

Onikomikozlu Olguların Direkt Tırnak Kazıntı Örneklerinden DNA İzolasyonu ve Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile *Trichophyton rubrum* Tanımlanması*

DNA Extraction and Identification of *Trichophyton rubrum* by Real-Time Polymerase Chain Reaction from Direct Nail Scraping Specimens of Patients with Onychomycosis

Elife BERK¹, Semra KUŞTİMUR², Ayşe KALKANCI², O. Murat ÖZTAŞ³

¹ SB Kayseri Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Mikrobiyoloji Kliniği, Kayseri.

¹ Kayseri Research and Training Hospital, Microbiology Clinics, Kayseri, Turkey.

² Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

² Gazi University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Ankara, Turkey.

³ Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Dermatoloji Anabilim Dalı, Ankara.

³ Gazi University Faculty of Medicine, Department of Dermatology, Ankara, Turkey.

* Bu çalışma, ilk yazının tıpta uzmanlık tez çalışması olup, XXXIII. Türk Mikrobiyoloji Kongresi (21-25 Ekim 2008, Bodrum)'nde sunulmuştur.

Geliş Tarihi (Received): 17.02.2010 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 07.10.2010

ÖZET

Trichophyton rubrum, onikomikoz etkenleri arasında en sık karşılaşılan dermatofit türlerindedir. Dermatofitlerin rutin tanısı direkt mikroskopik inceleme (DMI) ve kültür yöntemlerine dayanmakla birlikte, etkenin fenotipik olarak tanımlanmasındaki sorunlar, moleküler yöntemlerin gündeme gelmesine neden olmuştur. Bu çalışmada, onikomikoz şikayetleri olan hastaların tırnak örneklerinde, *T. rubrum*'a özgül gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) yönteminin tanısıl performansının, direkt mikroskopi ve kültür yöntemleri ile karşılaştırılması ve erken tanıya olan katkısının değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Çalışmaya, hastanemizin dermatoloji polikliniğine el ve ayak tırnaklarında renk/şekil değişikliği ve kalınlaşma şikayetleriyle başvuran 58'i erkek 90 hasta ile kontrol olarak tamamen sağlıklı 20 gönüllü dahil edilmiştir. Hasta ve kontrollerden alınan tırnak kazıntı örnekleri, %15 potasyum hidroksit, dimetil sülfoksit ve klorazol siyahı karışımı ile direkt mikroskopik olarak incelenmiş ve sikloheksimit içeren ve içermeyen Sabouraud dekstroza agarda kültürleri yapılmıştır. DNA izolasyonu için tırnak örnekleri çelik bir parçalayıcı

İletişim (Correspondence): Prof. Dr. Semra Kuştımur, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, 06500, Beşevler, Ankara, Türkiye. **Tel (Phone):** +90 312 202 4629, **E-posta (E-mail):** kustimur@gazi.edu.tr

ile ezilmiş ve fenol-kloroform-izoamil alkol saflaştırma yöntemi uygulanmıştır. *T.rubrum* DNA'sının çoğaltılması ve gösterilmesi, özgül primerler ve problarla TaqMan protokolü kullanılarak RT-PCR yöntemi (LightCycler-Roche, ABD) ile yapılmıştır. DMI ile 72 hasta pozitif, 18 hasta ise negatif sonuç vermiş; DMI pozitif olan hastaların %27.8 (20/72)'inin kültüründe dermatofit üremesi olmuş ve tüm izolatlar *T.rubrum* olarak tanımlanmıştır. DMI negatif bulunan 18 örneğin hiçbirinin kültüründe üreme olmamıştır. DMI ile pozitif saptanan 72 hastanın 67 (%93)'si ve DMI negatif bulunan 18 hastanın 8 (%44.4)'i PCR ile pozitif sonuç vermiştir. Kültüründe *T.rubrum* üretilen tüm örnekler (n= 20) PCR ile de pozitif bulunmuştur. Sağlıklı tırnaklara sahip 20 gönüllüden alınan örneklerin hepsi DMI, kültür ve PCR ile negatif sonuç vermiştir. PCR yönteminin performansı, kültürden daha yüksek duyarlılığa sahip olan DMI sonuçları ile karşılaştırılmış ve PCR'nin duyarlılık, özgüllük, pozitif ve negatif prediktif değerleri sırasıyla; %93, %56, %89 ve %67 olarak hesaplanmıştır. Çalışmamızda, RT-PCR'nin tanı açısından etkin ve hızlı bir yöntem olduğu izlenmiş; maliyet açısından da her ne kadar pahalı gibi görünse de alt yapısı hazır merkezlerde kültür ile arasında önemli bir fark olmayacağı düşünülmüştür. Sonuç olarak, dermatofitlerin tanısında moleküler bir yöntem kullanılarak tırnak kazıntısı gibi zor bir klinik örnekten DNA elde edilebilmiş, rutin uygulamada kullanılabilecek bir protokol oluşturulmuş ve kısa sürede tür tanımları yapılabilmektedir.

Anahtar sözcükler: Onikomikoz; *Trichophyton rubrum*; tanı; polimeraz zincir reaksiyonu; tırnak kazıntısı.

ABSTRACT

Trichophyton rubrum is the most frequently encountered dermatophyte species causing onychomycosis. The routine diagnosis of dermatophytes depends on the direct microscopic examination (DME) and culture methods, however due to the phenotypic identification problems related to those agents, the molecular methods come into question. The aim of this study was to evaluate the diagnostic performance of real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) for the identification of *T.rubrum* by comparing to DME and culture methods, from nail samples of patients with the complaints of onychomycosis. A total of 90 patients of whom 58 were male who were admitted to the dermatology outpatients clinics of our hospital with the complaints of color/shape changes in the nails and thickening of the nail, were included in the study, together with the 20 healthy volunteer subjects as controls. The nail scraping samples obtained from the patients and controls were examined with direct microscopy using 15% potassium hydroxide, dimethyl sulphoxide and chlorazole black mixture and cultivated onto Sabouraud dextrose agar with and without cycloheximide. For DNA isolation, after the disruption of nail samples with a steel tool, phenol-chloroform-isoamyl alcohol purification method were used. The amplification and demonstration of the *T.rubrum* DNA have been performed by using specific primers and probes following TaqMan protocol of RT-PCR (LightCycler-Roche, USA) method. Seventy-two of the patients yielded positive and 18 yielded negative results with DME. Growth of molds was detected in the cultures of 20 (27.8%) of the 72 DME positive patients and all of the isolates were identified as *T.rubrum*. No fungal growth was seen in the samples of 18 patients who were DME negative. In DME positive group, 67 (93%) patients were found to be positive in RT-PCR, while 8 (44.4%) patients were RT-PCR positive in DME negative group. All of the culture positive samples (n= 20) were also found positive in RT-PCR. All of the samples from the control group with healthy nails yielded negative results in DME, culture and RT-PCR methods. The performance of PCR method were compared to direct microscopy that had higher sensitivity than culture and the sensitivity, specificity, positive and negative predictive values of RT-PCR assay were estimated as 93%, 56%, 89% and 67%, respectively. In conclusion RT-PCR was thought to be an efficient and rapid assay in the diagnosis of onychomycosis. Although RT-PCR seems more expensive than culture, for the centres which already have support for the molecular methods, the difference in total cost doesn't count much. In conclusion, by the use of molecular methods DNA isolation was successfully done from a relatively difficult clinical specimen, namely nail scraping, a protocol that could easily be applied in routine laboratory was established and species-level identification in a short time was accomplished in this study.

Key words: Onychomycosis; *Trichophyton rubrum*; diagnosis; polymerase chain reaction; nail scrapings.

GİRİŞ

Onikomikoz, görülme sıklığı giderek artan bir enfeksiyon olup, tırnak problemleri arasında ilk sırayı almaktadır¹. Bu artışın sebepleri arasında; yaşam süresinin uzaması, uzun süreli antibiyotik kullanımı, bağıışıklığı baskılayan hastalıklarda artış, diyabet ve periferik dolaşım bozuklukları gibi hastalıklar, sentetik çorap ve uygun olmayan ayakkabı kullanımı, ortak kullanılan kişisel eşyalar, banyo ve yüzme havuzları gibi birçok faktör sayılabilir².

Trichophyton rubrum başta olmak üzere dermatofitler onikomikozun en sık görülen etkenidir³. Dermatofitlerin rutin tanısı direkt mikroskopik inceleme (DMI) ve kültürü içerir. Potasyum hidroksit (KOH) ile mantar elemanlarının görülme olasılığı ve kültür başarısı %25-80 arasında değişmektedir⁴. DMI, hızlı, kolay, ucuz ve etkin yöntemlerden biridir; ancak bu yöntemle etkenin cins veya tür ayrımı yapılamamaktadır⁵. Dermatomikoz etkenlerinin tür düzeyinde tanımlanabilmesi, ancak kültürde üretilmeleri ile mümkündür. Etkenin tanımlanması, epidemiyolojik verilerin yanı sıra etkin bir tedavi için de gereklidir. Onikomikoz, uzun süreli antimikotik kullanımını gerektirmesi nedeniyle günümüzde tedavisi en pahalı hastalıklardan biridir¹. Özellikle dermatofit dışı küflerin etken olduğu tırnak ve deri enfeksiyonlarında etkenler, dermatofitoz tedavisinde kullanılan antifungal ilaçlara dirençli olabileceklerinden, kesin tanının yapılması gereklidir³.

Dermatofitlerin tanımlanması besiyerindeki koloninin özelliklerine ve mikroskopik morfolojilerine göre yapılır; gerekli görülürse fizyolojik testlere başvurulur. Dermatofitlerin üretilmeleri sıcaklık, besiyeri, hastanın kemoterapötik ilaç kullanımı gibi dış faktörlerden kolaylıkla etkilenmektedir. Kültür için bir ay gibi uzun bir süre beklenmekte ve tür tanımlanmasında sıkıntıya yol açmaktadır. Mikroskopi ve kültür gibi rutin tanı yöntemlerinin deneyimli personel ve zaman gerektirmesi, bütün hastalıklarda olduğu gibi erken özgül tanı ve tedavi gereksinimlerine bağlı olarak moleküler tanı yöntemlerini ön plana çıkarmaktadır⁶.

Bu çalışmada, onikomikoz şikayetleri olan hastalara ait tırnak kazıntı örneklerinde, *T.rubrum*'a özgül gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yönteminin tanısal performansının, direkt mikroskopi ve kültür yöntemleri ile karşılaştırılması ve erken tanıya olan katkısının değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Etik Kurul onayı ile gerçekleştirilen bu çalışmaya, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Dermatoloji Anabilim Dalı Polikliniğine, el ve ayak tırnaklarında renk ve şekil değişikliği ve tırnakta kalınlaşma şikayetiyle başvuran 90 hasta (32 kadın, 58 erkek) dahil edildi. Bu hastalardan alınan tırnak kazıntı örnekleri, önce poliklinikte yapılan DMI ile değerlendirildi. DMI pozitif bulunan 72 hasta onikomikoz ön tanılı grup, negatif bulunan 18 hasta ise şüpheli kontrol grubu olarak sınıflandırıldı. Ayrıca, tamamen sağlıklı laboratuvar çalışanı 20 gönüllüden alınan tırnak kazıntı örnekleri de sağlıklı kontrol grubu olarak ayrıldı. Tüm örnekler DMI, kültür ve PCR yöntemlerinde kullanılmak üzere ependorf tüplere bölündü.

Hastalardan poliklinikte alınan ve Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarına gönderilen tırnak kazıntı örnekleri, burada tekrar direkt mikroskopik incelemeye tabi tutuldu. Bu amaçla, temiz bir lam üzerine konulan örneklerin üzerine %15 KOH, dimetil sülfoksit (DMSO) ve klorazol siyahı içeren karışımdan damlatılıp lamel kapatıldı⁵. Hazırlanan preparatlar oda ısısında 20 dakika bekletildikten sonra hif varlığı açısından incelendi.

Kültür için örnekler, sikloheksimit içeren ve içermeyen, yatay cam tüplerde hazırlanmış Sabouraud dekstroz agar (SDA) besiyerlerine ekildi ve hem oda ısısında hem de 37°C'de bir ay süreyle inkübe edildi. Ekim yapılan tüpler gün aşırı kontrol edildi ve üreyen koloniler makroskopik ve mikroskopik olarak değerlendirildi. Üremiş olan küf kolonileri selofan bant yöntemiyle incelendi. Mikroskopik inceleme ile tanıda şüpheye düşüldüğü durumlarda, fizyolojik testlerden yararlanıldı⁴. *T.rubrum* ile *Trichophyton mentagrophytes* ayrımı üreaz testi ile doğrulandı.

PCR için DNA eldesi amacıyla, 1.5 ml'lik ependorflara konulmuş olan tırnak örnekleri çelik bir parçalayıcı yardımıyla ezildi. Ependorflar buz kabına konularak üzerine sıvı nitrojen eklendi ve 2-3 dakika beklendi. Ependorflara 400 µl parçalama solüsyonundan [100 mM Tris HCl, 30 mM EDTA (pH: 8), %0.5 SDS] eklendi ve 100°C'de 15 dakika kuru ısı bloğunda tutuldu. Tüpler 14.000 rpm'de iki dakika santrifüj edildikten sonra DNA içeren üst sıvı yeni bir tüpe alındı. Daha sonra fenol-kloroform-izoamil alkol (25.24.1) saflaştırma yöntemi uygulandı. DNA örnekleri 30 µl Tris-EDTA (TE) tampunu içinde -20°C'de bekletildi. Çalışmada pozitif kontrol olarak *T.rubrum* olarak tanımlanmış küf kolonisi kullanıldı.

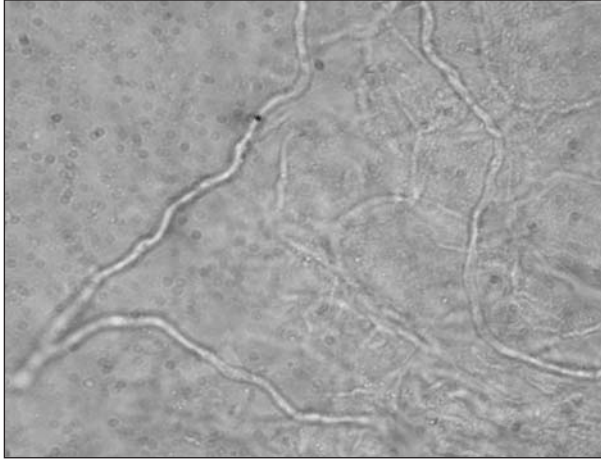
T.rubrum DNA'sının çoğaltılması ve gösterilmesi, gerçek zamanlı PCR yöntemi (Real Time PCR, LightCycler-Roche, ABD) ile yapıldı. Bu amaçla *T.rubrum*'a özgül primerler (5'-CGGAG-GACAGACACCAAGAA-3' ve 5'-ATTCGCTGCGTTCTTCATC-3') ve FAM ve TAMRA ile işaretlenmiş probalar kullanılarak (FAM-CAGTCTGAGCGTTTAGCAAGCACAATC-TAMRA) TaqMan protokolü uygulandı. DNA'nın çoğaltılması için enzim içeren Roche LightCycler FastStart DNA Master^{PLUS}HybProbe kiti kullanıldı. Veri analizleri LightCycler Software version 4.0.0.23 ile yapıldı. Veriler 530 kanalından "absolute quantification" analizi ile değerlendirildi.

Onikomikoz tanısında KOH ve/veya klorazol ile yapılan direkt mikroskopi yönteminin duyarlılığının kültürden daha yüksek olması nedeniyle⁷⁻⁹, PCR yönteminin performansı, DMİ sonuçları ile karşılaştırılarak belirlendi.

BULGULAR

Klinik şikayetler ile dermatoloji anabilim dalı kliniğine başvuran ve poliklinikte yapılan ilk DMİ sonucu pozitif bulunan 72 onikomikoz ön tanılı hasta ile DMİ sonucu negatif bulunan 18 şüpheli hastanın tırnak örnekleri, mikrobiyoloji anabilim dalı laboratuvarında yapılan ikinci DMİ ile de aynı sonuçları vermiştir (Resim 1).

DMİ pozitif olan 72 hastanın 20 (%27.8)'sinde *T.rubrum* üremesi olmuş; bu hastaların hiçbirisinde dermatofit dışı küf mantarı görülmemiştir. Şikayeti olan, ancak DMİ negatif bulunan 18 hastanın tırnak örneklerinin kültüründe ise üreme olmamıştır.



Resim 1. Tırnak örneğinin direkt mikroskopik incelemesinde hiflerin varlığı (40X).

DMI ile pozitif saptanarak onikomikoz ön tanısı alan 72 hastanın 67 (%93)'si ve DMI negatif bulunan 18 hastanın 8 (%44.4)'i PCR ile pozitif sonuç vermiştir (Şekil 1). Kültüründe *T.rubrum* üretilen tüm örnekler (n= 20) PCR ile de pozitif bulunmuştur.

Sağlıklı tırnaklara sahip 20 gönüllüden alınan kontrol grubu örneklerinin hiçbirisinde DMI, kültür ve PCR ile pozitif sonuç saptanmamıştır.

Direkt mikroskopi ile karşılaştırıldığında, PCR yönteminin duyarlılık, özgüllük, pozitif ve negatif prediktif değerleri sırasıyla; %93, %56, %89 ve %67 olarak hesaplanmıştır (Tablo I).

TARTIŞMA

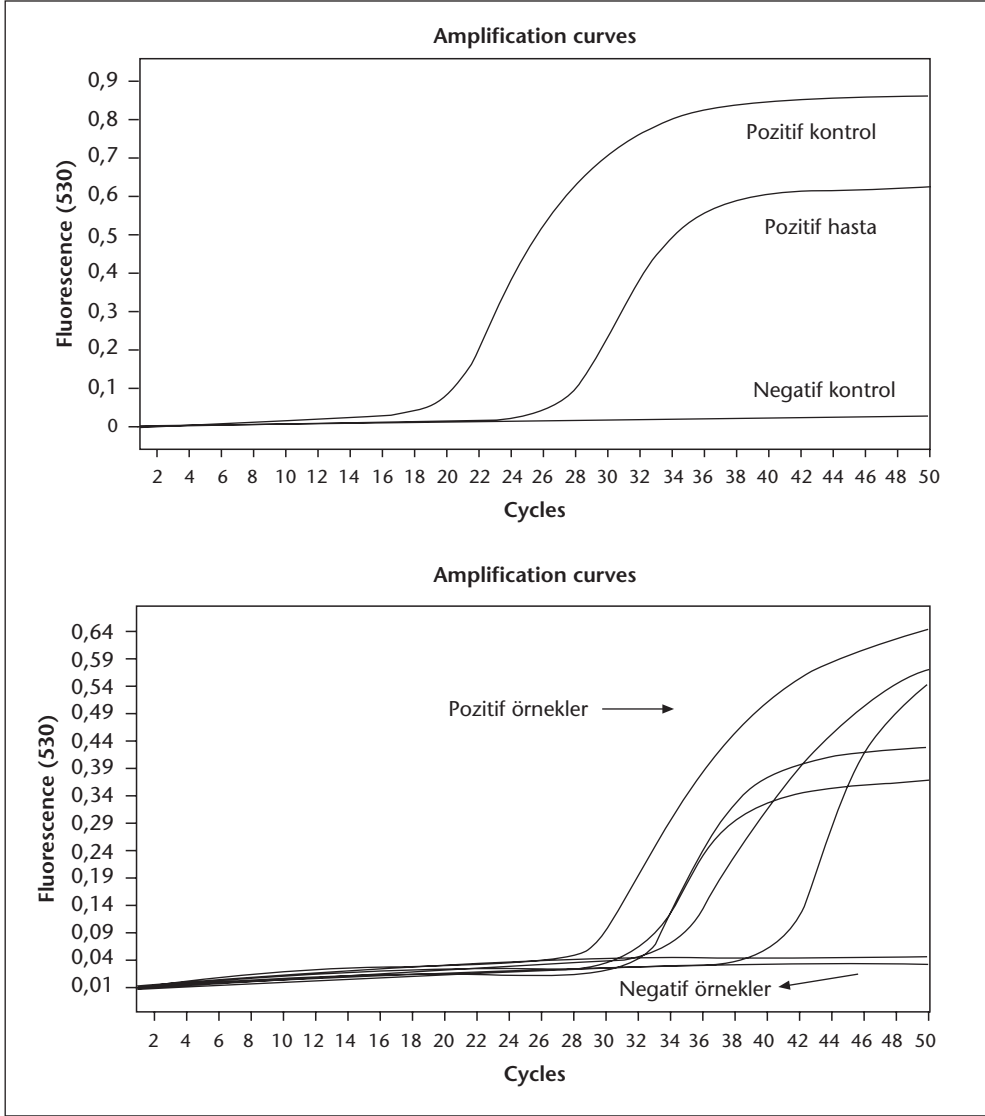
Yapılan çalışmalarda, ülkemizde onikomikoz ve tinea pedis sıklığı bölgelere ve çalışma gruplarına göre değişiklik göstermekle birlikte %21-70 arasında bildirilmektedir^{2,10-14}. Kuştimur ve El-Nahi¹⁰ çalışmalarında, Balgat ve çevresinde en sık tinea pedis enfeksiyonu bulunduğunu, bölgenin dermatofit florasında *T.mentagrophytes* ve *T.rubrum*'un bas-

Tablo I. Onikomikoz Şikayeti Olan Hastalarda Direkt Mikroskopi ve *T.rubrum* PCR Yöntemlerinin Karşılaştırmalı Sonuçları

PCR	Direkt mikroskopi		Toplam
	Pozitif	Negatif	
Pozitif	67*	8	75
Negatif	5	10	15
Toplam	72	18**	90

* Bu grupta 20 hastanın kültüründe *T.rubrum* üretilmiştir.

** Bu grubun kültürlerinde dermatofit üremesi olmamıştır.



Şekil 1. *T. rubrum* DNA'sının bulunduğu ve bulunmadığı örneklerde LightCycler ekranında floresansın gösterilmesi.

kın olduğunu, onikomikozlu hastalardan en sık *T. rubrum*, ikinci sırada *T. mentagrophytes* izole ettiklerini bildirmişlerdir. İkit ve arkadaşları¹², onikomikozlu olgulardan alınan 98 kültür pozitif örneğin 74 (%75.5)'ünden dermatofit, 24 (%24.5)'ünden ise maya izole etmiş; dermatofitler arasında en sık *T. rubrum* (%48) ve *T. mentagrophytes* var. *interdigitale* (%26.6), mayalar arasında ise en sık *Candida tropicalis* (%11.2) ve *Candida albicans* (%9.2)'ı saptamışlardır.

Onikomikozun standart tanısı, direkt mikroskopide mantar elemanlarını görmek ve kültürde patojen organizmayı üretmekle konulur^{1,4}. Yapılan çalışmalarda DMİ'lerde farklı sonuçlar elde edilmiştir^{5,7-9,15}. Bizim çalışmamızda, el ve ayak tırnaklarında renk/şekil değişikliği ve kalınlaşma gibi onikomikoz şikayetleri olan 90 hastanın 72 (%80)'sinde DMİ ile pozitiflik saptanmıştır. Mikroskopik incelemede yanlış negatif sonuç alınmasının en yaygın nedeni, örneğin yanlış yerden alınmasıdır. Ayrıca, klinisyenin deneyiminin eksik olması, materyali incelemek için yeterince zaman ayrılması ve bozulmuş KOH solüsyonu kullanılması da yanlış negatif sonucun nedenleri arasındadır. DMİ'de yanlış pozitif sonuçlar ise, artefakt yoğunluğu ve normal keratinosit hücre duvarının yanlışlıkla hif olarak yorumlanması nedeniyle olabilir. Bu yöntemin duyarlılığının artırılması için çeşitli boya ile KOH'nin kombinasyonu gündeme gelmiştir⁵. Bizim çalışmamızda direkt inceleme için KOH-klorazol boyası ve DMSO karışımı kullanılmıştır.

Dermatofitoz tanısında kültür yönteminin özgüllüğü yüksek olmakla birlikte duyarlılığı oldukça düşük olup, dermatofitlerin kültürden izolasyon oranı %20-60 arasında değişmektedir^{7-9,14,15}. Bizim çalışmamızda kültürde pozitiflik oranı %27.8 (20/72) olarak saptanmış ve üretilen tek mantar türü *T.rubrum* olmuştur. Hastalardan sadece bir kez örnek alınabildiği için dermatofit dışı küfler ve saprofit olarak da görülebilen mayalar etken olarak kabul edilmemiştir.

Dermatofit enfeksiyonlarında etkenin fenotipik olarak tanımlanmasındaki sıkıntılar, moleküler yöntemlerin gündeme gelmesine neden olmuştur. Farklı çalışmalarda farklı PCR yöntemleri kullanılmış, ancak altın standart bir moleküler yöntem belirtilmemiştir. Panfungal primerler kullanılarak gerçekleştirilen çalışmalardan birisi, dermatolojik örneklerden tür düzeyinde moleküler tanının amaçlandığı Turin ve arkadaşlarının⁶ çalışmasıdır. Bu çalışmada; *Microsporum*, *Trichophyton*, *Candida* ve *Aspergillus* cinslerinden toplam 17 türe ek olarak *Malassezia pachydermatis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Cryptococcus neoformans*, *Penicillium*, *Acremonium* ve *Trichoderma* türleri de "internal transcribed spacer" (ITS) 1 ve ITS 4 primer çifti ile test edilmiş, sekiz farklı amplikon elde edilebilmiştir. Araştırmacılar bu yöntemle *Aspergillus* türlerinde başarısız olmuş, *T.mentagrophytes* ve *T.rubrum*'u ise ayırt edememişlerdir⁶. Garg ve arkadaşları¹⁶ kitin sentaz genine özgül primerler kullanarak, tüm dermatofit türlerine özgül (pandermatofit) "nested" PCR ile yaptıkları çalışmada, bu yöntemin standart PCR'den daha yüksek duyarlılığa sahip olduğunu ve onikomikoz tanısında altın standart olabileceğini ifade etmişlerdir. *T.rubrum*'a özgül primerler kullanılarak yapılan PCR'nin özgüllüğünün, ITS gibi daha homojen bir bölgeyi hedef olarak içeren çalışmalardan daha başarılı olduğu düşünülmektedir. Gupta ve arkadaşlarının¹⁷ yaptığı çalışmada, *T.rubrum*'a özgül aktin gen bölgesi hedef alınmış ve duyarlılığının ITS 1 ve ITS 4 ile yapılan PCR'ye göre daha yüksek olduğu bildirilmiştir. Arabatzis ve arkadaşları¹⁸ dermatofit türlerinin karmaşık genom yapısından dolayı konvansiyonel PCR yöntemlerinin standart metoda alternatif olamayacağını, florofor probalar veya TaqMan prob kullanılarak gerçek zamanlı PCR'nin duyarlılığının daha fazla olduğunu belirtmişlerdir.

Bugüne kadar onikomikoz ile ilgili bu çalışmaların çoğunluğunda DNA ekstraksiyonu kültürden yapılmış çok az çalışmada direkt tırnak örneğinden DNA izolasyonu ba-

şarılabilmiştir. Bunlardan birisi, Arca ve arkadaşlarının¹¹ panfungal ITS 1 ve ITS 4 primerleri kullanarak yaptıkları çalışmadır. Bu çalışmada, onikomikozlu 52 olgudan alınan tırnak örneklerinin 40 (%77.7)'i KOH ile pozitif, 12 (%23)'si kültür pozitif ve 20 (%38)'si PCR pozitif olarak bulunmuş; kültür negatif 40 olgunun 14'ü, mikroskopi negatif 12 olgunun dördü ve hem mikroskopisi hem kültürü negatif olan dört örnek PCR ile pozitif sonuç vermiştir¹¹. Bizim çalışmamızda, direkt tırnak örneklerinden DNA izolasyonunda hazır ticari kit kullanılmamış, DNA izolasyonu sıvı azot, kaynatma ve ardından fenol-kloroform-izoamil alkol saflaştırma yöntemi kullanılarak yapılmıştır. Ayrıca çalışmamızda, amplifikasyon için özgülüğü yüksek TaqMan probu kullanılarak *T.rubrum* ve *T.mentagrophytes* ayrımı kesin olarak yapılabilmektedir. Dolayısıyla onikomikozlu olgularımızın tırnak örneklerinin %93 (67/72)'ünde PCR ile *T.rubrum* varlığı doğrulanmıştır. PCR yönteminin bir diğer avantajı da, dermatofitlerin tür tanımı için gereken iki-dört haftalık süreyi büyük ölçüde azaltmasıdır. Çalışmamızda bu yöntem ile bir saatte DNA izolasyonu tamamlanmış, bir saatte çoğaltılmış ve klasik yöntemlere göre kısa sürede sonuç elde edilebilmiştir.

Dermatofit enfeksiyonlarının tanısında kullanılan klasik yöntemler negatif sonuç verdiğinde veya tür tanımı yapılamadığında, moleküler bir yöntemin önerilmesi söz konusu olabilir¹⁹. Bu çalışma ile geliştirilmiş olan TaqMan PCR yaklaşımı bu açıdan değerlidir. Ancak yine de, uygulanabilecek ideal tek bir moleküler yöntemin olmadığı akıldan çıkarılmamalıdır. Moleküler tekniklerin bazılarının ayırım gücü, bazılarının ise tekrarlanabilirlikleri yüksektir. Bu nedenle moleküler tiplendirmede kullanılacak yöntem, amaca göre değişiklik göstermeli, yani bir teknik diğerinin yerini almak yerine ona katkıda bulunmalıdır. Moleküler yöntemler geleneksel yöntemlerin tamamlayıcısı olmalıdır. Literatür bilgileri, moleküler çalışmalar arasında standardizasyon olmaması sebebiyle dikkatle kıyaslanmalıdır.

KAYNAKLAR

1. Elewski BE. Onychomycosis: pathogenesis, diagnosis and management. Clin Microbiol Rev 1998; 11(3): 415-29.
2. Hilmioglu Polat S, Metin DY, Inci R, Dereli T, Kilinc I, Tumbay E. Non-dermatophytic molds as agents of onychomycosis in Izmir, Turkey-a prospective study. Mycopathologia 2005; 160(2): 125-8.
3. Muggé C, Hausteiner UF, Nenoff P. Causative agents of onychomycosis-a retrospective study. J Dtsch Dermatol Ges 2006; 4(3): 218-28.
4. Faergemann J, Baran R. Epidemiology, clinical presentation and diagnosis of onychomycosis. Br J Dermatol 2003; 149(Suppl 65): 1-4.
5. Panasiti V, Borroni RG, Devirgiliis V, et al. Comparison of diagnostic methods in the diagnosis of dermatomycoses and onychomycoses. Mycoses 2006; 49(1): 26-9.
6. Turin L, Riva F, Galbiati G, Cainelli T. Fast, simple and highly sensitive double-round polymerase chain reaction assay to detect medically relevant fungi in dermatological specimens. Eur J Clin Invest 2000; 30(6): 511-8.
7. Lilly KK, Koshnick RL, Grill JP, Khalil ZM, Nelson DB, Warshaw EM. Cost-effectiveness of diagnostic tests for toenail onychomycosis: a repeated-measure, single-blinded, cross-sectional evaluation of 7 diagnostic tests. J Am Acad Dermatol 2006; 55(4): 620-6.
8. Lawry MA, Haneke E, Strobeck K, Martin S, Zimmer B, Romano PS. Methods for diagnosing onychomycosis: a comparative study and review of the literature. Arch Dermatol 2000; 136(9): 1112-6.

9. Karimzadegan-Nia M, Mir-Amin-Mohammadi A, Bouzari N, Firooz A. Comparison of direct smear, culture and histology for the diagnosis of onychomycosis. *Australas J Dermatol* 2007; 48(1): 18-21.
10. Kuştimur S, El-Nahi H. Ankara'nın Balgat ve çevresindeki yerleşim bölgelerinden izole edilen dermatomikoz etkenleri. *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 1993; 23: 116-8.
11. Arca E, Saraçlı MA, Akar A, Yıldıran ST, Kurumlu Z, Gur AR. Polymerase chain reaction in the diagnosis of onychomycosis. *Eur J Dermatol* 2004; 14(1): 52-5.
12. Ilkit M. Onychomycosis in Adana, Turkey: a 5-year study. *Int J Dermatol* 2005; 44(10): 851-4.
13. Sahin I, Kaya D, Parlak AH, Oksuz S, Behcet M. Dermatophytoses in forestry workers and farmers. *Mycoses* 2005; 48(4): 260-4.
14. Hilmioglu S, Gunduz T, Metin DY, et al. Onychomycosis in primary school children: association with socio-economic conditions. *Mycoses* 2006; 49(5): 431-3.
15. Weinberg JM, Koestenblatt EK, Tutrone WD, Tishler HR, Najarian L. Comparison of diagnostic methods in the evaluation of onychomycosis. *J Am Acad Dermatol* 2003; 49(2): 193-7.
16. Garg J, Tilak R, Singh S, et al. Evaluation of pan-dermatophyte nested PCR in diagnosis of onychomycosis. *J Clin Microbiol* 2007; 45(10): 3443-5.
17. Gupta AK, Zaman M, Singh J. Fast and sensitive detection of *Trichophyton rubrum* DNA from the nail samples of patients with onychomycosis by a double-round polymerase chain reaction-based assay. *Br J Dermatol* 2007; 157(4): 698-703.
18. Arabatzi M, Bruijnesteijn van Coppenraet LE, Kuijper EJ, et al. Diagnosis of common dermatophyte infections by a novel multiplex real-time polymerase chain reaction detection/identification scheme. *Br J Dermatol* 2007; 157(4): 681-9.
19. Saraçlı MA. Dermatomikozların tanısında moleküler yöntemler, s: 74-9. Özbal Y, Koç AN (eds), Dermatomi-koz Etkenleri ve Dermatomikozlar. 2. Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikoloji Sempozyumu Kitabı, 2004. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti, Kayseri.