µg/ml)	MİK ₉₀ (µg/ml)
Amfoterisin B	0,25-1	0,5	1
Itrakonazol	0,015-0,25	0,03	0,125
Ketokonazol	0,015-0,5	0,06	0,25
Terbinafin	<0,015-0,03	0,015	0,03

Antifungal duyarlılık çalışması yapılan 24 adet *T. mentagrophytes* suşunun MİK aralıkları amfoterisin B için 0,015-4, itrakonazol için <0,015-2, ketokonazol için 0,015-1 ve terbinafin için <0,015-0,125 olarak bulundu. Çizelge 3.3'de *T. mentagrophytes* suşlarının 4 antifungale karşı duyarlılık profilleri verilmiştir.

Çizelge 3.4. *T. mentagrophytes*'in (n=24) antifungallere karşı duyarlılık profilleri.

Antifungaller	MİK aralıkları (µ g/ml)	MİK ₅₀ (µg/ml)	MİK ₉₀ (µg/ml)
Amfoterisin B	0,015-4	1	2
Itrakonazol	<0,015-2	0,06	0,25
Ketokonazol	0,015-1	0,125	0,5
Terbinafin	<0,015-0,125	0,03	0,06

Antifungal duyarlılık çalışması yapılan 18 adet *T. rubrum* suşunun MİK aralıkları Amfoterisin B için 0,25-1 Itrakonazol için 0,015-0,125, Ketokonazol için 0,015-0,5 ve Terbinafin için <0,015-0,06 olarak bulundu. Çizelge 3.4' de *T. rubrum* suşlarının 4 antifungale karşı duyarlılık profilleri verilmiştir.

Çizelge 3.5. *T. rubrum* 'un(n=18) antifungallere karşı duyarlılık profilleri.

Antifungaller	MİK aralıkları (µg/ml)	MİK ₅₀ (µg/ml)	MİK ₉₀ (µg/ml)
Amfoterisin B	025-1	1	1
Itakonazol	0,015-0,125	0,06	0,125
Ketokonazol	0,015-0,5	0,0,06	0,5
Terbinafin	<0,015-0,06	0,03	0,06

Kalite kontrol suşlarının MİK'leri, önerilen CLSI aralığı ile uyumluydu. Çalışmamızda standart test yöntemine göre dirençli suş izole edilmedi. Standart suşun literatürde bildirilen MİK değeri ile karşılaştırıldıklarında izolatların hiçbiri, anormal MİK aralığı göstermedi. Dermatofitlere karşı antifungal duyarlılıkta itakonazol ve ketokonazol gibi azol içeren antifungaller için MİK değerleri düşük bulundu. Ancak terbinafin çalışılan tüm dermatofit türleri için antifungal duyarlılıkta en düşük MİK değerini ortaya koydu.

4. TARTIŞMA

Dermatofitozlar, insan ve hayvanlarda patojenik keratinolitik mantarların neden olduğu, dünya nüfusunun yaklaşık %20-25'ini etkileyen küresel olarak önemli bir hastalıktır. Son zamanlarda artan sosyoekonomik problemler, uluslararası seyahat ile göçler ve özellikle evcil hayvanlarla temas sonucu insanlarda dermatofitoz insidansında çarpıcı bir artış olmuştur. Bu bakımdan dermatofitlerin identifikasyonu önem arz etmektedir.

Dermatofitlerin identifikasyonunda kullanılan konvansiyonel yöntemler, klinik örneklerden doğrudan mikroskopi yoluyla mantar etkenlerinin saptanması ve klinik ve çevresel örneklerin kültüre edilmesine dayanmaktadır. Kültüre edilen dermatofitlerin identifikasyonu, kolonilerin makromorfolojik, mikromorfolojik ve fizyolojik özelliklerinin incelenmesiyle olur. Kolonilerin makromorfolojisinde, kolonin büyüme hızı, koloni dokusu, koloni rengi, mikromorfolojisinde ise hifaların, mikrokonidyum ve makrokonidyumların varlığı ile bunların özellikleri değerlendirilir. Eğer bu özelliklerle teşhise ulaşılamazsa üreaz, beslenme gereksinimleri, *in-vitro* saç/kıl perforasyonu gibi fizyolojik ve biyokimyasal testler de dermatofitlerin konvansiyonel olarak teşhisinde yardımcı olarak kullanılabilir. Direkt mikroskopik yöntem, basit, ucuz ve hızlı olmasına rağmen özgüllüğü yoktur. Bunun dışında bu yöntem %15'e kadar yanlış negatif sonuç verebilir. Kültür yöntemiyle ise dermatofit türlerinin identifikasyonu sağlanmasına rağmen bu yöntem 4 haftaya varan uzun inkübasyon sürelerini gerektirir (Pihet ve Le Goviç, 2017 ve Robert ve Pihet, 2008). MALDI-TOF MS ile identifikasyon ise günümüzde yeni, hızlı ve güvenilir bir yöntem olarak ön plana çıkmaktadır.

Çalışmamızda bulunan 82 dermatofit suşundan 15 adet *M. canis*, 23 adet *T. mentagrophytes* ve 45 adet *T. rubrum* türü identifiye edilmiştir. Bizim çalışmamızla benzer şekilde, Taha ve ark. (2017)'nin Mısır'da yaptıkları çalışmada insanlardan izole edilen 48 dermatofit örneği geleneksel yöntemlerle

identifiye edilmiş ve 15 adet *M. canis*, 12 adet *T. violaceum*, 12 adet *T. rubrum*, 5 adet *E. floccosum*, ve 4 adet *T. mentagrophytes* türü saptanmıştır. Ayrıca bu izolatlar moleküler yöntemlerle de tanımlanarak doğrulanmıştır. Kondori ve ark. (2010), İsveç'te 177 tırnak örneği üzerinde yaptıkları çalışmada örnekleri konvansiyonel yöntemlerle tanımlamışlardır. Dermatofitoz şüphesi olan tırnak örneklerinde dermatofit tespit oranını, mikroskopi ile %46 ve kültür ile %34 bulmuşlardır. Yapılan başka bir çalışmada, yalnızca doğrudan mikroskopik inceleme ve elde edilen kültürlerin makroskopik ve mikroskopik analizi temelinde dermatomikozlu yaklaşık üç bin hastaya teşhis koyulmuştur (Courtellemont ve ark., 2017). Piri ve ark. (2018), İran'da yaptıkları bir çalışmada 140 hayvan deri ve saç örneğini incelemişler konvansiyonel metotlar olan direk mikroskopik inceleme pozitifliğini %85,7, kültür pozitifliğini %75 olarak bulmuşlardır. Ayrıca örneklerden yapılan nested-PCR'da numunelerin %90'nını pozitif bulmuşlardır. En çok izole edilen tür ise *T. verrucosum* olmuştur. Getso ve ark. (2021) Nijerya'da gerçekleştirdiği çalışmada, 112 tinea capitis şüpheli örneğin %41'nin direkt mikroskopisi pozitif, %31,25'inde ise kültür sonucu pozitif bulunmuştur. Yapılan konavansiyonel tanımlama sonucu en baskın tür olarak *M. audounii* izole edilmiştir. Mısır'da Tawfik ve ark. (2022), 100 hastanın deri ve tırnak örnekleri üzerinde yaptıkları çalışmada konvansiyonel tanımlamada direkt mikroskopi pozitifliği %51, kültürde üreme yüzdesi %77'dir. Baskın tür olarak ise *T. violacumu* izole etmişlerdir.

Konvansiyonel yöntemlerden, direkt mikroskopi hızlı ve basit olmasına rağmen, bu yöntemin spesifikliği azdır. Kültür yönteminde ise 4 haftaya varan uzun inkübasyon süresi bulunmasına rağmen ve halen altın standart olarak kullanılmaktadır. Ancak değerlendirmenin yapılması için tecrübeli personelin bulunması gerekir. Dermatofitlerin tanımlanmasına yönelik konvansiyonel yöntemler, zahmetli, zaman alıcı ve uzmanlık deneyimi gerektirir.

Mikroorganizmaların tanımlanmasında kullanılan bir başka yöntem ise, matris destekli lazer desorpsiyon/ionizasyon uçuş süresi kütle spektrometrisi (MALDI TOF MS)'dir. Son birkaç yılda, matris destekli lazer

desorpsiyon/iyonizasyon uçuş süresi kütle spektrometrisi (MALDI -TOF MS), mikrobiyal patojenlerin hızlı, basit ve güvenilir tanımlanması için klinik teşhis laboratuvarlarında yaygın olarak kullanılmaktadır. MALDI TOF MS, belirli bir mikroorganizmayı tanımlamak için oluşturulan protein profillerinin kapsamlı bir referans spektrum kütüphanesinde bulunan türe özgü protein modelleri ile karşılaştırarak tanımladığı yeni bir tekniktir.

Tez çalışmasında konvansiyonel yöntemlerle tanımlanan tüm dermatofit izolatlarının tamamı (15 *M. canis*, 23 *T. mentagrophytes* ve 45 *T. rubrum* suşu), MALDI-TOF MS yöntemi ile çalışılarak doğrulanmıştır. Çalışma sonucunda MALDI-TOF MS analizi geleneksel yöntemlerle %100 uyumlu bulunmuştur.

Çalışmamızla benzer şekilde Gnat ve ark. (2020)'nın Polonya'da yaptıkları çalışmada MALDI-TOF MS analizinin, semptomatik ve asemptomatik enfeksiyonların sırasıyla %97,2'sinde ve %72'sinde geleneksel tekniklerle uyumlu pozitif sonuçlar verdiğini bildirmişlerdir. Erhard ve ark. (2008)'nin yaptığı bir çalışmada, deri ve tırnak numunelerinden izole edilmiş ve geleneksel morfolojik tanımlama yöntemleri ile de doğrulanmış 20 klinik suşla temsil edilen 5 dermatofit türünü MALDI-TOF MS ile tanımlamışlardır. Erhard ve ark., 20 izolattan 19'u doğru bir şekilde tanımlandığı için yüksek bir güven seviyesi elde etmişlerdir.

MALDI-TOF MS ile dermatofitlerin identifikasyonunda, spektral veri tabanının geliştirilmesi ve çeşitliliğinin artırılması tanımlama oranlarını yükseltmektedir. Alshawa ve ark. (2012), dermatomikoza neden olan dermatofit ve *Neoscytalidium* türlerini tanımlamak için MALDI-TOF MS'i değerlendirmişlerdir. Öncelikle 12 farklı dermatofit türünün spektral veri tabanını geliştirmişler, sonra da veri tabanının performansını klinik dermatofit izolatu üzerinde test etmişlerdir. Çalışmada, 360 dermatofit izolatının 331'inde türlerin doğru tanımlanmasını yaparak geleneksel yöntemlerle %91,9'luk bir uyum elde etmişlerdir. *T. mentagrophytes* kompleksine ait suşlar çok yakından ilişkilidir ve geleneksel tanımlama teknikleriyle ayırt edilmesi zordur. Packeu ve ark.

(2013)'nın *T. mentagrophytes* kompleksine ilişkin yaptıkları çalışmada MALDI-TOF MS'in bu kompleksin dermatofitlerini ayırt etmede yararlı bir araç olup olamayacağını test etmişler ve bunun için komplekse ait 6 farklı türün 17 suşu ile bir referans veri tabanı oluşturmuşlardır. Bu veri tabanını test etmek için Belçika'nın Bilimsel Halk Sağlığı Enstitüsünün mikroorganizma koleksiyonun iyi tanımlanmış 54 dermatofit suşu kullanılmıştır. Test edilen suşların %89'u MALDI-TOF ile kolaylıkla tanımlanmıştır.

De Respinis ve ark. (2013) dermatofitleri tanımlamak için MALDI-TOF MS'in tanı laboratuvarları için uygunluğunu değerlendirdikleri çalışmalarında, ilk olarak 18 dermatofit türüne ait 108 referans suşla spektral bir veri tabanı oluşturmuşlar ve bunu superspektra olarak isimlendirmişlerdir. Çalışmalarının ikinci bölümünde MALDI-TOF MS, yeni oluşturulan superspektra ile 9 türü temsil eden 141 klinik izolat kullanılarak test etmiş ve sonuçları morfoloji çalışmalarından elde edilen verilerle karşılaştırmışlardır. Buna göre 141 izolatın 128'i (%90,8) tür düzeyinde morfolojik tanımlama ile uyumlu bulmuşlardır. L'ollivier ve ark. (2013) yaptıkları çalışmada, 17 dermatofit türünün 48 iyi karakterize edilmiş izolatını içeren bir referans spektrum kütüphanesi oluşturulduktan sonra MALDI-TOF MS tabanlı tanımlamayı test etmişler, klinik izolatların 130/133 (%97,8)'ü uygun şekilde tanımlamışlardır. Nenoff ve ark. (2013)'nın yaptıkları başka bir çalışmada, 21 farklı türü içeren 285 dermatofit izolatı MALDI-TOF MS ve SARAMİS yazılımı kullanılarak analiz etmişler ve konvansiyonel yöntemlerle tanımlanmış 285 dermatofit suşunun %78,2'sini MALDI-TOF MS ile tanımlanmıştır. Calderaro ve ark. (2014), referans veri tabanını geliştirmek için hem konvansiyonel hem de moleküler yöntemlerle tanımlanan 24 dermatofit izolatını MALDI-TOF MS ile analiz etmişler ve elde ettikleri spektrumları referans veri tabanını desteklemek için kullanmışlardır. Geliştirilen veri tabanının sağlamlığını doğrulamak için 64 dermatofit izolatı ile MALDI-TOF MS analizi yapmışlar ve uygulama ile original veri tabanında bulunmayan türlerin tanımlanmasına olanak sağladığını bildirmişlerdir.

Packeu ve ark. (2014), dermatofit tanımlaması için kapsamlı bir referans veri tabanı kullanan MALDI-TOF MS'in iş akışının performansı 176 klinik suş üzerinde değerlendirmişlerdir. Üç inkübasyon gününden sonra direkt hedef plakaya numune koyma prosedürünün kullanılmasıyla %40 doğru tanımlama sağlamışlar, hem artan inkübasyon süresi hem de ekstraksiyon prosedürü kullanılması ile %100 doğru tanımlama elde ettiklerini bildirmişlerdir. Intra ve ark. (2018) sadece 2 günlük koloni büyümesinden sonra MALDI-TOF MS ile dermatofit tanımlamasının uygunluğunu değerlendirmişlerdir. İki günlük koloni büyümesinin ardından formik asit protein ekstraksiyon protokolünü kullanarak dermatofitlerin sırasıyla cins ve tür düzeyinde %70 ve %46'sı uygun şekilde tanımlamışlar ve etanol-formik asitasetonitril ekstraksiyon protokolünün eklenmesiyle de, tanımlama oranını %90 ve %62'ye çıktığını bildirmişlerdir. Sadece 2 günlük koloni büyümesinin ardından dermatofitlerin hızlı ve güvenilir bir şekilde tanımlanması için iki aşamalı bir iş akışı önermişlerdir. Da Cunha ve ark. (2018) doğrudan transfer yönteminin dermatofitlerle kullanılıp kullanılamayacağını değerlendirmişlerdir. Bruker sistemini kullanarak kendi kütüphanelerini oluşturmuşlar ve moleküler olarak tanımlanmış izolatlarla performansını değerlendirmişlerdir. Hedef plakaları kullanan doğrudan transfer yöntemiyle, klinik dermatofit izolatlarının %85'inin doğru tanımlamışlardır. Dermatofitlerin MALDI-TOF MS yöntemi ile tanımlanmasında, kültür ortamı tipi, inkübasyon süresi, protein ekstraksiyon prosedürü, MALDI-TOF MS cihazı ve referans spektrum kütüphanesinin zenginliği identifikasyon yüzdesini etkileyen faktörlerdir.

Baumbach ve ark. (2021), kirpilerden alınan 50 numunenin 17 (%34)'sinde fungal üreme tespit etmiştir. Çalışmada araştırmacılar bu örneklerin MALDI-TOF MS ile tanımlanmasında önce başarısız olmuşlar, sonra bu pozitif örneklerin ITS sekanslaması yapılarak, örnekler 8 adet *T. Erinacei* ve 9 adet *Arthroderma* spp. olarak tanımlanmıştır. Baumbach ve ark. MALDI-TOF MS'in referans veri tabanını, tanımlanan bu türlerin spektralleri ile genişletmesinden sonra MALDI-TOF MS yöntemiyle kabul edilebilir tanımlama puanlamaları elde ettiklerini bildirmişlerdir.

Ülkemizde dermatofitlerin MALDI-TOF MS ile tanımlanmalarına ilişkin sınırlı sayıda yayın bulunmaktadır. Balıbay ve Tel (2021)'in Şanlıurfa ve çevresinde 100 sığırdan alınan dermatofit örnekleri üzerinde yaptıkları çalışmada, %63'lük kültür pozitifliği bulunmuşlar ve 100 örnekten 52 sini de *T. verrucosum* olarak tanımlamışlardır. Ayrıca bu dermatofit örneklerinin tamamını (%100) MALDI-TOF MS ile tanımlayarak doğrulamışlardır. Barış (2019)'ın İstanbul ve çevresinde yaptığı çalışmada, 138 dermatofit izolatın tamamı (%100) etanol-formik asit-asetonitril ekstraksiyon protokolü uygulanarak tanımlanmıştır.

Theill ve ark. (2011) yaptıkları çalışmada dermatofillerin tanımlanması için Bruker Biolytper MALDI-TOF MS'in performansını değerlendirmişlerdir. MALDI Biolytper kütüphanesi (MBL) ile ek 20 dermatofit spektrumunu içeren tanımlanmış bir kütüphaneyi (S-MBL) birlikte kullanmışlardır. Elde edilen spektrumları, hem üreticinin tavsiye ettiği skorlar (cins $\geq 1,7$; tür ≥ 2) hem de bu çalışma tarafından oluşturulan ayarlanmış eşik değerleri (cins $\geq 1,5$; tür $\geq 1,7$) kullanılarak yorumlamışlardır. Çalışmada, 171 dermatofit izolatının MALDI-TOF MS ile tanımlanmasında her iki kütüphane ve her iki limit skoru değerlendirilmiştir. S-MBL ayarlanmış eşik değerler kullanıldığında hem cins (%93'e karşı %34,4) hem de tür (%59,6 ya karşı %20,5) düzeyinde MBL'den önemli ölçüde daha iyi performans gösterdiğini ve düşürülmüş eşik değerlerin uygulanması yanlış tanımlamalara yol açmadan cins ve tür düzeyinde tanımlamayı artırdığını bildirmişlerdir.

Hedayati ve ark. (2019), moleküler yöntemle tanımlanan üç cins ve beş tür içeren 94 klinik izolattan, MALDI Biolytper sisteminde $\geq 2,0$ eşik puanı varsayılarak %47'sinin tanımlanabildiğini bildirmiştir. Barış (2019)'ın 138 dermatofit izolatıyla yaptığı çalışmada eşik skoru sırasıyla cins için $\geq 2,0$ ve tür için $\geq 1,7$ olarak kabul edildiğinde izolatların %38,4'ünü cins ve %82,6'sı tür düzeyinde tanımlamıştır.

Karabiçak ve ark. (2015) yaptıkları çalışmada, MALDI TOF MS sisteminin tanımlama kapasitesini arttırmak için 10 referans dermatofit suşuyla referans

kütüphaneyi destekleyici bir kütüphane oluşturmuşlardır. Oluşturulan veri tabanının performansını 126 dermatofit izolatı (115 klinik izolat ve 11 ek referans suş) ile analiz etmişler, sonuçları hem üretici tarafından önerilen hem de düşürülmüş eşik skorları ile değerlendirilmişlerdir. Bruker MALDI Biyotyper tarafından önerilen skorlarla değerlendirme yapıldığında tür düzeyinde %13,5, cins düzeyinde %89,7, düşürülmüş skorlarla değerlendirme yapıldığında tür düzeyinde %51,6 cins düzeyinde %96,8'lik bir doğrulama yüzdesi elde ettiklerini bildirmişlerdir.

Tez çalışmasında, 82 dermatofit izolatı Karabıçak ve ark. (2015)'nın çalışmasına benzer şekilde, hem üreticinin önerdiği tanımlama skorlarıyla hem de düşürülmüş tanımlama skorlarıyla değerlendirildi. Çalışmada MALDI-TOF MS tanımlama skorlarıyla tür düzeyinde tanımlama 12 suşla %14,6, cins düzeyinde 37 suşla %45,1 olarak saptandı. Düşürülmüş skorlar uygulandığında tür düzeyinde tanımlama 49 suşla %59,7, cins düzeyinde 71 suşla %86,5 olarak saptandı.

MALDI-TOF MS yöntemi, hızlı, doğru ve güvenilir bir yöntemdir. Dermatofitlerin laboratuvar tanısında yenilikçi bir adımdır. Konvansiyonel yöntemlerin uzun zaman tüketimi ve düşük özgüllük gibi dezavantajlarını ortadan kaldırır. Dakikalar içinde tür tanımlaması yapar. Dermatofit tanımlanmasındaki ana sınırlama, mevcut ticari MALDI-TOF MS tanımlama sistemlerinin referans spektrum kütüphanelerindeki dermatofit türlerinin yetersiz temsil edilmesidir. Kütüphanede bulunan spektrumların sayısı ve kalitesi, standart suşların spektrumlarının sistemdeki veri kütüphanesine eklenerek veri tabanlarındaki türlerin sayısı artırılabilir. Genişletilmiş kütüphanelerle yapılan tanımlama oranları ticari kütüphanelerle yapılan tanımlamalara göre oldukça yüksektir.

Antifungal duyarlılık testi uygulamalarının ana fonksiyonu, enfeksiyonun tedavisi için kullanılan ilacın klinik başarı sağlayabilme oranını önceden tahmin edebilmesidir. Antifungal duyarlılık testlerinin rutinde bu amaçla kullanılması önemli ve yararlıdır.

Tezde yer alan 50 adet dermatofit izolatının antifungal duyarlılık profilleri, CLSI M38-A3'e göre çalışıldı. Çalışmada yer alan 18 *T. rubrum* izolatının Amfoterisin B için MİK aralığı 0,25-1 µg/ml'dir. MİK₅₀ ve MİK₉₀ değeri 1 µg/ml olarak bulunmuştur. Yenişehirli ve ark. (2013) benzer şekilde Amforisin B için düşük MİK değerleri bulmuş, Altınbaş ve ark. (2019) ile Badali ve ark. (2015) farklı olarak Amfoterisin B için yüksek MİK aralıkları bildirmişlerdir.

Çalışmamızda *T. rubrum* suşlarının itrakonazol için MİK aralığı 0,015-0,125 µg/ml olarak saptandı. MİK₅₀ değeri 0,06 µg/ml ve MİK₉₀ değeri 0,125 µg/ml olarak saptandı. Altınbaş ve ark. (2019), Ansari ve ark (2015), Badali ve ark. (2015), Baghi ve ark. (2016), Dhaygude (2019), Maurya ve ark. (2019) ve Yenişehirli ve ark. (2013), çalışmamızla benzer şekilde itrakonazol için düşük MİK değerleri bildirmişler, buna karşın Afshari ve ark. (2016) itrakonazol için 0,03-16 µg/ml MİK aralığı ile çalışmamızdaki bulgulardan yüksek MİK değeri rapor etmişlerdir.

Tez kapsamında yapılan çalışmalarda, *T. rubrum* izolatlarında ketakonazol için MİK aralığını 0,015-0,5 µg/ml, MİK₅₀ değerini 0,06 µg/ml ve MİK₉₀ değerini 0,5 µg /ml olarak bulundu. Altınbaş ve ark. (2019) ile Maurya (2019) ve Yenişehirli ve ark. (2013)'nın yaptıkları çalışmalarda, ketakonazol için tez çalışmasına benzer şekilde düşük MİK aralıkları bildirilmiştir. Afshari ve ark. (2016) ve Dhaygude (2019)'nın çalışmalarında itrakonazol için MİK aralıklarını sırasıyla 0,03-8 µg/ml ve 0,03-16 µg/ml olmak üzere tez çalışmasında elde edilen değerlerden farklı olarak çok yüksek bulunmuştur.

Çalışmamızdaki *T. rubrum* suşlarında terbinafin için MİK aralığını <0,015-0,06 µg/ml, MİK₅₀ değeri 0,03 µg/ml ve MİK₉₀ değeri 0,06 µg/ml'dir. Altınbaş ve ark. (2019), Ansari ve ark. (2015), Badali ve ark. (2015), Baghi ve ark. (2016) ve Yenişehirli ve ark. (2013)'nın terbinafin için bizim çalışmamız gibi düşük MİK aralıkları rapor etmişlerdir. Yaptığımız çalışmadan farklı olarak Afshari ve ark. (2016) ve Maurya ve ark. (2019) ile terbinafin için yüksek MİK aralıkları ile

MİK₅₀ değeri 2 µg/ml ve MİK₉₀ değeri 4 µg/ml olan aynı yüksek MİK değerlerini bildirmişlerdir.

Çalışmamızda bulunan 24 adet *T. mentagrophytes* izolatına yapılan antifungal duyarlılık değerlendirmesinde Amfoterisin B için MİK aralığı 0,015-4 µg/ml'dir. MİK₅₀ değeri 1 µg/ml ve MİK₉₀ değeri 2 µg/ml olarak bulunmuştur. Yenişehirli ve ark. (2013), 49 adet *T. mentagrophytes* izolatıyla yaptıkları çalışmada Amfoterisin B için MİK aralığını 0,03-2 µg/ml, MİK₅₀ değerini 0,125 µg/ml ve MİK₉₀ değerini 0,5 µg/ml olarak rapor ederken, Badali ve ark. (2015) 13 adet *T. mentagrophytes* izolatında Amfoterisin B için MİK aralığını 0,03-2 µg/ml ve bizim çalışmamızla benzer şekilde MİK₅₀ değerini 1 µg/ml ve MİK₉₀ değerini 2 µg/ml bulmuşlardır. Khuruna ve ark. (2018), 64 adet *T. mentagrophytes* suşuyla yaptığı çalışmada Amfoterisin B için MİK aralığının 0,25-1 µg/ml olarak, MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerini 0,5 µg/ml olarak bulduklarını bildirmişlerdir.

Çalışmamızda *T. mentagrophytes* suşlarının itrakonazol için MİK aralığı <0,015-2 µg/ml'dir. MİK₅₀ değeri 0,06 µg/ml ve MİK₉₀ değeri 0,25 µg/ml olarak saptanmıştır. Shaw ve ark. (2020) 498 suşla yaptıkları çalışmadaki itrakonazol için antifungal duyarlılık değerlerini bizim çalışmamızla hemen hemen aynı (MİK aralığı <0,015-2 µg/ml, MİK₅₀ 0,06 µg/ml, MİK₉₀ 0,25 µg/ml) ve düşük bulurken, Badali ve ark. (2015) yaptığımız çalışmadan farklı olarak itrakonazol için yüksek MİK değerleri (MİK aralığı 0,5-16 µg/ml, MİK₅₀ 2 µg/ml, MİK₉₀ 16 µg/ml) bildirmiştir. Yine çalışmamızla benzer şekilde Adimi ve ark. (2013), Pathania ve ark. (2018) ve Yenişehirli ve ark. (2013)'nın yaptıkları çalışmada itrakonazol için düşük MİK değerleri bulmuşlardır.

Çalışılan *T. mentagrophytes* suşlarının ketokonazol için MİK aralığı 0,015-1 µg/ml, MİK₅₀ değeri 0,125 µg/ml ve MİK₉₀ değeri 0,5 µg/ml'dir. Sadeghi-Nejad ve ark. (2017), Shaw ve ark. (2020) ve Yenişehirli ve ark. (2013)'nin çalışmamıza paralel şekilde ketakonazol için düşük MİK değerleri bildirirken, çalışmamızla

aksi yönde Adimi ve ark. (2013) ketakonazol için yüksek MİK değerleri (MİK aralığı 0,0312-32 µg/ml, MİK₅₀ 2 µg/ml, MİK₉₀ 8 µg/ml) rapor etmişlerdir.

T. mentagrophytes suşlarında terbinafin için MİK aralığını <0,015-0,125 µg/ml, MİK₅₀ değeri 0,03 µg/ml ve MİK₉₀ değeri 0,06 µg/ml olarak bulduk. Bulduğumuz değerler, Ataide ve ark. (2012), Badali ve ark. (2015), Carrillo-Munoz ark. (2013), ve Yenişehirli ve ark. (2013)'nin yapmış oldukları çalışmalarla uyumludur. Bizim çalışmamızdan farklı olarak Adimi ve ark. (2013) ve Shaw ve ark. (2020) ve terbinafin için yüksek MİK aralıkları bildirmişlerdir.

Dhaygude (2019)'nin 35 dermatofit izolatıyla yaptığı antifungal duyarlılık çalışmasında *T. mentagrophytes* suşları için hem itrakonazol hem de ketakonazol için düşük MİK aralıkları bulunduğunu rapor etmiştir.

Maurya ve ark. (2019)'nin 31 adet *T. mentagrophytes* suşuyla yaptığı antifungal duyarlılık çalışmasında itrakonazolün MİK aralığını 0,03-0,25 µg/ml bulmuşlardır. Ketakonazol de itrakonazol gibi düşük MİK değerleri üretmişken terbinafin için 0,03-16 µg/ml arasında değişen daha yüksek MİK değerleri bildirmişlerdir.

Moreno-Sabater ve ark. (2022)'nin yaptıkları çok merkezli bir çalışmada terbinafin direnci olan bir *T. mentagrophytes* suşu bulduklarını bildirmişlerdir.

Çalışmamızda bulunan 8 adet *M. canis* suşunun antifungal duyarlılık değerlendirmesinde Amfoterisn B için MİK aralığı 0,25-1 µg/ml, MİK₅₀ değeri 0,5 µg/ml ve MİK₉₀ değeri 1 µg /ml'dir. Altınbaş ve ark. (2019) 9 adet *M. canis* suşuyla yaptıkları antifungal duyarlılık çalışmasında çalışmamızdaki MİK değerlerine benzer şekilde Amfoterisn B için MİK aralığını 0,25-2 µg/ml, MİK₅₀ değerini ve MİK₉₀ değerini 2 µg /ml olarak bulmuşlardır.

M. canis izolatlarının antifungal duyarlılık değerlendirmesinde itraconazol için MİK aralığını 0,015-0,25 µg/ml, MİK₅₀ değeri 0,03 µg/ml ve MİK₉₀ değeri 0,125 µg/ml olarak bulduk. Altınbaş ve ark. (2019), Ansari ve ark (2015), Baghi ve ark. (2016) ve Brilhante ve ark. (2005) çalışmamızla uyumlu şekilde itraconazol için düşük MİK değerleri bulmuşlardır. Afshari ve ark. (2016) itraconazol için MİK aralıkları 0,0313-16 µg/ml olan yüksek MİK değerlerini bildirmişlerdir.

M. canis suşlarının ketokonazol için MİK aralığı 0,015-0,5 µg/ml, MİK₅₀ değeri 0,06 µg/ml ve MİK₉₀ değeri 0,25 µg/ml'dir. Altınbaş ve ark. (2019), yaptıkları çalışmada ketakonazolün MİK aralıklarını itraconazolle aynı değerde bulmuşlardır. Brilhante ve ark. (2005) ise ketakonazolün MİK sonuçlarını çalışmamıza benzer şekilde düşük bulduklarını bildirmişlerdir. Afshari ve ark. (2016) ketakonazolün MİK aralıklarını, MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerini itraconazolle aynı ve bizim çalışmamıza oran yüksek bulmuşlardır.

M. canis suşlarında terbinafin için MİK aralığını <0,015-0,03 µg/ml, MİK₅₀ değeri 0,015 µg/ml ve MİK₉₀ değeri 0,03 µg/ml olarak bulduk. Ansari ve ark. (2015) çalışmamızla uyumlu olarak terbinafinin MİK aralığını <0,02-0,06 µg/ml, MİK₅₀ değeri 0,008 µg/ml ve MİK₉₀ değeri 0,03 µg/ml olarak bulduklarını bildirmişlerdir. Altınbaş ve ark. (2019) ve Baghi ve ark. (2016) terbinafin için düşük MİK değerleri rapor etmişlerdir. Afshari ve ark. (2016) terbinafin için bizim çalışmamıza göre yüksek MİK aralığı (0,03-16 µg/ml) bildirmişlerdir.

Aneke ve ark. (2021), insan ve hayvanlardan izole ettikleri 100 adet *M. canis* suşunun antifungal duyarlılıklarını incelemişlerdir. İtraconazol için MİK aralığını 0,03-8 µg/ml, MİK₅₀ değerini 1 µg/ml ve MİK₉₀ değerini 4 µg/ml, Ketokonazol için MİK aralığını 0,08-4 µg/ml, MİK₅₀ değerini 0,5 µg/ml ve MİK₉₀ değerini 1µg/ml, Terbinafin için MİK aralığını 0,08-0,5µg/ml, MİK₅₀ değerini 0,03 µg/ml ve MİK₉₀ değerini 0,25 µg/ml bulmuşlar ve terbinafinin en yüksek antifungal aktiviteye sahip olduğunu ve tedavide en etkili seçenek olduğunu bildirmişlerdir.

Dermatofitler için antifungal duyarlılık testlerinin yapılması, uygun tedavi seçimi ve direnç gelişiminin takibi bakımından önem arz etmektedir.



5. SONUÇ VE ÖNERİLER

- Bu çalışmada 15 adet *M. canis*, 23 adet *T. mentagrophytes* ve 45 adet *T. rubrum* olmak üzere 82 dermatofit suşu hem konvansiyonel yöntemlerle hem de MALDI-TOF MS yöntemiyle tanımlanmıştır.
- Dermatofit tanımlanmasında geleneksel yöntemlerle MALDI-TOF MS yöntemi karşılaştırılmıştır.
- Dermatofitlerin tanımlanmasındaki konvansiyonel yöntemler, zahmetli ve zaman alıcı olup tecrübe gerektirir.
- Matris destekli lazer desorpsiyon/iyonizasyon uçuş süresi kütle spektrometrisi (MALDI-TOF MS) hızlı, güvenilir ve yenilikçi bir teknolojidir. Dakikalar içinde tür tanımlaması yapar. Çalışma sonucu dermatofitlerin hızlı ve güvenilir tanımlanması için MALDI-TOF MS sisteminin önemli ve yararlı olduğu görülmüştür. Kültür yöntemi halen altın standart olmasına rağmen MALDI-TOF MS sistemi konvansiyonel yöntemlerin oldukça faydalı bir tamamlayıcısıdır.
- MALDI-TOF MS yöntemindeki esas sınırlama, ticari tanımlama sistemlerinin referans spektrum kütüphanelerindeki dermatofit türlerinin yetersiz temsil edilmesidir. Kütüphanede bulunan spektrumların sayısı ve kalitesi, standart suşların spektrumlarının sistemdeki veri kütüphanesine eklenerek veri tabanlarındaki türlerin sayısı artırılabilir. Genişletilmiş kütüphanelerle yapılan tanımlama oranları ticari kütüphanelerle yapılan tanımlamalara göre oldukça yüksektir.
- Çalışmamızda dermatofitlerin tür düzeyinde tanımlama 12 suşla, %14,6 oranında, cins düzeyinde 37 suşla %45,1'dir. MALDI TOF MS yönteminde

izolatların tür düzeyinde tanımlanmasında ≥ 2 'den $\geq 1,7$ 'ye düşürüldüğünde 49 suşla %59,7, cins düzeyinde tanımlama $\geq 1,7$ 'den $\geq 1,5$ 'e düşürüldüğünde %86,5 olmaktadır.

- Üretici tarafından önerilen spektral eşik puanlarının kullanılması, cins ve tür seviyelerinde mantarların nispeten zayıf tanımlanmasına neden olur. MALDI-TOF MS eşik puan değerinin tür düzeyinde tanımlama için 2,0'dan 1,7'ye, cins düzeyinde tanımlama için 1,7'den 1,5'e düşürülmesi tanımlama oranlarını önemli ölçüde artıracığı düşünülmektedir.
- Çalışmamızda 8 adet *M. canis*, 24 adet *T. mentagrophytes* ve 18 adet *T. rubrum* olmak üzere 50 dermatofit izolatının amfoterisin B, itrakonazol, ketakonazol ve terbinafin için antifungal duyarlılık testi sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle çalışılmıştır.
- Dermatofit izolatlarının tümünün antifungal duyarlılık sonuçları CLSI M38-A3'de bildirilen sonuçlarla uyumlu ve düşük bulunmuştur.
- Çalışmamızda dirençli suşa rastlanmamıştır.
- Terbinafin çalışılan tüm dermatofit türleri için antifungal duyarlılıkta en uygun seçenek olarak bulunmuştur.

ÖZET

Dermatofitlerin Konvansiyonel ve MALDI-TOF Yöntemleriyle Tanımlanmaları ve Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemi ile Antifungal Duyarlılık Profilleri

Dermatofitler, insan ve hayvanlarda deri, tırnak ve kılların stratum corneum tabakasına yerleşerek yüzeysel keratinize dokularını infekte eden küf mantarlarıdır. Dermatofitlerin tür düzeyinde identifikasyonları konvansiyonel yöntemlerle yapılmaktadır. Dermatofitlerin tanımlanmalarında kullanılan klasik mikolojik yöntemler olan morfolojik ve fizyolojik testler uzun zaman almaktadır. Matriks Aracılı Lazer Desorbsiyon İyonizasyon Uçuş Zamanı Kütle Spektrometresi (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of Flight Mass Spectrometry, MALDI-TOF MS) mikroorganizmaların tanımlanmasında kullanılan hızlı ve yeni bir yöntemdir. Antifungal duyarlılık testleri ise bir antifungal ajanın belli bir mantar türüne karşı *in-vitro* etkinliğini saptamak amacıyla uygulanmaktadır. Bu tez çalışmasında, dermatofitlerin geleneksel yöntemler ve MALDI-TOF MS yöntemiyle identifikasyonu ve antifungal duyarlılık profillerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

Bu kapsamda incelenen 82 dermatofit izolatının konvansiyonel tanımlaması yapılmıştır. 15 adet *M. canis*, 23 adet *T. mentagrophytes* ve 45 adet *T. rubrum* kökeni yeniden identifiye edilmiştir ve bu dermatofit izolatlarının tümü MALDI-TOF MS yöntemiyle de doğrulanmıştır. Ayrıca 50 dermatofit suşunun sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle CLSI M38-A3'e göre amfoterisin B, itrakonazol, ketokonazol ve terbinafin için antifungal duyarlılıkları incelenmiştir. Antifungal duyarlılık çalışması yapılan 8 adet *M. canis* suşunun MİK aralıkları Amfoterisin B için 0,25-1, Itrakonazol için 0,015-0,25, Ketokonazol için 0,015-0,5 ve Terbinafin için <0,015-0,03, 24 adet *T. mentagrophytes* suşunun MİK aralıkları Amfoterisin B için 0,015-4, Itrakonazol için <0,015-2, Ketokonazol için 0,015-1 ve Terbinafin için <0,015-0,125 18 adet *T. rubrum* suşunun MİK aralıkları Amfoterisin B için 0,25-1 Itrakonazol için 0,015-0,125, Ketokonazol için 0,015-0,5 ve Terbinafin için <0,015-0,06 olarak bulunmuştur.

Klinik tanı açısından önemli ve yenilikçi bir teknoloji olan MALDI-TOF MS yöntemi, dermatofitlerin rutin laboratuarlarda hızlı ve doğru tanımlanmaları için konvansiyonel yöntemlerle birlikte kullanılmalıdır.

Anahtar Sözcükler: Antifungal Duyarlılık Testleri, Dermatofit, Konvansiyonel yöntemler, MALDI-TOF MS.

SUMMARY

Identification of Dermatophytes by Conventional and MALDI-TOF Methods and Antifungal Susceptibility Profiles by Liquid Microdilution Method

Dermatophytes are mold fungi that settle in the stratum corneum layer of the skin, nails and hair of humans and animals and infect the superficial keratinized tissues. Identification of dermatophytes at the species level is done by conventional methods. Morphological and physiological tests, which are classical mycological methods used in the identification of dermatophytes, take a long time. MALDI-TOF MS (Matrix assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry) is a new and fast method for identification of microorganisms. Antifungal susceptibility tests are conducted to determine the in-vitro efficacy of an antifungal agent against a particular fungal strain. In this thesis, it is aimed to identify dermatophytes by traditional methods and MALDI-TOF MS method and to examine their antifungal susceptibility profiles.

In this context, conventional identification of 82 dermatophyte isolates examined was made. 15 *M. canis*, 23 *T. mentagrophytes* and 45 *T. rubrum* strains were reidentified and all of these dermatophyte isolates were also confirmed by MALDI-TOF MS method. In addition, antifungal susceptibilities of 50 dermatophyte strains were investigated for Amphotericin B, itraconazole, ketoconazole and terbinafine according to CLSI M38-A3 by broth microdilution method. MIC ranges of 8 *M. canis* strains for which antifungal susceptibility studies were performed, 0.25-1 for Amphotericin B, 0.015-0.25 for Itraconazole, 0.015-0.5 for Ketoconazole and <0.015-0.03 for Terbinafine, MIC ranges of 24 *T. mentagrophytes* strains 0.015 for Amphotericin B -4, MIC ranges of <0.015-2 for Itraconazole, 0.015-1 for Ketoconazole and <0.015-0.12518 for Terbinafine strains of *T. rubrum* 0.25-1 for Amphotericin B 0.015-0.125 for Itraconazole, 0.015-0.5 for Ketoconazole and <0.05 for Terbinafine It was found to be 0.015-0.06.

The MALDI-TOF MS method, which is an important and innovative technology in terms of clinical diagnosis, should be used together with conventional methods for rapid and accurate identification of dermatophytes in routine laboratories.

Keywords: Antifungal Susceptibility Tests, Conventional methods, Dermatophyte, MALDI-TOF MS,

KAYNAKLAR

- ABOUL-ELLA HA, HAMEDB R, ABO-ELYAZEED H (2020). Recent trends in rapid diagnostic techniques for dermatophytosis. *Int J Vet Sci Med* **8**: 115–123.
- ADİMİ P, HASHEMİ SJ, MAHMOUDİ M, MİRHENDİ H, SHİDFAR MR, EMMAMİ M, REZAEİMATEHKOLAEİ A, GRAMİSHOAR M, PARİVASH KORDBACHEH P (2013). Invitro activity of 10 antifungal agents against 320 dermatophyte strains using microdilution method in Tehran. *Iran J Pharm Res*, **12**: 537-545.
- AFSHARİ MA, SHAMS-GHAHFAROKHİ M, RAZZAGHİ-ABYANEH M (2016). Antifungal susceptibility and virulence factors of clinically isolated dermatophytes in Tehran, Iran. *Iran J Microbiol*, **8**: 36-46.
- AL JANABİ AAHS, AL-KHİKANİ (2020). Dermatophytoses: a short definition, patogenesis and treatment. *International J Healt&Allied Sciences*, **9**: 210-214.
- AL-ANİ FK, YOUNES FA, AL-RAWASHDEH OF (2002). Ringworm infection in cattle and horses in Jordan. *Act Vet Brno*, **71**: 55-60.
- ALMUZAINİ AM, SALAM AO, SAEED EMA (2015). An outbreak of dermatophytes in camel (*Camelus dromedarius*) at qassim region, Central of Saudi Arabia. *Int J Appl Res Vet Med* **44**:126-129.
- ALSHAWA K, BERETTİ JL, LACROİX C, FEULHADE M, DAUPHİN B, QESNE G, HASSOUNİ N, NASSİF X, BOUGNOUX ME (2012). Successful identification of clinical dermatophyte and *Neoscytalidium* species by matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry., *J Clin Microbiol* **50**: 2277-2281.
- ALTINBAŞ R, ÖZAKKAŞ F, BARIŞ A, TURAN D, ŞEN S (2019). In-vitro susceptibility of seven antifungal agents against dermatophytes isolated in İstanbul. *Turk J Med Sci*, **48**: 615-619.
- ANEKE CI, OTRANTO D, CAFARCHİA C (2018). Therapy and antifungal susceptibility profile of *Microsporum canis*. *J Fungi*, **4**:107.
- ANEKE CI, RHİMİ W, HUBKA V, OTRANTO D, CAFARCHİA C (2021). Virulence and antifungal susceptibility of *Microsporum canis* strains from animals and humans *Antibiotics*, **10**(3):296.
- ANHALT JP, FENSELAU C (1975). Identification of bacteria using mass spectrometry. *Anal Chem*, **47**: 219-25.
- ANSARI S, HEDAYATI MT, ZOMORODIAN K, PAKSHIR K, BADALI H, RAFIEI A, RAVANDEH M, SEYEDMOUSAVI S (2016). Molecular

- characterization and in-vitro antifungal susceptibility of 316 clinical isolates of dermatophytes in Iran. *Mycopathologia*, **181**: 89-95.
- ARDA M (2015). Temel Mikrobiyoloji. Medisan Yayınevi, Ankara. Argos; 11-22.
- ARIKAN AKDAĞLI (2021). Antifungal Duyarlılık Testleri. Tıbbi Mikoloji Kitabı Ed. Tümbay E. Tıbbi Mikoloji Derneği yayını No.2.s:599-609.
- ASAWANONDA P, TAYLOR CR (1999). Wood's light in dermatology. *Int J Dermatol.***38**(11):801-7.
- ASZ-SIGALL D, TOSTI A, ARENAS R. (2016). Tinea Unguium: Diagnosis and Treatment in Practice. *Mycopathologia*, **182**: 95–100.
- ATAIDES FS, CHAUL MH, EL ESSAL FE, COSTA CR, SOUZA LKH, FERNANDES OFL, SILVA M (2012). Antifungal susceptibility patterns of yeasts and filamentous fungi isolated from nail infection. *J Eur Acad Dermatology Venereol*, **26**: 1479 –1485.
- ATEŞ A (2007). *Trichophyton rubrum*'un *Trichophyton mentagrophytes*'ten Ayırt Edilmesinde Kullanılan Tanı Testlerinin Karşılaştırılması, Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Adana
- BADALI H, MOHAMMADI R, MASHEDI O, DE HOOG GS, MEIS JF (2015). In-vitro susceptibility patterns of clinically important *Trichophyton* and *Epidermophyton* species against nine antifungal drugs. *Mycoses*, **58**: 303-307.
- BAGHI N, SHOKOHI T, BADALI H, ABASTABAR M (2016). In-vitro activity of new azoles luliconazole and lanconazole compared with ten other antifungal drugs against clinical dermatophyte isolates. *Med Mycol*, **54**: 757-763.
- BALIBAY Ö, TEL OY (2021). Sığırlardan *Trichophyton verrucosum*'un kültür ve MALDI-TOF MS yöntemleri ile identifikasyonu. *Dicle Üniv Vet Fak Derg*, **14**: 43-47.
- BARIŞ A (2021). Identification of dermatophytosis agents by matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry. *Eurasian Journal of Medicine and Investigation*, **5**: 354-359.
- BAUMBACH CM, REUSCHEL M (2021) Identification of zoophilic dermatophytes using MALDI-TOF mass spectrometry. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, **11**: 631681.
- BAYKAL C (2004). Yüzeyel mantar hastalıkları, Dermatoloji Atlası. 2. Baskı. İstanbul: Argos; 11-22.
- BERNARDO F, GUERRA A, MARTINS H. (2005) Dermatophytes isolated from pet, dogs and cats, in Lisbon, Portugal (2000-2004). *Rev. Port. Cienc. Vet.*, **100**: 85-88.

- BIYIK F (2008). Dermatofitlerin İdentifikasyonunda Moleküler Yöntemlerin Yeri ve Uygulanabilirliğinin Belirlenmesi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul.
- BİLGİN CT (2019). Pozitif Kan Kültürlerinde Maldı-Tof Töntemi Kullanılarak Hızlı Bakteri Maya İdentifikasyonu. İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Lisansüstü Eğitim Enstitüsü.
- BİZZİNİ A, JATON K, ROMO D, BİLLE J, PROD'HOM G, GREUB G. (2011). Matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry as an alternative to 16S rRNA gene sequencing for identification of difficult-to-identify bacterial strains. *J Clin Microbiol*, **49**: 693-696.
- BORAL H, DURDU M, İLKİT M (2018). Majocchi's granuloma: current perspectives. *Infection and Drug Resistance*, **11**: 751–760.
- BRASCH, J (2014). Diagnosis of Dermatophytosis. *Curr Fungal Infect Rep*, **8**: 198–202.
- BRILHANTE RSH, CORDEIRO RA, MEDRANO DJA, MONTEIRO AJ, SİDRİM JC, ROCHA MFG (2005). Antifungal susceptibility and genotypical pattern of *Microsporum canis* strains. *Can J Microbiol*, **51**: 507-10.
- CALDERARO A, MOTTA F, MONTECCHINI S, GORRINI C, PICCOLO G, PIERGIANNI M, BUTTRINI M, MEDICI MC, ARCANGELETTI MC, CHEZZI C, DE CONTO F (2014). Identification of dermatophyte species after implementation of the in-house MALDI-TOF MS database. *International Journal of Molecular Sciences*, **15**: 16012-16024
- CARBONNELLE E, BERETTI JL, COTTYN S (2007). Rapid identification of staphylococci isolated in clinical microbiology laboratories by matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol*, **45**: 2156–61.
- CARRILLO-MUÑOZ AJ, TUR-TUR C, CÁRDENES D, ROJAS F, GIUSIANO G (2012). Sertaconazole antifungal profile determined by a microdilution method versus nine topical substances against dermatophyte fungi. *Chemotherapy*, **58**: 399-404.
- CASSANGE C, NORMAND AC, L'OLLIVIER C, RANQUE S, PIARROUX R (2016). Performance of MALDI-TOF MS platforms for fungal identification. *Mycoses*, **59**: 678-690
- CERVANTES-OLIVARES RA (2003). Ringworm infection in dogs and cats. In: Recent Advances in Canine Infectious Diseases. Ed. Carmichael.L. Ithaca, Newyork: International Veterinary Information Service.
- CHALUPOVA J, RAUS M, SEDLAROVA M, SEBELA M (2014). Identification of

- fungus microorganisms by MALDI-TOF mass spectrometry. *Biotechnol Adv*, **32**: 230-241.
- CHERMETTE R, FERREIRO L, GUILLOT J (2008) Dermatophytoses in animals. *Mycopathologia*, **166**: 385-405.
- CLARK AE, KALETA EJ, ARORA A, WOLK DM. (2013). Matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry: A fundamental shift in the routine practice of clinical microbiology. *Clin Microbiol Rev*, **26**: 547-603.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (2017). Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi, 3rd ed.; CLSI Standard M38; Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI): Wayne, PA, USA.
- COURTELLEMONT, L.,CHEVRIER S,DEGEH B, BEHZ B (2017).Epidemiology of Trichophyton verrucosum infection in Rennes University Hospital, France: a 12 year retrospective study. *Medical Mycology*.1:1-5
- ÇUHADAR, D (2019). Matriks Aracılı Lazer Dezorbsiyon İyonizasyon Uçuş Zamanı Kütle Spektrometresi (MALDI TOF-TOF İle Tıbbi Önemi Olan Maya Mantarlarının Tanımlanması, Yüksek Lisans Tezi. Necmettin Erbakan Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı,Konya.
- DA CUNHA KC, RIAT A, NORMAND AC, BOSSHARD PP, DE ALMEIDA MTG, PIARROUX R, SCHERENZEL J, FONTAO L (2018). Fast identification of dermatophytes by MALDI-TOF/MS using direct transfer of fungal cells on ground steel target plates. *Mycoses*, **61**: 691-697.
- DE HOOG GS, DUKIK K, MONOD M, PACKEU A, STUBBE D, HENDRICKX M, KUPSCH C, STEILOW JB, FREEKE J, GOKER M, MATEHKOLAI AR, MIRHENDI H, GRASER Y (2017). Toward a novel multilocus phylogenetic taxonomy for the dermatophytes. *Mycopathologia*, **182**: 5–31.
- DE RESPINIS S, MONNIN V, GIRARD V, WALKER M, ARSAC M, CELLIERE B, DURAND G, BOSSHARD PP, FARINA C, PASSERA M, BELKUM AV, PETRINI O, TONALLA M (2014). Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight (MALDITOF) Mass Spectrometry using the Vitek MS system for rapid and accurate identification of dermatophytes on solid cultures. *J Clin Microbiol*, **52**: 4286-4292.
- DEBNATH C, MITRA T, KUMAR A, SAMANTA I. (2015). Detection of dermatophytes in healthy companion dogs and cats in eastern India. *Iran. J. Vet. Res.*, **17**: 20-24.
- DEGREEF H (2008). Clinical forms of dermatophytosis (ringworm infection. *Mycopathologia*, **166**: 257-65.

- DERİNCEGÖZ Z (2016). Kedi ve Köpeklerde deri Lezyonlarından Dermatofit Etkenlerinin İzolasyonu. Adnan Menderes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Aydın.
- DHAYAGUDE SV (2019). Antifungal susceptibility testing for dermatophytes isolated from clinical samples by microbroth dilution method. *International Journal of research in Medical Sciences*, **7**:1842-1845.
- DI MATTIA, FONDATI A, MONACO M, PASQUETTI M, PEANO A (2019). Comparison of two inoculation methods for *Microsporum canis* culture using the toothbrush sampling technique *Vet Dermatol*, **30**: 60.
- DREVINEK M, DRESLER J, KLIMENTOVA J, PISA L, HUBALEK M (2012). Evaluation of sample preparation methods for MALDI-TOF MS identification of highly dangerous bacteria. *Lett Appl Microbiol*, **55**: 40-46.
- EDWARDS JE (2010). *Candida* Species. In: Mandell, G. L., Bennett, J. E., Dolin, R. *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*. Vol 2, 7th edn. Churchill Livingstone: Philadelphia 3225-3241.
- EIGNER U, HOLFELDER M, OBERDORFER K, BETZ-WILD U, BERTSCH D, FAHR AM (2009). Performance of a matrix assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry system for the identification of bacterial isolates in the clinical routine laboratory. *Clin Lab*, **55**: 289-96.
- ELY JW, ROSENFELD S, STONE MS (2014). Diagnosis and management of tinea infections. *Am Fam Physician*, **90**: 702-10.
- ERBAĞCI Z (1999). Dermatofit enfeksiyonlarının immunopatogenezi ve kronik dermatofitozlar. *Türkderm*, **33**: 213-219.
- ERBAKAN N (1989). Derinin mantar hastalıkları. Ankara: Türkiye Klinikleri Yayınevi, 1-85.
- ERHARD M, HIPLER UC, BURMESTER A, BRAKHAGE AA, WOSTEMEYER J (2008). Identification of dermatophyte species causing onychomycosis and tinea pedis by MALDI-TOF mass spectrometry. *Experimental Dermatology*, **17**: 356-361.
- FETİL E, GÜNEŞ AT (1999). Dermatomikozlarda İmmünopatogenezi. İçinde Tümbay E, İnci R, Hilmioğlu S, Aydemir Ş (editörler). 1. Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikoloji Kongresi. İzmir: Ege Üniversitesi Basımevi, **36**; 97-103.
- FRYMUS T, GRUFFYDD-JONES T, PENNISI MG, ADDIE D, BELAK S, BOUCRAUT-BARALON C, EGBERİNK H, HARTMANN K, HOSIE MJ, LLORET A, LUTZ H, MARSILIO F, MOSTL K, RADFORD AD, THIRY E, TRUYEN U, HORNIZEK, MCD. (2013) Dermatophytosis in cats: ABDC guidelines on prevention and management. *J. Feline Med. Surg.*, **15**: 598-604.

- GALLUPPI R, LEVEQUE JFC, BEGHELLI V, BONOLI C, MATTIOLI M, OSTANELLO F, TAMPIERI MP, ACCORSI PA. (2013) Cortisol levels in cats, hair in presence or absence of *Microsporum canis* infection. *Res. Vet. Sci.*, **95**: 1076-1080.
- GANGULY S, SHARMA V (2017) Dermatophytosis in animals: an overview, *Pharmaceutical and Biological Evaluations*, **4**: 66-67
- GETSO MI, HASHEMIA SJ, GHAZVINIA RD, YUSUF SM, KHODAVAISYA S, GERAMI-SHOARA F, KIBIYAC S, ALIYUD UT, SARVESTANIA HK, ALIYU M (2021). Determination of dermatophytes isolated from tinea capitis using conventional and ITS-based sequencing methods in Kano, Nigeria. *Journal of Medical Mycology*, **31**: 1157.
- GNAT S, LAGOWSKI D, NOWAKIEWICZ A, DYŁĄG M, OSIŃSKA M, SAWICKI M (2021). Detection and identification of dermatophytes based on currently available methods – a comparative study. Detection and identification of dermatophytes. *Journal of Applied Microbiology*, **130**: 278-291.
- GÖZÜBÖYÜK SG (2013). Erzurum ve Çevresinden izole edilen Dermatofitler Üzerine Kınanın (*Lawsonia inermis*) Antifungal Aktivitesinin Araştırılması. Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı Uzmanlık Tezi. Erzurum.
- GRASER Y, MONOD M, BOUCHARA JP, DUKIK K, NENOFF P, KARGL A, KUPSCH C, ZHAN P, PACKEU A, CHATURVEDI V, DE HOOG S (2018). New insights in dermatophyte research. *Med Mycol*, **56**: 2-9.
- GREER DL (1994). An overview of common dermatophytes. *J Am Acad Dermatol*, **31**: 112-116.
- GÜL Ü (2014) Superficial Dermatophyte Infections *Ankara Med J*, **14**:107-113.
- HAGGAG, YN, SAMAHA A, NOSSAIR, MA, ABD EL RASOUL MMH (2017). Prevalence of dermatophytosis in some animals and human in Behera Province, Egypt. *Alexandria Journal for Veterinary Sciences*, **53**: 64-71.
- HAINER B (2003). Dermatophyte infections. *Annals of medicine*, **67**:101-10.
- HAMADA MD, MOHAMEDA ME, EL-BLKEMYA FA, ABOUZEIDA NZ, TARTORB YH (2019). Clinical and laboratory studies on equine dermatophytosis. *Benha Veterinary Medical Journal*, **6**: 23-31.
- HAY RJ (1992). Fungal skin infections. *Arch Dis Child*, **67**: 1065-1067.
- HEDAYATI MT, ANSARI S, AHMADI B, TAGHIZADEH ARMAKI M, SHOKOHI T, ABASTABAR M (2019). Identification of clinical dermatophyte isolates obtained from Iran by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Curr Med Mycol*, **5**: 22-6.

- HERNANDEZ-BURES A, PIEPER JB, BIDOT AW, O'DELL M, SANDER WE, MADDOX WC (2021). Survey of dermatophytes in stray dogs and cats with and without skin lesions in Puerto Rico and confirmed with MALDI-TOF MS. *PLoS One*, **16**: e0257514.
- ILHAN Z, KARACA M, EKIN IH, SOLMAZ H, AKKAN HA, TUTUNCU M (2016). Detection of seasonal asymptomatic dermatophytes in Van cats, *Brazilian Journal of Microbiology*, **47**: 225-230.
- INDARJULIANTO S, YANUARTONO-WIDYARINI S, RAHARJO S, PURNAMANINGSIH H, NURURROZI A, HARIWIBOWO N, JAINUDIN HA. (2017) *Microsporum canis* infection in dermatitis cats. *J. Vet.*, **18**: 207-210.
- INTRA J, SARTO C, TIBERTI N, BESANA S, SAVARINO C, BRAMBILLA P (2018). Genus-level identification of dermatophytes by MALDI-TOF MS after 2 days of colony growth. *Letters in Applied Microbiology*, **67**: 136-143.
- İLKİT M (2010). Yüzeyel ve Kutanöz Mikozlar. İçinde: Tıbbi Mikrobiyoloji, Başustaoglu AC, (editör). Medical Microbiology, Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. 6. Baskı, Ankara, Atlas Kitapçılık. 718-724.
- İLKİT M (2021). Dermatofitozlar. Tıbbi Mikoloji Kitabı Ed. Tümbay E. Tıbbi Mikoloji Derneği yayını No.2.s:157-187.
- İLKİT M, DURDU M (2015). Tinea pedis: The etiology and global epidemiology of a common fungal infection, *Critical Reviews in Microbiology*, **41**: 3, 374-388.
- İNCİ R (2021). Antifungal İlaçlar. Tıbbi Mikoloji Kitabı Ed. Tümbay E. Tıbbi Mikoloji Derneği yayını No.2.s:111-127.
- JARTARKAR SR, PATIL A, GOLDUST Y, COCKERELL CL, SCHWARTZ AR, GRABBE S, GOLDUST M (2022). Pathogenesis, immunology and management of dermatophytosis. *Journal of Fungi*, **8**: 39.
- KARABICAK N, KARATUNA O, İLKİT M (2015). Evaluation of Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionization Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) system for the identification of clinically important dermatophyte species. *Mycopathologia*, **180**: 165-171.
- KAYAALP O (1998). Antifungal Antibiyotikler ve Diğer Antifungal İlaçlar, Tıbbi Farmakoloji. 8.baskı. Hacettepe Taş Kitapevi, Ankara, s: 293.
- KHALID M (2019). Laboratory diagnosis of the causative dermatophytes of tinea capitis. *World Journal of Pharmaceutical Research*, **8**: 85-99.
- KHURANA A, MASI H A, CHOWDHARY A, SARDANA K, BORKER S, GUPTA A, GAUTAM RK, SHARMA PK, JAIN D (2018). Correlation of in-vitro susceptibility based on MICs and squalene epoxidase mutations with clinical response to terbinafine in patients with tinea corporis/cruris. *Antimicrob Agents*

Chemother, **62**: e01038-18.

- KONDORI N, ABRAHAMSSON AL, ATAOLLAHY N, WENNER C. (2010). Comparison of a new commercial test, DermatophytePCR kit, with conventional methods for rapid detection and identification of *Trichophyton rubrum* in nail specimens. *Medical Mycology*, **48**: 1005–1008.
- KONEMAN EW, ALLEN SD, JANDA W, SCHRECKENBERGER P, WINN WC (1997). Diagnostic microbiology. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 253-320.
- KOWITWANICHKANONT T, ALVIN HC (2019). Superficial infections. *Australian Journal of General Practice*, **48**: 708-711.
- KUSTİMUR S (2004), Dermatofitlerin patogenezi ve virulans faktörleri. 2. Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikoloji Sempozyumu: Dermatomikoz Etkenleri ve Dermatomikozlar, Kayseri.
- KWON-CHUNG KJ, BENNET JE (1992). *Medical Mycology*. Philadelphia, London: Lea&Febiger.
- L'OLLIVIER C, CASSAGNE C, NORMAND C, BOULHARA JP, AUDONNEAU NC, HENDRICKX M, FOURQUET P, COULIBALY O, PIARROUX R, RANQUE S (2013). A MALDI-ToF MS procedure for clinical dermatophyte species identification in the routine laboratory. *Medical Mycology*, **51**: 713-720.
- L'OLLIVIER C, RANQUE S (2017). MALDI-TOF-MS based dermatophyte identification. *Mycopathologia*, **182**: 183-192.
- LARONE DH (2011). Medically Important Fungi. A Guide to Identification. 5th Edition. Washington: ASM Press, 245-268.
- LEUNG AKC, LEONG FF, LAM JM (2019). Tinea imbricata: an overview. *Current Pediatric Reviews*, **15**: 170-174.
- MACURA AB (1993). Dermatophyte infections. *Int J Dermatol*, **32**: 313-323.
- MARTINEZ-ROSSI MN, PERES NTA, ROSSI A (2017). Pathogenesis of dermatophytosis: sensing the host tissue. *Mycopathologia*, **182**: 215-227.
- MARVIN LF, ROBERTS MA, FAYA LB (2003). Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry in clinical chemistry. *Clin Chim Acta*, **337**: 11–21.
- MASRI-FRIDLING GD (1996). Dermatophytosis of the feet. *Dermatologic Clinics*, **14**: 33-40.
- MATTEI AS, BEBER MA, MADRID IM (2014). Dermatophytosis in small animals. *SOJ Microbiol Infect Dis*, **2**: 1-6.

- MAURY VK, KACHHWAHA D, BORA A, KHATRI PK, RATHORE L (2019). Determination of antifungal minimum inhibitory concentration and its clinical correlation among treatment failure cases of dermatophytosis. **8**: 2577-2581.
- MCVEY DS, KENNEDY M, CHENGAPPA MM (2013) Veterinary Microbiology, 3rd ed., John Wiley & Sons.
- MELİKOĞLU M (2009). Dermatofitoz Tanılı Hastalarda Dermatofit Etkenlerinin Araştırılması. Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Dermatoloji Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi, Erzurum.
- MORENO SABATER A, NORMAND AC, BIDAUD AL, CREMER G, FOULET F, BRUN S, BONNAL C, AMMAR N, JABET A, AYACI A, PIARRROUX R. (2022). Terbinafine resistance in dermatophytes: a French multicenter prospective study. *Journal of Fungi*, **8**: 220.
- MORETTI A, AGNETTI F, MANCIANTI F, NARDONI S, RIGHI C, MORETTA I (2013). Epidemiological, clinical and zoonotic aspects. *G Ital Dermatol Venereol*, **148**: 563-72.
- MORIELLO KA (1990). Management of dermatophyte infections in catteries and multiple-cat households. *Small. Anim. Pract*, **20**: 1457-1474.
- MORIELLO KA, COYNER K, PATERSON S, MIGNON B (2017). Diagnosis and treatment of dermatophytosis in dogs and cats. *Veterinary Dermatology*, **28**: 266-268.
- MURRAY PR, ROSENTHAL KS, PFALLER MA (2015). Medical microbiology. In: Murray PR, Editor. Bacteriology. 8th ed. Philadelphia: Elsevier Health Sciences; p. 106-348.
- NEGRONI R (2010). Historical aspect of dermatomycoses. *Clinics in Dermatology*, **28**: 125-132.
- NELSON M M, MARTIN AN, HEFFERNAN MP (2003). Superficial fungal infections: Dermatophytosis, Onychomycosis, Tinea Nigra, Piedra. In: Fitzpatrick's Dermatology In General Medicine. McGraw-Hill Companies, 1807- 1821.
- NENOFF P, ERHARD M, SIMON JC, MUYLOWAS GK, HERMANN J, RATAJ W, GRASER Y (2013). MALDI-TOF mass spectrometry- a rapid method for identification of dermatophyte species. *Medical Mycology*, **51**:17-24.
- NIEWERTH M, KORTING HC (2000). The use of systemic antimycotics in dermatotherapy. *Eur J Dermatol*, **10**: 155–160.
- NOBLE S, FORBES RC, STAMM L (1998). Diagnosis And Management of common tinea infections. *Am. Fam. Physician*, **58**: 163-170.
- ÖKSÜZ Ş (2002). Düzce İl Merkezine Bağlı Köylerde Dermatofitoz Sıklığı ve

Dermatofitlerin Tanısında Kullanılan Besiyerlerinin Karşılaştırılması. Abant İzzet Baysal Üniversitesi Düzce Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi.

ÖLMEZ M (2020) Anaerobik Bakterilerin Tanımlanmasında Matriks Aracılı Lazer Desorpsiyon İyonizasyon Uçuş Zamanı Kütle Spektrometrisinin (Maldı-Tof Ms) Değerlendirilmesi. Sakarya Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı. Uzmanlık Tezi. Sakarya.

ÖZKÜTÜK AA (1999). Dermatomikoz Olgularından İzole Edilen Dermatofitlerin Tiplendirilmesi ve Antifungal Ajanlara Duyarlılıkları. Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Doktora Tezi, İzmir.

ÖZTÜRK G (2005). Gövde ve Ekstremiteler Dermatofit Enfeksiyonlarının Kliniği. *Türkiye Klinikleri Dermatoloji*, **1**: 6-11.

PACKEU A, DE BEL A, L'OLLIVIER C, RANQUE S, DETANT M, HENDRICKX M (2014). Fast and accurate identification of dermatophytes by matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry: validation in the clinical laboratory. *J Clin Microbiol*, **52**: 3440-3443.

PADHYE AA, SUMMERBELL RC (2005). The dermatophytes. In: Hay R, Merz W (eds). Topley and Wilsons Microbiology and Microbial Infections. Mycology, Vol 5, 10th edn. London: 220-243.

PARYUNI AD, INDARJULIANTO S, WIDYARINI S (2020). Dermatophytosis in companion animals: a review. *Veterinary World*, **13**: 1174-1181.

PATHANIA S, RUDRAMURTHY SM, NARANG T, SAIKIA UN, DOGRA S (2018). A prospective study of the epidemiological and clinical patterns of recurrent dermatophytosis at a tertiary care hospital in India. *Indian J Dermatol Venereol Leprol*, **84**: 678-684.

PENNANEC X, DUFOUR A, HARAS D, RE'HEL K (2010). A quick and easy method to identify bacteria by matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*, **24**: 384–92.

PEREA S, RAMOS MJ, GARAU M, GONZALES A, NORIEGA AR, PALACIO A (2000). Prevalance and risk factors of tinea unguium and tinea pedis in the general population in Spain. *J Clin Microbiol*, **38**: 3226-3230.

PETRUCCELLI MF, DE ABREU MH, CANTELLI BAM, SEGURA GG, NISHIMURA FG, BITENCOURT TA, MARIS M, FACHIN AL (2020). Epidemiology and diagnostic perspectives of dermatophytoses. *Journal of Fungi*, **6**: 310.

PIHET M, LE GOVIC Y (2017) Reappraisal of conventional diagnosis for dermatophytes, *Mycopathologia*, **182**: 169-180.

PINTER L, STRITOF Z. (2004). A retrospective study of *Trichophyton*

- mentagrophytes* infection in dogs (1970- 2002). *Vet. Arhiv*, **74**: 251-260.
- PIRI F, MAHMOUDABADI AZ, RONAGH A, AHMADI B, MAKIMURA K, REZAEI-MATEHKOLAEI A (2018). Assessment of a pan-dermatophyte nested-PCR compared with conventional methods for direct detection and identification of dermatophytosis agents in animals. *Mycoses*, **61**(11):837-844.
- POSTERARO B, DE CAROLIS E, VELLA A, SANGUINETTI M (2013). MALDI-TOF mass spectrometry in the clinical mycology laboratory: identification of fungi and beyond. *Expert Rev. Proteomics*, **10**: 151–164.
- QUINN PJ, CARTER ME, MARKEY B, CARTER GR (1999). *Clinical Veterinary Microbiology*. London, England: Mosby-Wolfe. p:381-390.
- RIPPON JW (1988). *Medical Mycology*. 3rd ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company, Harcourt Brace Jovanovich, Inc.
- ROBERT R, PIHET M (2008). Conventional methods for the diagnosis of dermatophytosis. *Mycopathologia*, **166**: 295-306.
- ROSHANZAMIR H, NASERLI S, ZIAIE B, FAKOUR M. (2016) Incidence of dermatophytes isolated from dogs and cats in the city of Baku, Azerbaijan. *Comp. Clin. Pathol.*, **25**: 327-329.
- SADEGHI-NEJAD B, REZAEI-MATEHKOLAEI A, YUSEF NAANAIE S (2017). Isolation and antifungal activity evaluation of *Satureja khuzestanica* jamzad extract against some clinically important dermatophytes. *J Mycol Med* **27**: 554–560.
- SALKIN IF, PADHYE AA, KEMNA ME (1997). A new medium for the presumptive identification of dermatophytes. *J. Clin. Microbiol*, **35**: 2660-2662.
- SAMANTA I (2015). *Veterinary Mycology*, Springer, Berlin, Germany, 1-22.
- SANIÇ A (1999). *Dermatofitler*. Ustaçelebi Ş. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Ankara: Güneş Kitabevi. 1031-1041.
- SEKER E, DOGAN N (2011) Isolation of dermatophytes from dogs and cats with suspected dermatophytosis in Western Turkey, *Preventive Veterinary Medicine*, **98**: 46-51.
- SELVİ Bİ (2020). Ankara İlinde Bulunan Lezyonlu ve Lezyonsuz Kedi ve Köpeklerden Dermatofit İzolasyonu. Kırıkkale Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Veterinerlik Mikrobiyolojisi Ana Bilim Dalı, Doktora Tezi, Kırıkkale.
- SHAW D, SINGH S, DOGRA AS, JAYARAMAN J, BHAT R, PANDA S, CHAKRABARTI, ANJUM N, CHOWDAPPA A (2020). MIC and upper limit of wild-type distribution for 13 antifungal agents against a *Trichophyton mentagrophytes* *Trichophyton interdigitale* complex of Indian origin.

Antimicrobial Agents and Chemotherapy, **64**: e01964-19.

SINGHAL N, KUMAR M, KANAUIA PK, VIRDI JS. (2015). MALDI-TOF mass spectrometry: An emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Front Microbiol*, **6**: 791.

SOLGUN G (2007). *Trichophyton rubrum* Suşlarının Hemolitik Aktivitesi ve Antifungal İlaçlara İn vitro Duyarlılığının Saptanması. Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı Uzmanlık Tezi, Konya.

SONGER JG, POST KW (2004) *Veterinary Microbiology*, 1st ed., Bacterial and Fungal Agents of Animal Disease, Elsevier Health Science, London

TAHAA M, ELFANGARYB M, ESSAC S. YOUNESA A (2017). Species identification of dermatophytes isolated from human superficial fungal infections by conventional and molecular methods *Journal of the Egyptian Women's Dermatologic Society*, **14**: 76–84.

TAWFIK KM, MOHAMMED RR, SOBHY A, SHALTOUT A (2022). Conventional and molecular diagnostics for detection of causative fungi in clinical samples of human dermatomycosis. *Journal of egyptian's women dermatologic*, **19**: 21-30.

TEL OY (2005). Kedi ve Köpeklerden Dermatofitlerin İzolasyonu, Doktora tezi, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü.

THEEL ES, HALL L, MANDREKAR J, WEGENACK NL (2011). Dermatophyte identification using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Journal of Clinical Microbiology*, **49**: 4067-4071.

THOMSETT LR (1986). Fungal diseases of the skin of small animals. *Br. Vet. J*, **142**: 317-325.

TİRYAKİ Y, GÜLTEKİN KORKMAZGİL B, AYDIN N (2011). Dermatofitozların Laboratuvar Tanısında Polimeraz Zincir Reaksiyonun Kullanılması. *Mikrobiyoloji Bülteni*.

TOPÇU AW, SÖYLETİR G, DOĞANAY M (2002). *İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi cilt 2*. Adana: Nobel Kitabevi.

TUNÇOĞLU E (2009). Dermatofit İzolatlarının Antifungal Duyarlılık Durumları. Gaziosmanpaşa Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı: Uzmanlık Tezi, Tokat.

TÜMBAY E (2014). Tıbbi Önemi Olan Fungal Etkenlerin Tanımlanması Uygulamalı Eğitimi Tıbbi Mikolojiye Giriş. 14-21.

TÜMBAY E. (1983). *Pratik Tıp Mikolojisi*. İzmir: Bilgehan Basımevi, 7-190.

- TÜZÜN Y, SERDAROĞLU S (2008). Derinin Mantar Hastalıkları. Tüzün Y, Gürer M.A, Serdaroglu S, Oguz O, Aksungur VL. Dermatoloji'de. İstanbul: Nobel Tıp kitabevi, 341-382.
- USTAÇELEBİ Ş (1999). Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Ankara: Güneş Kitabevi. 1016-1043.
- WAGNER DK (1995). Sohnle PG. Cutaneous defenses against dermatophytes and yeasts. *Clin Microbiol Rev*, **8**: 317-335.
- WEITZMAN I, SUMMERBELL RC (1995). The dermatophytes. *Clin Microbiol Rev*, **8**: 240-259.
- WIESER A, SCHNEIDER L, JUNG J (2012). MALDI TOF MS in microbiological diagnostics-identification of microorganisms and beyond (mini review). *Appl Microbiol Biotechnol*, **93**: 965-974.
- YENİŞEHİRLİ G, TUNÇOĞLU E, YENİŞEHİRLİ A, BULUT Y (2013). In-vitro activities of antifungal drugs against dermatophytes isolated in Tokat, Turkey. *Internaitional Journal of Dermatology*, **52**: 1552-1560.
- YILMAZ S, DUYAN S, ARTUK C, DİKTAŞ H (2014). Mikrobiyolojik tanımlamalarda MALDI-TOF MS uygulamaları. *TAF Preventive Medicine Bulletin*, **13**: 421-426.
- YÜCEL A (1999). Medical mycology: yesterday and today. *Cerrahpasa J Med*, **30**: 191-198.