



## Tıbbi Önemi Olan Dermatofitlerin Laboratuvar Tanısı: Geleneksel Yöntemler ve Yeni Gelişmeler

### Laboratory Diagnosis of Medically Important Dermatophytes: Traditional Methods and New Developments

Zehra Leyla YAPALAK<sup>1</sup> [ID], Kübra ATILAN<sup>1</sup> [ID]

<sup>1</sup>Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Gülhane Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye [Department of Medical Microbiology, Gulhane Training and Research Hospital, University of Health Sciences, Ankara, Türkiye].

**Article Info:** Received; 10.03.2023. Accepted; 27.03.2023. Published; 03.04.2023.

**Correspondence:** Zehra Leyla Yapalak; MD, Department of Medical Microbiology, Gulhane Training and Research Hospital, University of Health Sciences, Ankara, Türkiye. E-mail: [zehraleylayapalak@gmail.com](mailto:zehraleylayapalak@gmail.com)

#### Özet

Dermatofit enfeksiyonlarında etkenin doğru ve hızlı tanımlanması hasta yönetimi ve uygun tedavilerin planlanması için anahtar roller üstlenir. Direkt inceleme, Wood lambası, mikroskopi, kültür, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), PCR sonrası tanımlama yöntemleri, matris yardımcı lazer desorpsiyon/iyonizasyon-uçuş süresi kütle spektrometresi (MALDI-TOF MS) ve genetik analizler dermatofitlerin tanısında kullanılan temel tanısal yaklaşımlardır. Bu yöntemlerin her birinin belirli avantaj ve dezavantajları bulunmakta olup, klinik tanının duyarlılığını artırmak için yeni hedefler üzerindeki çalışmalar da devam etmektedir. Dermatofit lezyonlarının direkt incelemesi (dermoskopik bulgular) non-invaziv ve hızlı sonuç sunmasına rağmen etkeni tanımlamada yetersiz kalması bu yaklaşımın en önemli dezavantajıdır. Wood lambası da benzer şekilde non-invaziv, düşük maliyetli ve hızlı bir tanı yöntemi iken, tüm dermatofit türlerinin floresans vermemesi önemli bir dezavantajdır. Mikroskopik değerlendirmelerde tür ve cins spesifik (*unique*) özellikler incelenerek dermatofitler tanımlanabilirken, bu yaklaşımda deneyimli personel ve özel ekipman varlığına gereksinim duyulmaktadır. Düşük maliyetli olması ve kısa sürede sonuç vermesi mikroskopinin avantajları iken, ölü ve canlı funguslar arasında ayırım yapamaması en önemli kısıtlılığıdır. Kültür yöntemleri; düşük maliyetli, uygulaması kolay ve türler arası ayırım yapabilen diğer tanı yöntemleri olup, uzmanlık gerektiren tanımlama prosedürleri, saprofit mantarlarla kontaminasyon olasılığı ve günleri, haftaları bulan sonuç alma süresi gibi belirli dezavantajlara sahiptir. Nükleik asit temelli moleküler yöntemler; klinik mikrobiyoloji laboratuvarında, mantarların hızlı ve spesifik tanımlanmasının yanı sıra etiyolojik ajanın doğrudan klinik örnekten saptanması için de giderek daha yaygın olarak kullanılmaktadır. PCR yüksek duyarlılığı ve türler arası ayırım yapabilmesi ile en sık tercih edilen moleküler yöntem olup, konvansiyonel PCR sonrası PCR-ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) ve PCR-RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) temelli ileri tanı protokolleri tanımlanmıştır. Dermatofitoz tanısında PCR yönteminin real-time PCR, nested-PCR, multipleks PCR gibi farklı modifikasyonları tanımlanmış, bu protokoller ile duyarlılık artırılırken, kontaminasyon riski azaltılmış ve birden çok etkenin aynı anda tanımlanabilmesi mümkün olmuştur. Kısa sürede sonuç verebilen PCR temelli testler ve tür düzeyinde tanımlamada altın standart yaklaşım olan spesifik gen bölgelerinin dizi analizi gibi moleküler temelli yöntemlerin ölü ve canlı fungusları ayırt edememesi klinik değerlendirmeler için önemli bir dezavantaj olarak karşımıza çıkmaktadır. Bir diğer hızlı tanı yöntemi olan ELISA ile fungal yapılara karşı gelişen antikorların araştırılması; yüksek spesifiteye sahip bir yaklaşım olmasına rağmen, geçirilmiş enfeksiyonlarla ilişkili yanlış pozitif sonuçlar, yöntemin klinik duyarlılığını azaltmaktadır. Kullanımı giderek yaygınlaşan MALDI-TOF MS ise

geleneksel ve moleküller yöntemlere alternatif olarak geliştirilen yeni bir tanımlama yöntemi olup; yüksek duyarlılığı, dakikalar ve saatler içerisinde sonuç verebilmesi ve iş yükü gereksiniminin azlığı gibi avantajlara sahiptir. MALDI-TOF MS yöntemi dermatofit türleri arasında cins ve tür düzeyinde ayırım yapabilmekle beraber, referans kütüphanesinin genişliği ve kapsamı ile ilgili sorunlar yöntemin tanımlama gücünün en önemli kısıtlayıcı faktörleri olarak karşımıza çıkmaktadır. Dermatofit tanısında kullanılan çeşitli tanı yöntemlerinin her birinin belirli avantaj ve dezavantajları ile ilgili değerlendirmeler geniş bir skalada yer alırken, klinik laboratuvarların kendi bölgesel koşullarında hangi yöntemin en uygun olduğuna karar vermesi önemlidir.

**Anahtar Kelimeler:** Dermatofit, İnsan enfeksiyonları, Sınıflandırma, Tanı.

## Abstract

Accurate and rapid identification of the causative agent in dermatophyte infections plays a key role in patient management and planning of appropriate treatments. Direct examination, Wood's lamp, microscopy, culture, polymerase chain reaction (PCR), post-PCR identification methods, matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) and genetic analyzes are the basic diagnostic approaches used in the diagnosis of dermatophytes. Each of these methods has certain advantages and disadvantages, and studies on new targets are continuing to increase the sensitivity of clinical diagnosis. Although direct examination of dermatophyte lesions (dermoscopic findings) provides non-invasive and rapid results, the inadequacy of identifying the causative agent is the most important disadvantage of this approach. While the Wood's lamp is similarly a non-invasive, low-cost, and fast diagnostic method, it is a significant disadvantage that not all dermatophyte species fluoresce. In microscopic evaluations, dermatophytes can be identified by examining species and genus specific (unique) characteristics, but this approach requires experienced personnel and special equipment. Low cost and quick results are the advantages of microscopy, while its inability to distinguish between dead and live fungi is its most important limitation. Culture methods are low-cost, easy-to-apply and other diagnostic methods that can distinguish between species, and have certain disadvantages such as specialized identification procedures, possibility of contamination with saprophytic fungi, and results in days to weeks. Nucleic acid-based molecular methods are widely used in the clinical microbiology laboratory for the rapid and specific identification of fungi, as well as for the detection of the etiologic agent directly from the clinical sample. PCR has become the most preferred molecular method with its high sensitivity and ability to distinguish between species, also advanced diagnostic protocols based on PCR-ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) and PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) after conventional PCR have been defined. Different modifications of the PCR method such as real-time PCR, nested-PCR, multiplex PCR have been defined in the diagnosis of dermatophytosis, with these protocols, sensitivity has been increased, contamination risk has been reduced, and simultaneous identification of multiple pathogens has been possible. The inability of molecular-based methods such as PCR-based tests, which can give results in a short time, and sequence analysis of specific gene regions, which is the gold standard approach for species-level identification, to distinguish dead and living fungi, is an important disadvantage for clinical evaluations. Although investigating antibodies against fungal structures with ELISA, another rapid diagnostic method, is a highly specific approach, false positive results associated with previous infections reduce the clinical sensitivity of the method. MALDI-TOF MS, which is increasingly used, is a new identification method developed as an alternative to traditional and molecular methods, and has advantages such as high sensitivity, results in minutes and hours, and low workload requirement. The MALDI-TOF MS method can distinguish between dermatophyte species at the genus and species level, but problems with the size and scope of the reference library are the most important limiting factors for the descriptive power of the method. While evaluations of the specific advantages and disadvantages of each of the various diagnostic methods used in the diagnosis of dermatophytes take place on a wide scale, it is important for clinical laboratories to decide which method is most appropriate in their own regional conditions.

**Keywords:** Dermatophyte, Human infections, Classification, Diagnosis.

## Giriş

Dermatofitler; cilt, saç ve tırnaklarda gelişen enfeksiyonların çoğundan sorumlu olan ve dünya

genelinde yaygın olan fungal patojenlerdir [1,2]. Bu etkenlerin neden olduğu ve başlıca dermal inflamatuvar yanıt ile ilişkili olan yoğun kaşıntı ve

kozmetik şekil bozukluğu ile seyreden hastalıklar ise dermatofitoz olarak tanımlanır [2,3]. Kişide yaşam boyu dermatofitoz gelişme riski dünya genelinde %10-20 olarak tahmin edilmekte olup, dermatofitozların en yaygın olan formu ise ayak enfeksiyonlarıdır [1,4,5]. Dermatofit vakalarının önemli bir kısmı gelişmekte olan ülkelerde meydana gelirken, bu ülkelerde yerleşik popülasyonların aynı zamanda sağlık hizmetlerine erişmekte zorluklar yaşıyor olması, dermatofit enfeksiyonları ile ilişkili olumsuz sonuçları artırmaktadır [1,3].

Çeşitli klinik hastalıklar ile benzer özellikler gösterebildiği için birçok dermatofitoz formunun klinik olarak diğer cilt hastalıklarından ayırt edilmesi bazı güçlükler içerir [1,3]. Yanlış tanı, dermatofit türlerinin neden olduğu klinik hastalıkların ayırıcı tanısındaki yetersizliklerden kaynaklanabileceği gibi, nadir görülen veya atipik bulgularla ortaya çıkan enfeksiyonlar ve enfeksiyon etkeni dermatofit türünün laboratuvar tanısının eksik veya hatalı yapılması yaygın karşılaşılan diğer olasılıklardır [1,6,7]. Bu durumlarla ilişkili olarak geç tanı alan hastalarda özellikle de bağışıklığı baskılanmış hastalarda, dermatofit enfeksiyonları ile ilişkili lezyonlar daha geniş alanlara yayılabilmekte ve derin dokulara ilerleyerek invaziv ve dissemine dermatofitozlar gibi ciddi klinik sonuçlara yol açabilmektedir [1,6].

Bu derleme makalede insan enfeksiyonları ile ilişkili dermatofit türlerinin güncel sınıflandırması, temel karakteristikleri ve tanı yöntemlerindeki gelişmeler ele alınmıştır.

### Yapısal Özellikler ve Sınıflandırma

Dermatofitler septalı-hiyalin hifler ve spor (konidia) üretebilen ipliksi küflerdir ve esas olarak miselyumdan oluşurlar [1,8]. Miselyum yapıları, hif olarak bilinen mantar tübüler yapılarının birleşmesinden oluşur ve besin emilimi, spor oluşumu ve ışık, sıcaklık ve besin maddelerinin çevresel olarak algılanması gibi fizyolojik işlevleri yerine getirir [1].

Dermatofitler türe ve çevre koşullarına bağlı olarak farklı tipte eşeysiz (*asexual*) sporlar olan konidyumlar oluştururlar [1,9]. Makrokonidyum (100 µm'ye ulaşan büyüklükte ve çok bölmeli), mikrokonidyum (küçük, tek hücreli) ve hiflerin bulaşıcı parçaları olan artrokonidyum yapıları bu eşeysiz sporların bilinen örnekleridir [1,9] (Şekil 1). Makrokonidyaların enerji kaynağı olmaları yanında dermatofit türlerinin konakçı dışı ortamlarda uzun ömürlü olmasına yardımcı olduğu düşünülmektedir [1]. Enfeksiyonun duyarlı kişilere bulaşında ve dokulara yayılmasında etkili olan artrokonidyumların diğer spordan farklı olarak kültür ve doğal ortam dışında dermatofit lezyonlarında da üretildiği gösterilmiştir [9].

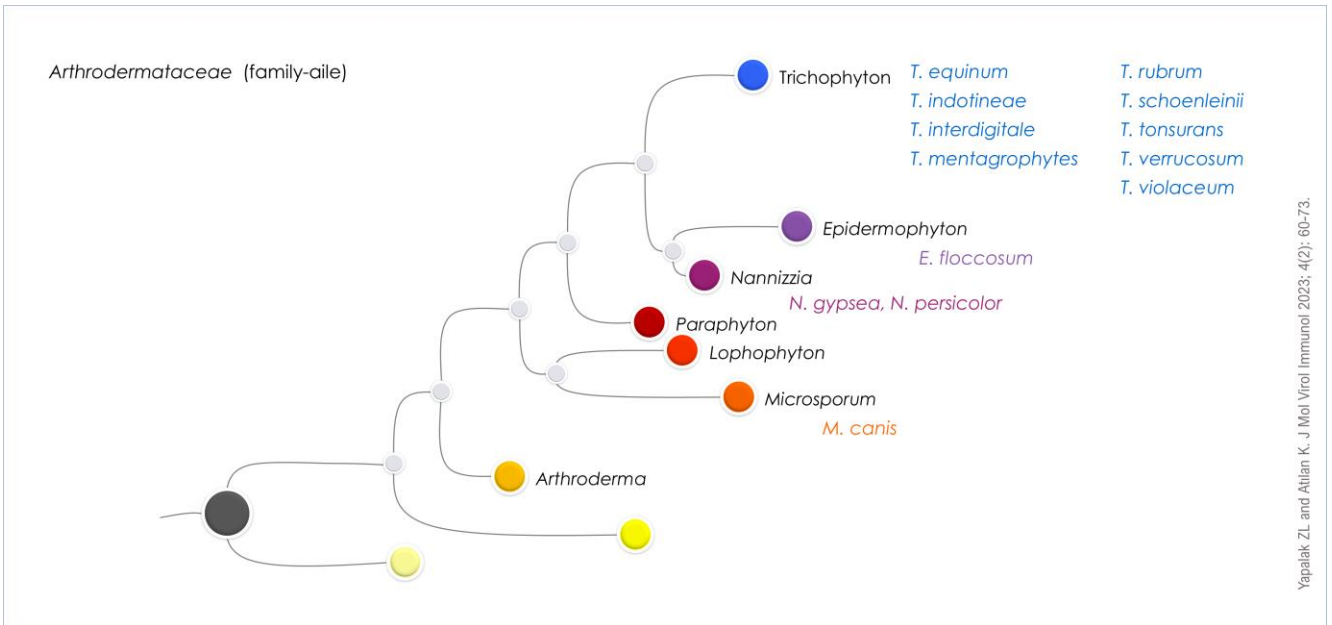


**Şekil 1.** Tıbbi önemi olan bazı dermatofit türlerinin kültür ortamındaki morfolojik özellikleri (Resim ve çizimler Dr. Fatih ŞAHİNER'in [1D] arşivinden alınmış ve izni ile kullanılmıştır).

Fungal izolatlar geçmiş dönemde geleneksel yaklaşımlarla morfolojik özellikleri ve neden oldukları klinik hastalıklara göre tanımlanırken, günümüzde kullanılan moleküler teknikler ve genetik tanı alanlarındaki son gelişmelerin de yardımıyla çeşitli mantar türleri yeniden sınıflandırılmış ve insan enfeksiyonları ile ilişkili bazı mantar türlerinin isimlendirilmesi ve taksonomisinde önemli değişiklikler olmuştur [1,10,11]. Bu değişiklikler, klinik veri tabanlarını ve belirli teşhis tekniklerini değiştirecek şekilde birçok dermatofit cinsini de etkilemiştir [1,12,13]. Örneğin, geçmişte mantar türleri eşeyli form (*teleomorf*) ve eşeysiz form (*anamorf*) için farklı adlarla iki ayrı tür olarak isimlendirilmekte iken; günümüzde teleomorf (*Eumycota*) ve anamorf

(*Deuteromycota*) isimler birleştirilmiş ve fungal türlerin tanımlanması için "tek mantar = tek isim" sistemi ortaya çıkmıştır [1,14]. Günümüzdeki geçerli sınıflandırmaya göre dermatofit türü mantarlar; *Ascomycota* şubesi, *Eurotiomycetes* sınıfı, *Onygenales* takımı ve *Arthrodermataceae* ailesinde yer alırlar [1,13,15].

*Arthrodermataceae* üyelerinin ribozomal DNA (rDNA), ITS (*internal transcribed spacer*), parsiyel LSU (*large nuclear ribosomal subunit*), ribozomal 60S proteini ve  $\beta$ -tubulin ve translasyon uzama faktörü 3 fragmanları için dizilenmesi sonrası dermatofitler; *Arthroderma*, *Epidermophyton*, *Lophophyton*, *Microsporum*, *Nannizzia*, *Paraphyton* ve *Trichophyton* olmak üzere yedi cinsten sınıflandırılmıştır (Şekil 2) [13].



**Şekil 2.** *Arthrodermataceae* türlerinin ITS (*internal transcribed spacer*), kısmi LSU (*large nuclear ribosomal subunit*), TUB (*beta-tubulin*) ve 60S L10 dizilerine dayanan maksimum olasılıklı filogenetik ağaç görünümü ve insan enfeksiyonları ile ilişkili önemli türler ([13] nolu referans temel alınarak oluşturulmuştur), (Çizim Dr. Fatih ŞAHİNER'in [1D] arşivinden alınmış ve izni ile kullanılmıştır).

Dermatofitler yaşam alanlarına göre ise üç farklı gruba ayrılırlar; antropofilik (insanlarda bulunan), zoofilik (hayvanlarda bulunan) ve jeofilik (çevrede yaşayan) türler [1,13]. Gruplar arasındaki ayırım, türlerin tercih ettikleri yaşam alanlarını değiştirerek belirli konakçılara uyum sağlamaları durumunda karmaşık olabilmektedir [1]. İnsanlarda dermatofitoz vakalarının çoğu antropofilik türlerle ilişkili iken, zoofilik türler de insan enfeksiyonlarına neden olabilmektedir (zoonotik dermatofitozlar) [1].

İnsan patojenleri olarak başlıca *Trichophyton*, *Microsporum* ve *Epidermophyton* cinslerinde yer alan türler ile bazı *Nannizzia* türleri raporlanmıştır (Tablo 1) [3]. *Trichophyton* ve *Microsporum* cinslerinde yer alan insan enfeksiyonları ile ilişkili bazı türler aynı zamanda zoofilik özellikler de sergilemektedir (zooantropofilik) [3]. *Nannizzia* cinsi dermatofitler ise temelde jeofilik mantarlar olmalarına karşın insanları ve hayvanları enfekte edebilmektedir [3]. İnsan enfeksiyonlarına neden olma potansiyeline sahip olduğu değerlendirilen

tür sayısının 40'tan fazla olduğu belirlenmiştir [1]. Dermatofitoz epidemiyolojisinde zaman içerisinde dikkate değer bazı değişiklikler de gözlenmektedir. *Trichophyton mentagrophytes* kompleksinin diğer türlerinden terbinafine direnç göstermeye daha

yatkın olması nedeniyle hızlı tanımlama gerekliliği olan ve yeni ortaya çıkan bir patojen olarak *Trichophyton indotineae* türünün son yıllarda Hindistan'dan Avrupa'ya yayılması bu durumun bir örneğidir [16].

**Tablo 1.** Dermatofit türlerinin sınıflandırması ve insan enfeksiyonları ile ilişkili türler [1,13,16-20]

Ascomycota (phylum, şube) > Eurotiomycetes (class, sınıf) > Onygenales (order, takım) > Arthrodermataceae (family, aile)					
Aile	Cins	Tür		İnsan enfeksiyonları	
Arthrodermataceae	Arthroderma				
		<i>Epidermophyton</i>	<i>E. floccosum</i>	Antropofilik	+
		<i>Lophophyton</i>			
		<i>Microsporium</i>	<i>M. audouinii</i>	Antropofilik	+
			<i>M. canis</i>	Zoofilik	+
			<i>M. praecox</i>	Jeofilik	+
		<i>Nannizzia</i>	<i>N. gypsea</i>	Jeofilik	+
			<i>N. persicolor</i>	Zoofilik	+
		<i>Paraphyton</i>			
		<i>Trichophyton</i>	<i>T. equinum</i>	Zoofilik	+
			<i>T. indotineae</i>	Antropofilik	+
			<i>T. interdigitale</i>	Antropofilik	+
			<i>T. mentagrophytes</i>	Zoofilik	+
			<i>T. rubrum</i>	Antropofilik	+
			<i>T. schoenleinii</i>	Antropofilik	+
			<i>T. tonsurans</i>	Antropofilik	+
			<i>T. verrucosum</i>	Zoofilik	+
	<i>T. violaceum</i>		Antropofilik	+	

## Dermatofit Enfeksiyonları

Dermatofitler, insan ve hayvanlarda saç, deri, tırnak, tüy ve kıl yapıları dahil olmak üzere keratinize dokuları ve doku eklerini enfekte eden mantar grubu için kullanılan genel bir tanımdır [1,2]. Bu mantarlar genel olarak çevrede serbest olarak yaşarlar, ancak belirli koşullar altında insanlarda ve hayvanlarda enfeksiyonlara neden olabilirler [1,8]. Bazı dermatofit türleri insanlarda belirli vücut bölgelerinde daha sık enfeksiyonlara neden olma eğilimi gösterir. Ayaklarda gelişen dermatofit enfeksiyonu tinea pedis (atlet ayağı) olarak adlandırılır ve etken sıklıkla *Trichophyton rubrum*'dur. [1] Lokalize dermatofitozun diğer formları arasında tinea capitis (kafa derisi enfeksiyonu), tinea unguium (tırnak enfeksiyonu, onikomikoz), tinea barbae (sakal enfeksiyonu), tinea faciei (yüz enfeksiyonu), tinea corporis (vücut enfeksiyonu), tinea manuum (el enfeksiyonu) ve tinea cruris (kasık bölgesi

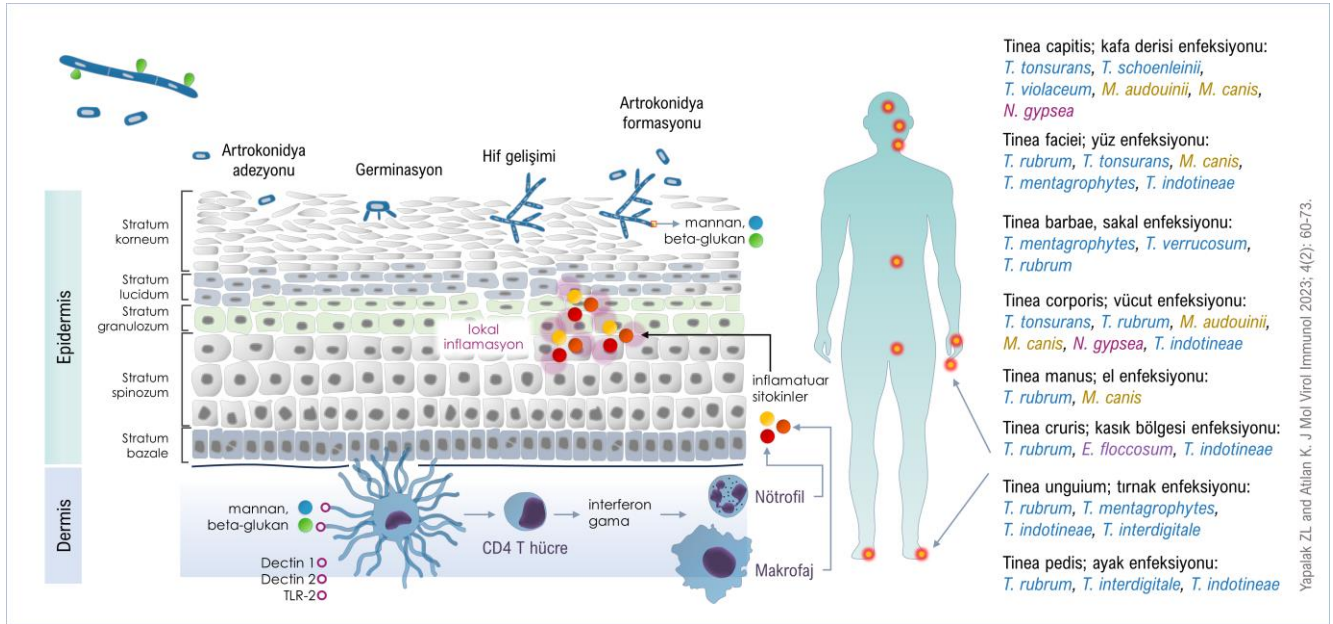
enfeksiyonu) yer almaktadır [1,6] (Şekil 3). Bu enfeksiyonların dağılımı coğrafi ve sosyoekonomik faktörlere göre değişebilmekte olup, gelişmiş ülkelerde tinea pedis ve gelişmekte olan ülkelerde tinea capitis daha sık görülür [1]. Tinea unguium yaşlı hastalarda, tinea capitis ise çocuklarda daha sık raporlanmaktadır [1,6].

Dermatofit enfeksiyonu artrokonidia adı verilen mantarın enfeksiyöz kısımlarının keratinize dokulara yapışması ile başlar. Artrokonidia ilk temastan sonra 2 ila 6 saat içerisinde epidermise yapışır ve stratum korneum'da filizlenmeye başlar (Şekil 3). Filizlenme başladığında bu sporlar epiderminin ilk tabakası olan stratum korneuma nüfuz edebilen germ tüpleri geliştirir. Dermatofit keratini parçaladıkça enfeksiyon bölgesindeki pH daha bazik hale gelir ve bu durum mantar proteazlarının aktivitesine yardımcı olur. Mantar hifleri büyümeye devam ederek keratinize dokuları invaze eder ve enfeksiyondan sonraki



yedi gün içinde artrokonidia üretmeye başlarlar, bu da mantarın konakçının diğer anatomik bölgelerine ve diğer konakçılara yayılmasına ve ayrıca çevreyi kontamine etmesine neden olur [1]. Normal koşullarda artrokonidyalar sağlıklı dokuları istila edemezler, konakçı bağışıklık sistemi mantarların sağlıklı epidermisi enfekte etmesini engeller. Bu nedenle, enfeksiyon gelişebilmesi için tipik olarak predispozan faktörlerin mevcudiyeti gereklidir. Enfeksiyon için yaygın predispozan faktörler arasında; genç yaş, bağışıklığın baskılanması, beslenme yetersizliği, cilt bütünlüğünün bozulması, yüksek çevre sıcaklığı ve/veya nem yer alır [1]. Dermatofitler derinin canlı olmayan keratinize tabakasında (*stratum corneum*) filizlendiğinde mantar metabolitleri, enfeksiyon bölgesinde inflamatuvar

reaksiyona neden olur. İnflamasyon, merkezde iyileşme ve periferde klasik halka şeklindeki lezyondan sorumlu papüller ile dairesel bir görünüme neden olacak şekilde patojenin enfeksiyon bölgesinden uzaklaşmasına ve dokuda yayılmasına neden olur [8]. Stratum korneum'un invazyonu; sülfid, keratinaz ve proteazlar gibi farklı virülans faktörlerinin üretimi ile ilişkilidir [8]. Dermatofitlerin neden olduğu derin kutanöz ve subkutan enfeksiyonlar nadiren apse oluşumu, deri altı nodüller, plaklar, papüller ve ülserasyonla sonuçlanabilir ve bu durum genellikle bağışıklığı baskılanmış kişilerle sınırlıdır. Bununla beraber bilinen herhangi bir sistemik hastalık öyküsü olmayan immünkompetan bireylerde de derin dokulara yayılım gösteren enfeksiyon olguları raporlanmıştır [21].



Yapalak ZL and Atılan K. J Mol Virol Immunol 2023; 4(2): 60-73.

**Şekil 3.** Dermatofit enfeksiyonlarının gelişim süreci ve konak immün yanıtı: Dermatofitler normal koşullarda canlı hücrelerde ve inflamatuvar alanlarda hayatta kalamazlar. Bu nedenle sağlıklı kişilerde cilt epitel hücrelerini invaze etmezler. Dermatofit sporları, cilt travması yoluyla konakçıya bulaştıktan sonra, derinin canlı olmayan keratinize tabakasında (*stratum corneum*) filizlenebilir ve inflamatuvar reaksiyonlara neden olurlar. Dermatofit enfeksiyonları genellikle çeşitli tiplerde yüzeysel kutanöz mikozlar olarak ortaya çıkarken, çok nadir durumlarda dermin derinliklerine ulaşarak invaziv enfeksiyonlara neden olurlar. Keratinositler, dermatofit enfeksiyonlarına immün yanıtta ilk basamakta görev alan hücrelerdir ve fungisidal aktiviteye sahip katelisinler ve defensinler gibi antimikrobiyal peptitler salgırlar. Mannan ve beta-glukan gibi "patojenle ilişkili moleküler paternler" Langerhans hücreleri tarafından tanınır ve makrofajlar ve nötrofillerin enfeksiyon bölgesine göçü ve aktivasyonu ile karakterize edilen Th1/Th17 yanıtları indüklenir. Tüm bu süreç dermatofit enfeksiyonlarındaki patolojik değişikliklerin temel mekanizmasını oluşturmaktadır [1,8,16-19,22,23], (Çizim Dr. Fatih ŞAHİNER'in [ID] arşivinden alınmış ve izni ile kullanılmıştır).

### Dermatofitozların Tanısı

Dermatofitoz tanısı, konvansiyonel olarak direkt mikroskopik inceleme ve altın standart yöntem olan mikolojik kültür ile konulurken,

mikrokültürler ve biyokimyasal testler gibi diğer tanımlama teknikleri de tanıda kullanılmaktadır [3]. Bu süreç uzmanlık ve özel tanı protokolü gerektirmekle beraber zaman alıcıdır [3]. Ayrıca

objektif ve subjektif faktörlerden etkilenme de söz konusu olabilmektedir. Örneğin, test edilen numunenin miktarı, hastaya örnekleme öncesi uygulanan tedaviler ve klinisyenin tecrübesi tanı süreçlerini etkileyebilmektedir. Bu nedenle hızlı ve kolay uygulanabilir yeni tanı yöntemlerinin veya protokollerinin geliştirilmesi son birkaç dekattaki birçok çalışmanın temel hedefi olmuştur [3].

Dermatofitoz tanısında kullanılan güncel yöntemler beş ana başlıkta incelenebilir; mikroskopik inceleme teknikleri, modifiye hızlı kültür teknikleri, matris yardımcı lazer desorpsiyon/ionizasyon-uçuş süresi kütle spektrometresi (MALDI-TOF MS; *matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry*) tekniği, moleküler tanı yöntemleri ve lateral flow tabanlı teknikler olmak üzere [3,6].

### **Örnek toplanması**

Numune alma işlemi iyi tanımlanmış cilt lezyonlarının kenarlarına yakın bir yerden yapılmalıdır, çünkü lezyonların merkezi düşük derecede canlı veya cansız materyal içerebilir. Enfeksiyon bölgelerini kapsayacak şekilde cilt lezyonlarından deri kazıma yöntemi ile, saç lezyonlarından ise koparma veya "Mackenzie" fırça tekniği kullanılarak örnek toplanabilir. Ayrıca, enfeksiyonun yeri ve şiddetine bağlı olarak tüm tırnak parçaları veya kazıntıları örneklenebilir. Testlerin duyarlılığı ve özgüllüğü klinik numune tipine bağlı olabileceğinden, hastadan toplanan numunenin tipi toplanan materyalin hangi tanı yaklaşımları ile test edileceğini belirleyecektir [1]. Dermatofitozların laboratuvar tanısının etkinliği toplanan örneklerin kalitesine de bağlıdır [24].

Test edilecek numuneleri toplarken göz önünde bulundurulması gereken birkaç önemli özellik; (i) kontaminantları uzaklaştırmak için lezyon bölgesini %70 alkolle temizlemek, (ii) örnek toplama işleminin sistemik tedaviye başlamadan önce yapılması ve hasta halihazırda topikal veya oral antifungal alıyor ise örnek toplamadan önce sırasıyla en az 15 gün veya 3 ay süreyle ilaç alımının veya uygulamasının kesilmiş olması esastır. Deriden alınan örnekler, genellikle lezyonların ilerleyen kenarından steril dermal künt küret (Brocq küreti), neşter veya aşı neşteri (*vaccinostyle*) kullanılarak toplanan epidermal materyalleri içermelidir. Tırnak örnekleri ise,

genellikle canlı mantar hiflerinin bulunduğu tırnak yatağı alanının yakınından toplanır. Tanı amaçlı enfekte saç örneği toplanırken, tespit ve izolasyon şansını artırmak için saç folikülünün dahil edilmesi önemlidir. Bu nedenle saçlar dip kısmından steril forseps ile alınmalı ve klipslenmemelidir [24].

### **Direkt inceleme (klinik muayene)**

Dermoskopik bulguların değerlendirilmesi ve Wood lambası altındaki görünüm dermatofit enfeksiyonlarının tanısında başvuru olan ilk basamak incelemelerdir [6]. Saç ve tırnakları içeren lezyonlar da dahil olmak üzere kutanöz lezyonları incelemek için elle tutulan bir büyütme aracının kullanıldığı dermoskopi, non-invaziv bir yaklaşım olduğundan hem teşhis hem de tedavi sırasında enfeksiyonların izlenmesi için kullanılır. Bu tekniğin doğruluğu büyük ölçüde klinisyenin becerilerine ve uzmanlığına bağlıdır. Dermoskopi için modern ilerlemeler, dermatolojik özelliklerin gözlemine geliştirmek için polarize ışık kaynakları kullanmayı ve görüntülenen alanı bir mobil cihaza bağlamayı içerir [1].

Floresans incelemesi için bir Wood lambasının kullanılması, dermatofitoz taraması için yaygın kullanılan diğer bir tanı aracıdır. Bu araç, aktif dermatofit enfeksiyonunun cilt ve saç üzerindeki floresansını saptamak için 320 ile 400 nm arasında değişen dalga boyunda UV ışığı kullanır [1]. *Microsporum canis*, *Microsporum audouinii*, *Microsporum ferrugineum*, *Microsporum disortum*, *Nannizzia gypsea* ve *Trichophyton schoenleinii*'nin Wood lambası ışığı altında floresans yaydığı gözlemlenmiştir [25]. Tüm dermatofit türleri floresans yaymadığı için, Wood lambasının negatif bir incelemesi dermatofitoz tanısını kesin olarak ekarte ettirmez [1]. Bakteriyel enfeksiyonlar ve maya enfeksiyonları gibi diğer enfeksiyonlar ve pigment bozuklukları gibi dermatolojik bozukluklar da Wood lambası altında floresans yayabilir ve bu durum yanlış pozitif değerlendirmelere yol açabilir [26].

### **Mikroskopik incelemeler**

Klinik numunenin mikroskop kullanılarak incelenmesi, dermatofitoz için antifungal tedaviye erken başlamasını sağlayan basit ve hızlı tarama tekniklerinden biridir [24]. Farklı mantar yapılarının mikroskop altında görülebilirliğinin

artırılması için klinik örnekler farklı işlemlerden geçirilebilir ve çeşitli boyalarla boyanabilir [1]. Diğer tanı yöntemleri ile karşılaştırıldığında, numune toplandıktan hemen sonra (1 saatin altında) değerlendirilebilmesi ve klinik ortamlarda %5 ila 15 arasında bildirilen yanlış negatiflik oranı ile hızlı bir tanı yaklaşımıdır [1].

Doğrudan mikroskopik görselleştirme, klinik numune içeriğindeki keratini parçalamak ve uzaklaştırmak için bir temizleme maddesinin kullanımını gerektirir. Dimetil sülfoksit içeren veya içermeyen %10 veya %20 potasyum hidroksit (KOH), %10 sodyum hidroksit, kloral laktofenol (*Amann's chloral lactophenol*) gibi çeşitli temizleme maddeleri ve sodyum dodesil sülfat (SDS) gibi deterjanlar bu amaçla kullanılabilir. KOH, keratin ayrıştırma işlemi için her mikoloji laboratuvarında kullanılan basit ve düşük maliyetli bir yöntemdir ve mantar elementlerinin varlığını tespit etmek için saç veya deri sıyrıklarına uygulanabilir [1,2,8]. KOH mantarları boyamaz ve fungal yapıları ışık kırılmasındaki farklılığa göre görselleştirir, bu nedenle preparatta mantarların saptanması tecrübe sahibi olmayan kişiler için zordur ve bir derece uzmanlık gerektirir [24]. Özetle, mikolojik ekipman ve eğitimli personel gerektirmesi yöntemin dezavantajlarıdır [1]. Mikroskopi tekniği, incelenen numunede mantar olup olmadığını belirlemede çok hassas olsa da canlı ve ölü hücreler arasında ayırım yapamaz ve belirli türleri tanımlamada yetersiz kalır [1], bu eksiklik yöntemin en önemli sınırlamasıdır [24].

Kontrast sağlayarak doğrudan mikroskopinin duyarlılığını artırmak için pamuk mavisi C4B veya Mavi-Siyah Mürekkep gibi çeşitli boya veya mantar elementine koyu mavi veya siyah renk veren klorazol siyah E boyası kullanılır. Ayrıca, polisakkarit glikozaminoglikan yapıları boyayan periyodik asit-Schiff (PAS),  $\beta$ -D-glukanları ve florokromları boyayan Kongo kırmızısı gibi diğer boya veya mantar hücre duvarındaki kitine bağlanan Uvitex 2B gibi boyaların etkinlikleri değerlendirilmiş ve tanısal incelemelerde faydalı oldukları gösterilmiştir. Mantarların sırasıyla kırmızı veya gri siyah görüldüğü PAS veya Gomori'nin metenamin gümüş boyası (GMS) gibi boya kullanılarak yapılan histolojik incelemeler ise özellikle tırnak örneklerinin incelenmesinde tanıya yardımcıdır. Siyanoakrilat yüzey deri

kazıma yöntemi, yapıştırıcı ile stratum korneumun üniform kalınlıkta çıkarılmasıyla gerçekleştirilen basit bir şerit biyopsi testidir. Bu tekniğin en büyük dezavantajı ise saç veya tırnak örneklerine uygulanamamasıdır [24].

Laktofenol pamuk mavisi, mantar hücre duvarlarındaki kitini hedefleyen ve mantar yapılarının görselleştirilmesini artıran bir kaplama medyum ve boyadır [1]. Bu boya aynı zamanda mantarları öldürür ve numunenin işlenmesinden kaynaklanan potansiyel kontaminasyonu azaltır [1]. Boya içeriğindeki fenol mantarı öldürürken; laktik asit, bir temizleme maddesi görevi görür ve incelenecek mantar yapılarının korunmasına yardımcı olur [27]. Mantar hücre duvarlarındaki kitini hedefleyen bir anilin boyası olan pamuk mavisi ise preparata renk verir ve böylece fungal yapıların görselleştirilmesini zenginleştirir ve kontrast oluşturur. Gliserol ise hazırlanan lam örneğinin kurumasını engelleyen viskoz bir maddedir [1]. Mineral yağı, floresan metabolitlere müdahale etmeme avantajıyla klinik numuneler için başka bir numune kaplama medyumudur [1].

Dermatofit türlerini ayırt etmek için hif yapıları da incelenebilir. *T. mentagrophytes*'in spiral hifleri, nodüler gövdeleri veya raket hifleri vardır. *M. audouinii*, tarağı andıran küçük, hif çıkıntıları olan pektinat cisimciklerin varlığı ile tanımlanır. Hem *T. schoenleinii* hem de *Trichophyton violaceum*, bir şamdana benzeyen düzensiz, hifal çıkıntıları olan favik yapılar üretebilmektedir [1].

### **Histopatolojik incelemeler**

Histopatoloji, dokulardaki mantar hücrelerini görselleştirmek için yaygın olarak kullanılan bir tekniktir. Yöntem, dermatofitoz tanısı için nadiren kullanılırken; dermatofitlerin dermisi veya daha derin dokuları invaze ettiği derin dermatofit enfeksiyonlarında faydalı olabilir [1]. Aktif dermatofitozda gözlemlenen histolojik özellikler arasında parakeratoz, keratin tabakasının sepet örgüsü, epidermisin alt tabakalarında nötrofiller, spongiyotik değişiklikler, dermiste eozinofiller, akantoz veya hiperkeratoz ve hiflerin görüntülenmesi yer alır [1]. Histopatolojik kesitlerde lezyonun çevresinde iyi korunmuş hifler ile lezyonun merkezinde hücresel enkaz içeren ölü ve dejenere miselyum yapısı izlenebilir [8].



Dermise ulaşan derin enfeksiyonlarda epitelioid hücreler, dev hücreler, lenfositler ve eozinofiller dahil olmak üzere mantar elementleri içeren granülomatöz enflamatuvar infiltratlar ve granülomlar gözlemlenebilir [21]. Mantarları görselleştirmek için dokulara uygulanabilen boyalar arasında PAS, GMS ve kalkoflor beyazı boyası yer alır [8]. Bu boyaların klinik ortamlarda bulunmaması ve histopatoloji için gerekli teknik beceriler göz önüne alındığında, bu yöntem nadiren kullanılmaktadır [1]. Dermatofit türlerini tespit edemese de direkt mikroskopi ile karşılaştırıldığında, histopatolojik inceleme çok daha güvenilirdir [8]. Tanısal duyarlılık biyopsi ile artırılabilir, ancak bu özellik özellikle diyabet hastalarında yapılması her zaman mümkün olmayan bir uygulamadır [8].

Kültürde üreyen veya saprobik yaşayan dermatofitlerin ürettiği karakteristik yapılar olan makrokonidyum ve mikrokonidyumlar dermatofit lezyonlarında gözlemlenmemiştir. Septat hiflerin bir konidia zinciri oluşturmak için genetik olarak programlanmış bir dezartikülasyonu olarak tanımlanan artrokonidyumların ise; hem kültürde hem de belirli predispozan koşullar altında tırnak, saç ve kafa derisi lezyonlarında farklı dermatofit türlerince üretildiği gösterilmiştir [9].

### **Kültür teknikleri**

Dermatofit mantarların klinik örnekten izolasyon oranı direkt mikroskopik incelemedeki pozitiflik oranından daha düşük bulunmuştur. Doğrudan mikroskopi ve kültür sonuçları arasındaki tutarsızlıklar, yetersiz numune miktarı, cansız mantar hiflerinin varlığı ve numune toplama öncesi antifungal tedavi uygulanması gibi çeşitli faktörlere bağlanmıştır. Derinin epidermal tabakasındaki antifungaller, mantarın üremesini engellemektedir. Antifungallerin kontaminan etkisini en aza indirmek için lesitin ve polisorbata 80 içeren besiyerleri geliştirilmiş ve kullanıma sunulmuştur. Dermatofitler klinik örneklerden başarılı bir şekilde izole edilse bile, türler arasında paylaşılan morfolojik benzerlikler nedeniyle kültür morfolojileri ile tanımlama zordur ve tanımlama için sıklıkla ileri tekniklerin kullanımı gerekir [24].

Kültürde üretilen bir klinik numuneden dermatofitlerin izole edilmesi ve tanımlanması, dermatofitoz teşhisi için "altın standart" yöntem

olarak kabul edilir [1]. Kültür ortamında üretilen dermatofitlerin tanımlanması tipik olarak seçici besiyerinde koloni morfolojisinin (pigmentasyon, büyüme hızı ve diğer özellikleri) makroskopik gözlemine ve ardından mikroskop altında konidia yapılarının incelemesine dayanır [28]. Dermatofit türleri insan vücut sıcaklığında (37°C) iyi üreme göstermediği için kültürler oda sıcaklığında (25°C±5°C) bekletilmelidir. Klinik uygulamada ve referans laboratuvarlarda, kültürler genellikle karanlık ortamlarda inkübe edilir [1], bununla birlikte dermatofitlerin aydınlık veya karanlık ortamlarda kültüre edilmesinin mantarın üremesi üzerine bir etkisinin olmadığı da gösterilmiştir [29]. Bazı türler çok yavaş ürettiği için kültürler 4 haftaya kadar sık aralıklarla gözlemlenmelidir, pleomorfizm yaygın görülen bir durumdur ve kültürde üreyen türlerin belirlenmesi ve tanımlanması uzmanlık gerektirir [1]. Besiyerinde üreyen dermatofitler tür tanımlanması için kullanılan üç tip aseksüel konidia üretebilirler; makrokonidya, mikrokonidya ve artrokonidya [1].

Tinea unguium tanısı için kültür yapılması bir gerekliliktir, çünkü bu örnekler için doğrudan inceleme ve mikroskopi pratik bir yaklaşım olmayabilir. Dermatofitik olmayan mantarların aşırı çoğalması, yetersiz klinik materyal veya klinik materyalin kültüre (özellikle fırça ile toplanan numuneler için) hatalı inokülasyonu nedeniyle yanlış negatiflik oluşabilir. Buna karşın kontamine ortamlardaki hastalardan numuneler alındığında ise yanlış pozitiflik ortaya çıkabilir [1].

Antibiyotikler (kloramfenikol ± gentamisin) ve sikloheksimid ile takviye edilmiş Sabouraud dekstroz agar (SDA) veya patates dekstroz agar (PDA) genellikle bir klinik numuneden mantarların birincil izolasyonu için kullanılır. Kültürler genellikle 20°C–25°C'de 4–6 hafta inkübe edilir, ancak *Trichophyton verrucosum*'dan şüpheleniliyorsa 30°C–32°C'lik daha yüksek inkübasyon sıcaklıkları gerekebilir [24].

Dermatofit test ortamı (DTM), 1969 yılında Taplin ve ark. tarafından dermatofitlerin saptanması ve tanımlanması için geliştirilmiş seçici ve tanımlayıcı bir besiyeridir [30]. DTM, pH yükseldiğinde renk değiştiren ve bir dermatofitin varlığını gösteren bir boya olan fenol kırmızısı içerir [1]. Dermatofit türlerince üretilen alkalın

metabolitler pH'nın yükselmesine neden olurken, fenol kırmızısı indikatörü besiyerinin rengini sarıdan pembe-kırmızıya çevirir [24]. Bu besiyerinin önemli bir dezavantajı dermatofitlerin koloni görünümünü ve mikroskopik morfolojisini değiştirebilmesi nedeni ile mantar türlerinin belirlenmesini zorlaştırmasıdır [1]. DTM genellikle SDA besiyeri ile eşleştirilir, çünkü SDA koloni morfolojisini DTM'den daha az etkiler ancak DTM'den daha az ayırıcıdır (*discriminatory*) [1].

Dermatofitlerin üretilmesinde kullanılan besiyerleri dermatofitik olmayan mantarların üremesini engellemek için genellikle sikloheksimid içerir. *Trichophyton* türleri arasında ayırım yapmaya çalışılırken, toprakla ilişkili *Trichophyton* türleri besiyeri içeriğinden bağımsız olarak üreme eğiliminde olduğundan, %5 tuz katkılı SDA, vitaminsiz agar, Bromkresol mor süt katı glikoz agar (*bromocresol purple milk solid glucose agar*), laktritel agar, Littman oxgall agar ve %1 pepton agar gibi besiyerleri kullanılabilir [1]. Pirinç tanesi eklenmiş besiyeri, *Microsporum* türlerini ayırt etmek için kullanılabilir, çünkü bu besiyeri *M. canis* için sporlanmayı indükler, ancak *M. audouinii* için üremeyi teşvik etmez [1]. Casamino asit/eritritol/albumin agar gibi özel izolasyon besiyerleri, özellikle numuneler bakteri veya sikloheksimide duyarlı maya türleri ile kontamine olduğunda dermatofitlerin izolasyonuna yardımcı olabilir [24]. Bromokresol mor kazein maya özü agarı, *T. verrucosum*'un hızlı tanımlanması için kullanılabilir [24].

Ek olarak, dermatofitlerin farklı türlerini ve cinslerini ayırt edebilen özel kültür besiyerleri kullanılabilir [28]. Bromokresol mor süt katı glikoz agar *Trichophyton interdigitale* varlığında menekşe rengine döner ve onu *T. rubrum* ve *Nannizzia persicolor*'dan ayırır. *M. audouinii*'yi (kahverengimsi pigment) *M. canis*'ten (sarı pigment) ayırt edebilen steril pirinç taneleri diğer bir ayırt edici tanımlama yöntemidir. İn vitro saç perforasyonu testi, *T. rubrum*'u (delici organ yok) *T. mentagrophytes*'ten ve *M. canis*'i (pozitif test) *M. audouinii* veya *Microsporum equinum*'dan (negatif test) ayırt etmede kullanılabilir [24].

Sporlar, dermatofitlerin morfolojik olarak tanımlanması için gereklidir. Dermatofitlerin çoğunun birincil izolasyon besiyerinde

sporlanması daha uzun zaman alır veya bazen sporlanmaz, bu nedenle morfolojik tanımlamaya devam etmek için sporlanma besiyerinde sporların indüklenmesi esastır. PDA, Borelli laktritel agar, pablum tahıl besiyeri, beyin kalp infüzyon agar, Baxter besiyeri, Takasio besiyeri, malt agar veya water agar gibi dermatofitlerin konidyasyonunu ve pigment üretimini uyaran birçok sporulasyon besiyeri kullanılabilir [24].

### **MALDI-TOF MS**

MALDI-TOF MS tekniği 1980'lerin ortalarında geliştirilmiş, 1990'ların ortalarında ise bakteri ve mantarları da içeren mikroorganizmaların mikrobiyolojik tanımlamaları için kullanılmaya başlanmış olup, son zamanlarda klinik laboratuvarlarda kullanımı yaygınlaşan bir analitik yöntem olmuştur [31]. Bu teknoloji, büyük ölçüde ribozomal protein içeriği tarafından belirlenen "izolata özgü spektral bir profilin" oluşturulmasına dayanır. Elde edilen protein spektrumları daha sonra, referans kütüphanesi ile karşılaştırılır [28]. Yöntem; bakteri veya mantarların kütle spektrumlarının ölçülmesi ve elde edilen verilerle mevcut veritabanı (en iyi eşleşen tanımlamaların bir listesini içeren kapsamlı bir referans kütüphanesi) üzerindeki veriler arasında özel bir analiz yazılımı ile bir karşılaştırma yapılması ve kütle spektrumları arasındaki en yakın eşleşmeye göre tür veya cins düzeyinde tanımlama yapılması prensibi ile çalışır [28,31].

Dermatofitlerin de aralarında bulunduğu filamentöz mantarlar, protein spektrumundaki değişikliklerle tespit edilebilen çeşitli fenotiplere sahiptir [1]. MALDI-TOF MS yöntemi, dermatofit türlerinin tanımlanmasında kullanılan geleneksel veya moleküler yöntemlere göre uygun maliyetli ve hızlı bir alternatif olmuştur [28]. Bu teknik, dermatofitlerin tanımlanması için değerlendirilmiş ve diğer tanımlama yöntemleri ile karşılaştırılabilir sonuçlar sunduğu ortaya konmuştur [24]. Pek çok ilk dönem mantar çalışmasında MALDI-TOF MS, saflaştırılmış mantar sporları kullanılarak izolat tanımlanmasına odaklanılmış iken, daha yakın zamanlarda bu teknoloji doğrudan fraksiyone olmayan mantar kolonilerine uygulanmıştır [28].

MALDI-TOF-MS, çok hızlı ve spesifik bir yöntem olarak kültürlerden dermatofit türlerinin tanımlanmasında kullanılmış ve *Trichophyton*

türleri için polimeraz zincir reaksiyonu (*polymerase chain reaction*, PCR) ile %98-99 benzerlik göstermiştir [8]. Fransa'da yürütülen yakın tarihli bir çalışmada yeni geliştirilmiş çevrimiçi MSI-2 veri tabanını kullanılarak *T. indotineae* tanımlama oranının %99.6 duyarlılıkla %5'ten %96'ya çıkarıldığı bildirilmiştir [16]. Özetle, MALDI-TOF MS, spektral veri tabanının tür içi suş çeşitliliğini yeterince kapsamaması koşuluyla, dermatofit tanımlaması için mikroskopi ve dizi analizine güçlü bir alternatif olarak değerlendirilmektedir. MALDI-TOF MS tekniğinin laboratuvarında karşılaşılan dermatofit izolatlarının ~%93'ünü cins düzeyinde ve ~%60'ını tür düzeyinde hızlı ve kolay bir şekilde tanımlamak için kullanılabilme yeteneği, geleneksel fenotipik yöntemlerle ilişkili geri dönüş süresini önemli ölçüde kısaltır ve bunun yanı sıra moleküler yöntemlere ilişkili maliyet ve iş yükünü de azaltmaktadır [28].

Bu tekniğin en büyük sınırlaması, farklı ticari sistemlerin referans spektrum kütüphanelerinde dermatofit türlerinin yetersiz yer almasıdır [24]. Bu teknik; kültüre kıyasla nispeten hızlı olsa da, tanımlama gücü mevcut organizma kütüphanesi ile sınırlıdır, bu da yeni türlerin veya kütüphanede yer almayan nadir türlerin tanımlanmasını zorlaştırır [1]. Kütüphaneler, analiz için dahil edilen 20'den fazla türle dermatofit türü için düzenlenmiştir [1]. Yöntem, kullanılan referans kütüphanesinin genişliği ve derinliği ile doğrudan ilişkili olarak bazı izolatları düşük skorla tanımlayabilmekte veya kabul edilebilir düzeyde tanımlayamamaktadır ve bu durum MALDI-TOF MS'nin önemli bir kısıtlılığı olarak karşımıza çıkmaktadır [31]. Bu sınırlama, laboratuvarlar tarafından özel ve tür içi dermatofit çeşitliliği için kurum içi bir referans kütüphanesi geliştirilerek aşılabılır [24]. Dermatofitlerin MALDI-TOF MS tabanlı tanımlanmasına ilişkin incelemelerde, elde edilen piklerin kalitesini ve analizini iyileştirmek için numunenin doğrudan analizi yerine bir formik asit ekstraksiyon adımının uygulanması da önerilmektedir [24].

Ek kısıtlamalar arasında; tanımlama için yeterli miktarda numuneye ihtiyaç duyulması, bir numunede birden fazla mantar türü varsa güvenilir olmayan sonuçlar, yüklenen numuneler

arasında yayılma-karışma, ilk ekipman kurulum maliyeti, özel cihazlar konusunda eğitim personeli ve çalışmalar arasında uygun yapılmayan temizlik işlemi sayılabilir [1].

### **Antikor saptama temelli teknikler**

Enzim bağlı immünosorbent testi (ELISA), çeşitli hastalıkların tanısı için kullanılabilen yaygın bir antikor-antijen bazlı testtir ve direkt, indirekt, sandviç ve rekabetçi/inhibisyon ELISA teknikleri ile farklı avantajlar ve dezavantajlar sunmaktadır. ELISA testleri, klinik olgulardan alınan serum numunelerinde dermatofit enfeksiyonlarının tanısı için geliştirilmiştir. Enfeksiyon temizlendikten sonra antikor varlığı devam edebildiğinden, bu testler ile yanlış pozitiflikler ortaya çıkabilmekte, ek olarak test serum örneği alınmasını gerektirir ve bu durum numune toplamayı diğer tanı yaklaşımlarından daha invaziv hale getirir [1].

### **Moleküler tanı teknikleri**

Dermatofitlerin klinik örneklerden izolasyonu ve tanımlanması, dermatofitoz tanısında altın standart yöntem olarak kabul edilmektedir. Bununla birlikte, dermatofit mantarların kültürde üremesi ve sporlanması genellikle uzun zaman alır ve bu da tanının gecikmesine neden olur [24]. Ayrıca, fenotipik tekniklerin, farklı türler arasındaki dikkate değer morfolojik benzerlikler nedeniyle uzman deneyimi gerektirmesi, yoğun emek ve genellikle uzun bir geri dönüş süresi nedeni ile PCR gibi moleküler teknikler dermatofitleri saptamak ve tanımlamak için artan sıklıkta kullanılan tanısız yöntemler olmuştur [28,32]. PCR, kültür negatif olsa bile mantar DNA'sını tespit edebildiği için kültürden daha duyarlı bir tekniktir, ancak mikroskopiye benzer şekilde canlı ve ölü mantar hücrelerini ayırt edememektedir [1]. Yanlış negatif sonuçlar, uygun olmayan örnekleme tekniği ile meydana gelebilirken, konakçıda bulunan cansız mantarlar da yanlış pozitif sonuçlara yol açabilir [1].

Klinik örneklerden DNA ekstraksiyonu, fenol-kloroform yöntemi ile veya ticari olarak temin edilebilen DNA ekstraksiyon kitleri kullanılarak yapılabilir. DNA ekstraksiyon aşamasından önce, klinik örnekteki keratin yapılar parçalanmalıdır, bu mekanik yöntemle veya keratinin proteinaz K ile enzimatik parçalanması ile veya Na<sub>2</sub>S çözeltisiyle

enzimatik olmayan parçalanma ile elde edilebilir. Klinik örneklerde çok düşük miktarda mantar DNA'sı beklendiğinden, DNA izolasyon verimini artırmak için farklı yaklaşımlar da geliştirilmiştir. Moleküler tanı yönteminin saptama duyarlılığı, amplifikasyon için hedef DNA'nın seçimine ve spesifik ampikonu yüksek etkinlikle tespit edebilen tekniklerin uygulanmasına bağlıdır [24].

Dermatofitozların moleküler tanısı, başlıca klinik numunede dermatofitlerin doğrudan tespiti ve kültürde üretilen mantarların ileri tanımlaması ile ilgilidir [33]. Klinik örneklerden etiyolojik ajanın hızlı tespitine dayalı moleküler incelemeler PCR veya gerçek zamanlı (*real-time*) PCR ile yapılabilir [24]. Konvansiyonel PCR, belirli bir türün belirli primerlerle saptanması için yaygın olarak kullanılan, basit ve düşük maliyetli araçlardan biridir ve yorumu esas olarak agaroz jeldeki ampikon boyutuna dayanır [24]. Real-time PCR ise, dermatofitleri kültür ortamı veya klinik numunelerde doğrudan saptamayı ve tanımlamayı mümkün kılan hızlı ve hassas bir yaklaşımdır [24]. Real-time PCR kapalı bir tüp sisteminde yürütüldüğünden, kontaminasyon riskini azaltır ve türe özgü farklı problemler kullanılarak çok sayıda dermatofit türünün saptanmasına imkan verir [24,33]. Aynı anda birden çok tür tanımlama olanağı ise yöntemin diğer bir avantajıdır [33]. Klinik örneklerden birçok dermatofit türünü eş zamanlı olarak tespit edebilen multipleks PCR testleri [8] ve konvansiyonel PCR sonrası tanımlama için PCR-RFLP (*restriction fragment length polymorphism*) yöntemi gibi ikinci basamak testler de dermatofitlerin tanısında kullanılmıştır [24]. Yüksel ve İlkit [34], nadiren makrokonidya üreten 35 izolat dahil olmak üzere 64 dermatofit izolatını real-time PCR ile değerlendirmiş ve taksonomik olarak farklı 10 dermatofit türünün %100 duyarlılıkla doğru tanımlanabildiğini göstermişlerdir.

Bir organizmanın tanımlanması, türe özgü primer, pan-dermatofit primer veya pan-fungal primerler gibi çeşitli primer çiftleri kullanılarak gerçekleştirilebilir [24]. Dermatofit tespiti ve tanımlaması için kalitatif (genel) PCR testleri genellikle korunmuş gen bölgeleri olan ITS gen bölgesini hedefler, bu gen bölgesi genel olarak çeşitli mantar türlerini tanımlamada kullanıldığı

gibi birçok dermatofit izolatını da tür düzeyinde tanımlayabilmekte ve dermatofitlerin filogenetik analizinde kullanılmaktadır [1,8,24,35]. Ayrıca, nükleer rDNA, mitokondriyal DNA (mtDNA), kitin sentaz 1 (*chs1*), topoizomeraz II (TOP2) geni, küçük (18S rRNA) ve ribozomal RNA'nın büyük alt birimi (28S rRNA) gibi major hedef genler kullanılarak farklı dermatofit türlerinin tanımlanması için çeşitli konvansiyonel PCR yöntemleri de geliştirilmiştir [8]. Pozitif olgularda renk reaksiyonu üreten enzim etiketli prob yardımıyla PCR ile amplifiye edilmiş ürünü spesifik olarak tanımlayabilen PCR-ELISA'nın kullanımını içeren yaklaşımlar da tanımlanmıştır [8,24,33].

Günümüzde, rDNA'nın ITS bölgesinin dizi analizi, dermatofitlerin tanımlanması için altın standart yöntem olarak kabul edilmektedir. Bununla birlikte, ITS-rDNA dizisine dayalı tanımlama, bazı dermatofit türlerinde gözlenebilen az sayıdaki nükleotit farklılığı gibi belirli sınırlamalara sahiptir. Dizileme yöntemi ayrıca yeni türlerin saptanmasına ve tanımlanmasına da yardımcı olmaktadır [24].

Farklı dermatofitoz etkenleri için tanımlanmış protokolleri bulunan ve yüksek duyarlılığa sahip olan nested PCR, prosedürde yer alan birbirini takip eden iki amplifikasyon adımı nedeniyle kontaminasyon olasılığının artması nedeniyle klinik tanı için önerilmemektedir [24].

PCR dışında rasgele çoğaltılmış polimorfik DNA (*random amplified polymorphic DNA*, RAPD), PCR parmak izi, çoğaltılmış fragman uzunluğu polimorfizmi (*amplified fragment length polymorphism*, AFLP) ve mikrosatellit marker sekans analizi yöntemleri dermatofitlerin tür düzeyinde tanımlanmasında başarıyla kullanılmış, ancak bazı durumlarda kökenler (*strains*) arasında ayırım yapılamamıştır [8]. Tür tanımlama için "altın standart" olarak kabul edilen yöntem olan DNA dizileme ise maliyetli ve emek-yoğun bir prosedür olması nedeni ile rutin tanı laboratuvarlarında yaygın kullanım alanı bulmamıştır [32].

### **Dermatofitoz tanısı için potansiyel hedefler**

Dermatofitozun saptanması ve tanısı için mevcut tanı yöntemlerinin, özellikle klinik ortamlarda, çeşitli dezavantajları vardır. Ana zorluklardan biri; özellikle tedavi uygulandıktan

sonra, ölü ve canlı mantarlar arasında ayırım yapılamamasıdır. Bu engelin üstesinden gelmek için potansiyel bir yaklaşım, dermatofite özgü metabolik ürünleri hedeflemektir, çünkü bu metabolitlerin varlığı canlı ve metabolik olarak aktif mantarları göstermektedir. Dermatofitler, basit kimyasallardan karmaşık proteinlere kadar çeşitli benzersiz metabolik ürünler üreterek, tanı testleri için çok çeşitli potansiyel hedefler sunarlar. Diğer mantarlar ile karşılaştırıldığında, dermatofit genomları, proteazlar dahil olmak üzere daha fazla sayıda ikincil metaboliti kodlar. Dermatofitlere özgü metabolik yollar, floresan

metabolitlerin üretimi, başlıca keratin yıkımında görevli dermatofite özgü proteazlar ve sülfid akış pompası (SSU1) ile ilişkili hedefler potansiyel tanı araçları olarak değerlendirilmektedir [1].

## Sonuç

Dermatofit enfeksiyonlarında etkenin doğru ve hızlı tanımlanması hasta yönetimi ve uygun tedavilerin planlanması için anahtar roller üstlenir. Tedavi rejimlerinin içeriği ve süresi dermatofit türleri için farklılık gösterebileceğinden, dermatofitozdan sorumlu etiyolojik ajanın izolasyonu ve tanımlanması önem arz eder.

**Çıkar beyanı:** Yazarlar çıkar çatışması bildirmemiştir. Makalenin içeriğinden ve yazılmasından tek başına yazarlar sorumludur. **Finansal destek:** Bu çalışmaya finansal destek verilmemiştir.

## Kaynaklar

1. Moskaluk AE, VandeWoude S. Current Topics in Dermatophyte Classification and Clinical Diagnosis. *Pathogens* 2022; 11(9): 957. [Crossref] [PubMed]
2. Jain S, Kabi S, Swain B. Current Trends of Dermatophytosis in Eastern Odisha. *J Lab Physicians* 2020; 12(1): 10-14. [Crossref] [PubMed]
3. Aboul-Ella H, Hamed R, Abo-Elyazeed H. Recent trends in rapid diagnostic techniques for dermatophytosis. *Int J Vet Sci Med* 2020; 8(1): 115-23. [Crossref] [PubMed]
4. Gürçan S, Tikveşli M, Eskiocak M, Kiliç H, Otkun M. Investigation of the agents and risk factors of dermatophytosis: a hospital-based study. *Mikrobiyol Bul* 2008; 42(1): 95-102. [PubMed]
5. Drake LA, Dinehart SM, Farmer ER, Goltz RW, Graham GF, Hardinsky MK, et al. Guidelines of care for superficial mycotic infections of the skin: tinea corporis, tinea cruris, tinea faciei, tinea manuum, and tinea pedis. Guidelines/Outcomes Committee. *American Academy of Dermatology. J Am Acad Dermatol* 1996; 34(2 Pt 1): 282-6. [Crossref] [PubMed]
6. Yang Z, Chen W, Wan Z, Song Y, Li R. Tinea Capitis by *Microsporum canis* in an Elderly Female with Extensive Dermatophyte Infection. *Mycopathologia* 2021; 186(2): 299-305. [Crossref] [PubMed]
7. Park SK, Park SW, Yun SK, Kim HU, Park J. Tinea capitis in adults: A 18-year retrospective, single-centre study in Korea. *Mycoses* 2019; 62(7): 609-16. [Crossref] [PubMed]
8. Samanta I. Cutaneous, Subcutaneous and Systemic Mycology. *Veterinary Mycology* 2015: 11-153. [Crossref] [PubMed]
9. Rashid A. Arthroconidia as vectors of dermatophytosis. *Cutis* 2001; 67(5 Suppl): 23. [PubMed]
10. Kidd SE, Abdolrasouli A, Hagen F. Fungal Nomenclature: Managing Change is the Name of the Game. *Open Forum Infect Dis* 2023; 10(1): ofac559. [Crossref] [PubMed]
11. Borman AM, Johnson EM. Name Changes for Fungi of Medical Importance, 2020 to 2021. *J Clin Microbiol* 2023; 61(6): e0033022. [Crossref] [PubMed]
12. Pérez-Rodríguez A, Duarte-Escalante E, Frías-De-León MG, Acosta Altamirano G, Meraz-Ríos B, Martínez-Herrera E, et al. Phenotypic and Genotypic Identification of Dermatophytes from Mexico and Central American Countries. *J Fungi (Basel)* 2023; 9(4): 462. [Crossref] [PubMed]
13. de Hoog GS, Dukik K, Monod M, Packeu A, Stubbe D, Hendrickx M, et al. Toward a Novel Multilocus Phylogenetic Taxonomy for the Dermatophytes. *Mycopathologia* 2017; 182(1-2): 5-31. [Crossref] [PubMed]
14. Taylor JW. One Fungus = One Name: DNA and fungal nomenclature twenty years after PCR. *IMA Fungus* 2011; 2(2): 113-20. [Crossref] [PubMed]
15. Segal E, Elad D. Human and Zoonotic Dermatophytoses: Epidemiological Aspects. *Front Microbiol* 2021; 12: 713532. [Crossref] [PubMed]
16. Normand AC, Moreno-Sabater A, Jabet A, Hamane S, Cremer G, Foulet F, et al. MALDI-TOF Mass Spectrometry Online Identification of Trichophyton indotineae Using the MSI-2 Application. *J Fungi (Basel)* 2022; 8(10): 1103. [Crossref] [PubMed]
17. Gaviria Morales E, Iorizzo M, Martinetti Lucchini G, Mainetti C. Trichophyton violaceum: An Emerging Pathogen in Southern Switzerland. *Dermatology* 2019; 235(5): 434-9. [Crossref] [PubMed]
18. Calander S, Saunte DML, Polesie S. Tinea Capitis Caused by *Microsporum audouinii*: Lessons from a



Swedish Community Outbreak. *Acta Derm Venereol* 2021; 101(9): adv00551. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]

**19.** Brasch J, Müller S, Gräser Y. Unusual strains of *Microsporum audouinii* causing tinea in Europe. *Mycoses* 2015; 58(10): 573-7. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]

**20.** Nenoff P, Overbeck C, Uhrlaß S, Krüger C, Gräser Y. Tinea corporis due to the rare geophilic dermatophyte *Microsporum praecox*. *Hautarzt* 2017; 68(5): 396-402. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]

**21.** Gong JQ, Liu XQ, Xu HB, Zeng XS, Chen W, Li XF. Deep dermatophytosis caused by *Trichophyton rubrum*: report of two cases. *Mycoses* 2007; 50(2): 102-8. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]

**22.** Wang R, Huang C, Zhang Y, Li R. Invasive dermatophyte infection: A systematic review. *Mycoses* 2021; 64(4): 340-8. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]

**23.** Celestrino GA, Verrinder Veasey J, Benard G, Sousa MGT. Host immune responses in dermatophytes infection. *Mycoses* 2021; 64(5): 477-83. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]

**24.** Rudramurthy SM, Shaw D. Overview and Update on the Laboratory Diagnosis of Dermatophytosis. *Clinical Dermatology Review* 2017; 1(Suppl 1): S3-S11. [[Crossref](#)]

**25.** Asawanonda P, Taylor CR. Wood's light in dermatology. *Int J Dermatol* 1999; 38(11): 801-7. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]

**26.** Klatte JL, van der Beek N, Kemperman PM. 100 years of Wood's lamp revisited. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2015; 29(5): 842-7. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]

**27.** Leck A. Preparation of lactophenol cotton blue slide mounts. *Community Eye Health* 1999; 12(30): 24. [[PubMed](#)]

**28.** Theel ES, Hall L, Mandrekar J, Wengenack NL.

Dermatophyte identification using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol* 2011; 49(12): 4067-71. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]

**29.** Moriello KA, Verbrugge MJ, Kesting RA. Effects of temperature variations and light exposure on the time to growth of dermatophytes using six different fungal culture media inoculated with laboratory strains and samples obtained from infected cats. *J Feline Med Surg* 2010; 12(12): 988-90. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]

**30.** Taplin D, Zaias N, Rebell G, Blank H. Isolation and recognition of dermatophytes on a new medium (DTM). *Arch Dermatol* 1969; 99(2): 203-9. [[PubMed](#)]

**31.** Hoşbul T, Şahiner F, Gümral R, Kaya S, Bektöre B, Tekin K, et al. Moleküler ve geleneksel yöntemlerle tanımlanarak uzun süre saklanmış stok *Candida* kökenlerinin MALDI-TOF MS ile analizi. *J Ist Faculty Med* 2021; 84(1): 113-9. [[Crossref](#)]

**32.** Baumbach CM, Müller S, Reuschel M, Uhrlaß S, Nenoff P, Baums CG, et al. Identification of Zoophilic Dermatophytes Using MALDI-TOF Mass Spectrometry. *Front Cell Infect Microbiol* 2021; 11: 631681. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]

**33.** Jensen RH, Arendrup MC. Molecular diagnosis of dermatophyte infections. *Curr Opin Infect Dis* 2012; 25(2): 126-34. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]

**34.** Yüksel T, Ilkit M. Identification of rare macroconidia-producing dermatophytic fungi by real-time PCR. *Med Mycol* 2012; 50(4): 346-52. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]

**35.** Sahiner F, Ergünay K, Ozyurt M, Ardıç N, Hoşbul T, Haznedaroğlu T. Phenotypic and genotypic identification of *Candida* strains isolated as nosocomial pathogens. *Mikrobiyol Bul* 2011; 45(3): 478-88. [[PubMed](#)]