T.C.

TRAKYA ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KLİNİK AÇIDAN ÖNEMLİ BAZI *TRICHOPHYTON* TÜRLERİNİN HIZLI TESPİTİ İÇİN MULTIPLEX REAL-TIME PCR TEMELLİ BİR YÖNTEM GELİŞTİRİLMESİ

ARAS FAHRETTİN KORKMAZ

DOKTORA TEZİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman: Doç. Dr. Burhan ŞEN

EDİRNE-2021

ARAS FAHRETTİN KORKMAZ'ın hazırladığı "**KLİNİK AÇIDAN ÖNEMLİ BAZI *TRICHOPHYTON* TÜRLERİNİN HIZLI TESPİTİ İÇİN MULTİPLEX REAL TIME-PCR TEMELLİ BİR YÖNTEM GELİŞTİRİLMESİ**" başlıklı bu tez, tarafımızca okunmuş, kapsam ve niteliği açısından Biyoloji Anabilim Dalında bir **Doktora tezi** olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri (Ünvan, Ad, Soyad):	İmza
Prof. Dr. Ahmet ASAN	.....
Prof. Dr. Rasime DEMİREL	.....
Prof. Dr. Hasan AKGÜL	.....
Doç. Dr. Burhan ŞEN	.....
Dr. Öğretim Üyesi Halide AYDOĞDU	.....

Tez Savunma Tarihi: 12/02/2021

Bu tezin Doktora tezi olarak gerekli şartları sağladığını onaylarım.

İmza

Doç. Dr. Burhan ŞEN .....

Tez Danışmanı

Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü onayı

Doç. Dr. Hüseyin Rıza Ferhat KARABULUT

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

T.Ü.FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI DOKTORA PROGRAMI

DOĞRULUK BEYANI

Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında, tüm verilerin bilimsel ve akademik kurallar çerçevesinde elde edildiğini, kullanılan verilerde tahrifat yapılmadığını, tezin akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını, kullanılan tüm literatür bilgilerinin bilimsel normlara uygun bir şekilde kaynak gösterilerek ilgili tezde yer aldığını ve bu tezin tamamı ya da herhangi bir bölümünün daha önceden Trakya Üniversitesi ya da farklı bir üniversitede tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.

12/02/2021

Aras Fahrettin KORKMAZ

İmza

Doktora Tezi

KLİNİK AÇIDAN ÖNEMLİ BAZI *TRICHOPHYTON* TÜRLERİNİN HIZLI TESPİTİ İÇİN MULTİPLEX REAL-TIME PCR TEMELLİ BİR YÖNTEM GELİŞTİRİLMESİ

T.Ü Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

ÖZET

Bu çalışma çerçevesinde, insanların deri, saç ve tırnakları gibi vücut bölgelerinde dermatolojik anlamda patojen olan *Trichophyton* genusuna mensup olan 6 dermatofitin geleneksel kültürasyon yöntemlerine nazaran moleküler kapsamda çok daha hızlı ve doğru tanılaması amaçlanmıştır.

Trichophyton genusuna ait olan; *Trichophyton interdigitale*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton tonsurans*, *Trichophyton verrucosum* ve *Trichophyton violaceum* türlerinin daha önce hiçbir bilimsel çalışmada olmayan, spesifik primer ve prob oligonükleotid genetik sekanslarının *in silico* formatta tasarlanması amaçlanmıştır.

Dermatofit küflerinin her biri için ayrı ayrı; Aktin, ATP6, Beta-Tubulin, IGS-1, ITS-1, ITS-2, ITS-3, ITS-4, Kalmodulin, NTS, RPB-1, RPB-2 ve TEF-1α gibi barkod genleri ile varsa özgün başka bir gen bölgesine yönelik çalışmalar yapılması planlanmıştır. *Trichophyton interdigitale* için NTS, *Trichophyton mentagrophytes*,

Trichophyton tonsurans, *Trichophyton verrucosum* ve *Trichophyton violaceum* türleri için ITS-1 ve *Trichophyton rubrum* için ITS-2 gen bölgelerini hedefleyen, maksimum seviyede özgünlüğe sahip ve hedef türlere spesifik olan primer ve prob dizileri, çeşitli veri tabanları kullanılarak *in silico* kapsamda tasarlanmış ve Multiplex Real-Time PCR reaksiyonları ile de tasarım sonuçlarının tam bir başarı ile çalıştığı tespit edilmiştir.

Multiplex Real-Time PCR reaksiyonları ile hedef türlerin her biri için tespit limitleri ve analitik duyarlılıkları belirlenmiş, bilgileri bulunan referans bakteriyel ve fungal suşlar ile hedef türlerin her birinin çapraz reaksiyonlar vermediği tespit edilmiş ve filogenetik analizler hedef türlerin tamamı için gerçekleştirilmiştir.

Geleneksel kültür ve biyokimyasal tanılama yöntemlerine nazaran çok daha doğru ve hızlı tanılama imkanı veren moleküler genetik yöntemler kapsamına giren bu çalışma ile dermatofitoz enfeksiyonu geçiren hastalardan alınan klinik materyallerde ilgili hedef dermatofitlerin bulunması durumunda, bu tez kapsamında türe özgü tasarlanan primer ve prob setleri kullanılarak klinisyenlere çok hızlı bir tanı koyma ve çok daha erken bir zaman diliminde tedaviye başlama imkanı sunulabileceği öngörülmektedir.

Yıl : 2021

Sayfa Sayısı : 157

Anahtar Kelimeler : *Trichophyton*, Barkod genler, Gerçek Zamanlı PZR, Primer ve prob tasarımı.

Doctoral Thesis

Developing a Method Based on Multiplex Real-Time PCR for Rapid Detection of Some *Trichophyton* Species are Clinically İmportant

Trakya University Institute of Natural Sciences

Department of Biology

ABSTRACT

This study aims to diagnose the 6 dermatophytes belonging to the *Trichophyton* genus, which is dermatologically pathogen, in human body parts such as skin, hair and nails, much faster and more accurately compared to traditional culture methods in a molecular scope.

It is aimed to design ever first specific primary and probe oligonucleotide genetic sequences of *Trichophyton interdigitale*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton tonsurans*, *Trichophyton verrucosum* and *Trichophyton violaceum* species belonging to the *Trichophyton* genus, *in silico* format.

It is planned to carry out separate studies for each dermatophyte mold on barcode genes as Actin, ATP6, Beta-Tubulin, IGS-1, ITS-1, ITS-2, ITS-3, ITS-4, Calmodulin, NTS, RPB-1, RPB-2 and TEF-1α together with, if any, another unique gene region. Primer and probe sequences which are specific to target species with maximum specificity level and target NTS gene regions for *Trichophyton interdigitale*,

ITS-1 gene regions for *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton tonsurans*, *Trichophyton verrucosum* and *Trichophyton violaceum* species and ITS-2 gene regions for *Trichophyton rubrum* are designed *in silico* by using various databases and with Multiplex Real-Time PCR reactions, it was determined that the design results work with full success.

With Multiplex Real-Time PCR reactions, detection limits and analytical sensitivities were determined for each of the target species, it was determined that each of the reference bacterial and fungal strains and target species did not show cross reactions, and phylogenetic analyses were performed for all of the target species.

Being one of the genetic methods providing much faster and more accurate diagnosis compared to traditional culture and biochemical diagnostic methods, this study will enable the clinicians to diagnose the patients with dermatophytosis infection much faster and start treatment at a much earlier time by using our species-specific designed primer and probe sets, if any target dermatophytes are available in the clinical materials taken from the concerned patients.

Year : 2021

Number Of Page : 157

Keywords : *Trichophyton*, Barcode genes, Real-Time PCR, Primer and probe design.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam boyunca tüm yardım ve tecrübelerini benden esirgemeyen, akademik ilgi ve desteğini gördüğüm değerli danışman hocam Doç. Dr. Burhan ŞEN'e, değerli desteklerinden ötürü başta Prof. Dr. Ahmet ASAN olmak üzere tüm değerli jüri üyesi hocalarıma, lisansüstü akademik hayatım boyunca beni engin bilgileri ile donatan, her zaman akademik ilgi ve desteğini gördüğüm değerli ikinci danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi İskender KARALTI'ya, Doktora sürecim boyunca desteklerini gördüğüm tüm Trakya Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü akademisyenleri ve çalışanlarına sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez çalışmasını, 2018/344 numaralı proje ile desteklemelerinden dolayı Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine teşekkürlerimi sunarım.

Tezimin deney ve yazım kısmında benden desteklerini esirgemeyen değerli arkadaşlarım, Eren ZEDE, Eylül DOĞRAMACI ve Veysel SAPAN'a teşekkür ederim.

Tüm yaşamım boyunca benden desteklerini esirgemeyen, her koşulda yanımda olan babam İsmail Hakkı KORKMAZ, annem Hülya KORKMAZ ve kardeşim Fırat KORKMAZ başta olmak üzere anneannem, babaannem ve dedelerime sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZET ..... **IV**
ABSTRACT ..... **VI**
TEŞEKKÜR ..... **VIII**
SİMGE VE KISALTMALAR ..... **XI**
ÇİZELGELER DİZİNİ ..... **XIII**
ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **XV**
GİRİŞ ..... **- 1 -**
KAYNAK ÖZETLERİ ..... **- 4 -**
MATERYAL VE METOD ..... **- 10 -**
3.1. Materyal ..... **- 10 -**
3. 1. 1. Real-Time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) ..... - 11 -
3. 2. Metod ..... **- 13 -**
3. 2. 1. *Trichophyton interdigitale* Türüne Yönelik Spesifik Oligo Tasarımı ..... - 18 -
3. 2. 2. *Trichophyton interdigitale* ile *Trichophyton mentagrophytes* Türlerine Yönelik Ortak Spesifik Oligo Tasarımı ..... - 24 -
3. 2. 3. *Trichophyton rubrum* Türüne Yönelik Spesifik Oligo Tasarımı ..... - 29 -
3. 2. 4. *Trichophyton tonsurans* Türüne Yönelik Spesifik Oligo Tasarımı ..... - 38 -
3. 2. 5. *Trichophyton verrucosum* Türüne Yönelik Spesifik Oligo Tasarımı ..... - 43 -
3. 2. 6. *Trichophyton violaceum* Türüne Yönelik Spesifik Oligo Tasarımı ..... - 52 -
3. 2. 7. Real-Time PCR Reaksiyonları ..... - 60 -
3. 2. 8. Analitik Duyarlılık ve Çalışmanın Özgüllüğünün Belirlenmesi ..... - 63 -
3. 2. 9. Amplikonların Saflaştırılması ..... - 79 -
3. 2. 10. Filogenetik Analizin Yapılması ..... - 80 -
SONUÇLAR ..... **- 81 -**
4. 1. Çalışmadaki Hedef Türlere Yapılan Multiplex Real-Time PCR Reaksiyonları Sonuçları ..... **- 81 -**
4. 1. 1. Multiplex Real-Time PCR Kapsamında 1. Deney Sonuçları ..... - 82 -

4. 1. 2. Multiplex Real-Time PCR Kapsamında 2. Deney Sonuçları ..... - 83 -
4. 1. 3. Multiplex Real-Time PCR Kapsamında 3. Deney Sonuçları ..... - 85 -
4. 1. 4. Multiplex Real-Time PCR Kapsamında 4. Deney Sonuçları ..... - 86 -
4. 1. 5. Multiplex Real-Time PCR Kapsamında 5. Deney Sonuçları ..... - 88 -
4. 1. 6. Multiplex Real-Time PCR Kapsamında 6. Deney Sonuçları ..... - 89 -
4. 1. 7. Multiplex Real-Time PCR Kapsamında 7. Deney Sonuçları ..... - 91 -
4. 1. 8. Multiplex Real-Time PCR Kapsamında 8. Deney Sonuçları ..... - 94 -
4. 1. 9. Multiplex Real-Time PCR Kapsamında 9. Deney Sonuçları ..... - 98 -
4. 1. 10. Multiplex Real-Time PCR Kapsamında 10. Deney Sonuçları ..... - 100 -
4. 1. 11. Multiplex Real-Time PCR Kapsamında 11. Deney Sonuçları ..... - 103 -
4. 1. 12. Multiplex Real-Time PCR Kapsamında 12. Deney Sonuçları ..... - 107 -
4. 1. 13. Multiplex Real-Time PCR Kapsamında 13. Deney Sonuçları ..... - 109 -
4. 1. 14. Multiplex Real-Time PCR Kapsamında 14. Deney Sonuçları ..... - 110 -
4. 2. Analitik Duyarlılık ..... - 112 -
4. 3. Sanger Dizileme Tekniği ile Amplikonların Dizilenmesi ..... - 118 -
4. 3. 1. Sanger DNA Dizileme Tekniği ile *Trichophyton interdigitale* Türü için Tasarlanan Primer-Prob Setinin Çoğalttığı Genetik Bölgenin Gösterilmesi ..... - 119 -
4. 3. 2. Sanger DNA Dizileme Tekniği ile *Trichophyton mentagrophytes* Türü için Tasarlanan Primer-Prob Setinin Çoğalttığı Genetik Bölgenin Gösterilmesi ..... - 119 -
4. 3. 3. Sanger DNA Dizileme Tekniği ile *Trichophyton rubrum* Türü için Tasarlanan Primer-Prob Setinin Çoğalttığı Genetik Bölgenin Gösterilmesi ..... - 119 -
4. 3. 4. Sanger DNA Dizileme Tekniği ile *Trichophyton tonsurans* Türü için Tasarlanan Primer-Prob Setinin Çoğalttığı Genetik Bölgenin Gösterilmesi ..... - 119 -
4. 3. 5. Sanger DNA Dizileme Tekniği ile *Trichophyton verrucosum* Türü için Tasarlanan Primer-Prob Setinin Çoğalttığı Genetik Bölgenin Gösterilmesi ..... - 119 -
4. 3. 6. Sanger DNA Dizileme Tekniği ile *Trichophyton violaceum* Türü için Tasarlanan Primer-Prob Setinin Çoğalttığı Genetik Bölgenin Gösterilmesi ..... - 120 -
4. 4. Filogenetik Analizin Yapılması ..... - 120 -
5. TARTIŞMA ..... - 123 -
5. 1. Multiplex Real-Time PCR Reaksiyonları ..... - 126 -
5. 2. Analitik Duyarlılık-Özgüllük-Amplikonların Saflaştırılması ..... - 127 -
5. 3. Amplikonların Dizilenmesi ve Filogenetik Analiz ..... - 127 -
KAYNAKLAR ..... - 135 -
ÖZGEÇMİŞ ..... - 139 -

SİMGE VE KISALTMALAR

ATP6	: ATP Synthase
BHQ	: Black Hole Quencher
BT2	: Beta-Tubulin Protein-Coding Gene 2
CBS	: Centraal Bureau Voor Schimmelcultures
CECT	: La Coleccion Espanola de Cultivos Tipo
Cq	: Quantification Cycle
^{o}C	: Santigrad Derece
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
d NTP	: Deoksi Nükleotid Tri Fosfat
g	: g Kuvveti
IGS-1	: Intergenic Spacer 1
ITS	: Internal Transcribed Spacer
LOD	: Level of Detail
M	: Molar
$MgCl_2$	: Magnezyum Klorür
MGW	: Molecular Grade Water

ml : Mililitre

NaN_3 : Sodyum Azid

NCBI : National Center for Biotechnology Information

ng : Nanogram

NTS : Non-Transcribed Spacer

PCR : Polymerase Chain Reaction

q-PCR : Quantitative Polymerase Chain Reaction

RNA : Ribo Nükleik Asit

RPB : RNA Polymerase II Subunit

RT-PCR : Real-Time Polymerase Chain Reaction

Taq Polimeraz: *Thermus aquaticus* Polimeraz Enzimi

TEF 1-α : Translation Elongation 1- Alfa

T_M : Melting Temperature

UPGMA : Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean

UV : Ultraviyole

µl : Mikrolitre

µM : Mikromolar

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1. Standart suşların tür isimleri ve numaraları ..... - 10 -
Çizelge 2. qPCR reaksiyonlarında kullanılan *Trichophyton interdigitale* reaktifleri ve hacim değerleri ..... - 11 -
Çizelge 3. qPCR reaksiyonlarında kullanılan *Trichophyton interdigitale*+*Trichophyton mentagrophytes* reaktifleri ve hacim değerleri. ..... - 11 -
Çizelge 4. qPCR reaksiyonlarında kullanılan *Trichophyton rubrum* reaktifleri ve hacim değerleri ..... - 12 -
Çizelge 5. qPCR reaksiyonlarında kullanılan *Trichophyton tonsurans* reaktifleri ve hacim değerleri. ..... - 12 -
Çizelge 6. qPCR reaksiyonlarında kullanılan *Trichophyton verrucosum* reaktifleri ve hacim değerleri. ..... - 12 -
Çizelge 7. qPCR reaksiyonlarında kullanılan *Trichophyton violaceum* reaktifleri ve hacim değerleri. ..... - 12 -
Çizelge 8. *Trichophyton interdigitale* için tasarlanan primer ve prob setleri. ..... - 24 -
Çizelge 9. *Trichophyton interdigitale* ile *Trichophyton mentagrophytes* için tasarlanan primer ve prob setleri ..... - 29 -
Çizelge 10. *Trichophyton rubrum* için tasarlanan primer ve prob setleri ..... - 37 -
Çizelge 11. *Trichophyton tonsurans* için tasarlanan primer ve prob setleri ..... - 43 -
Çizelge 12. *Trichophyton verrucosum* için tasarlanan primer ve prob setleri ..... - 51 -
Çizelge 13. *Trichophyton violaceum* için tasarlanan primer ve prob setleri..... - 60 -
Çizelge 14. Çalışma kapsamında tasarlanan primer-prob setlerinin isimleri, kullanılan prob boyaları ile ürün boyutlarının gösterilmesi ..... - 61 -
Çizelge 15. Tasarlanan 1. Multiplex Primer ve Prob setleri (Tricoplex 1)..... - 61 -
Çizelge 16. Tasarlanan 2. Multiplex Primer ve Prob setleri (Tricoplex 2)..... - 62 -
Çizelge 17. Multiplex Real-Time PCR reaksiyonları karışımlarının hazırlanması ... - 62 -
Çizelge 18. Multiplex Real-Time PCR reaksiyonları kapsamında kullanılan ısıl döngü programlarının gösterilmesi ..... - 62 -
Çizelge 19. Çalışılan 6 hedef *Trichophyton* türü için tasarlanan Multiplex Real-Time PCR deney planları ..... - 63 -
Çizelge 20. Tricoplex 1 kapsamında özgüllüğün belirlenmesi için hedef olmayan mikrofunguslar ile yapılan Real-Time PCR deney planı-1 ..... - 64 -
Çizelge 21. Tricoplex 1 kapsamında özgüllüğün belirlenmesi için hedef olmayan mikrofunguslar ile yapılan Real-Time PCR deney planı-2 ..... - 66 -

Çizelge 22. Tricoplex 1 kapsamında özgüllüğün belirlenmesi için hedef olmayan mikrofunguslar ile yapılan Real-Time PCR deney planı-3..... - 69 -
Çizelge 23. Tricoplex 2 kapsamında özgüllüğün belirlenmesi için hedef olmayan mikrofunguslar ile yapılan Real-Time PCR deney planı-1..... - 70 -
Çizelge 24. Tricoplex 2 kapsamında özgüllüğün belirlenmesi için hedef olmayan mikrofunguslar ile yapılan Real-Time PCR deney planı-2..... - 73 -
Çizelge 25. Tricoplex 2 kapsamında özgüllüğün belirlenmesi için hedef olmayan mikrofunguslar ile yapılan Real-Time PCR deney planı-3..... - 75 -
Çizelge 26. Tricoplex 1 kapsamında özgüllüğün belirlenmesine katkı sağlayan ekarte ettirici bakteri türleri ile yapılan Real-Time PCR deney planı. ..... - 76 -
Çizelge 27. Tricoplex 2 kapsamında özgüllüğün belirlenmesine katkı sağlayan ekarte ettirici bakteri türleri ile yapılan Real-Time PCR deney planı. ..... - 77 -
Çizelge 28. Tricoplex 1 ve Tricoplex 2 Multiplex Real-Time PCR reaksiyonlarının tespit limitlerinin belirlenmesi için oluşturulan PCR reaksiyon planı. ..... - 78 -
Çizelge 29. Tricoplex 1 ve Tricoplex 2 Multiplex Real-Time PCR reaksiyonları kapsamında çalışmadaki hedef *Trichophyton* türlerine yönelik uygulanan PCR sonuçları. ..... - 81 -
Çizelge 30. Tricoplex 1 Multiplex Real-Time PCR reaksiyonları kapsamında özgüllük testleri için hedef olmayan fungal suşlar ile kurulan PCR sonuçları-1. ..... - 91 -
Çizelge 31. Tricoplex 1 Multiplex Real-Time PCR reaksiyonları kapsamında özgüllük testleri için hedef olmayan fungal suşlar ile kurulan PCR sonuçları-2. ..... - 95 -
Çizelge 32. Tricoplex 1 Multiplex Real-Time PCR reaksiyonları kapsamında özgüllük testleri için hedef olmayan fungal suşlar ile kurulan PCR sonuçları-3..... - 98 -
Çizelge 33. Tricoplex 2 Multiplex Real-Time PCR reaksiyonları kapsamında özgüllük testleri için hedef olmayan fungal suşlar ile kurulan PCR sonuçları-1..... - 100 -
Çizelge 34. Tricoplex 2 Multiplex Real-Time PCR reaksiyonları kapsamında özgüllük testleri için hedef olmayan fungal suşlar ile kurulan PCR sonuçları-2..... - 104 -
Çizelge 35. Tricoplex 2 Multiplex Real-Time PCR reaksiyonları kapsamında özgüllük testleri için hedef olmayan fungal suşlar ile kurulan PCR sonuçları-3..... - 107 -
Çizelge 36. Tricoplex 1 Multiplex Real-Time PCR reaksiyonları kapsamında özgüllük testleri için hedef olmayan referans bakteriyel suşlar ile kurulan PCR sonuçları.... - 109 -
Çizelge 37. Tricoplex 2 Multiplex Real-Time PCR reaksiyonları kapsamında özgüllük testleri için hedef olmayan referans bakteriyel suşlar ile kurulan PCR sonuçları.... - 111 -
Çizelge 38. Seri seyreltmelerin Tricoplex 1 Multiplex Real-Time PCR sonuçları . - 112 -
Çizelge 39. Seri seyreltmelerin Tricoplex 2 Multiplex Real-Time PCR sonuçları . - 115 -
Çizelge 40. Tasarlanan primer setlerinin çoğalttığı genetik bölgelerin NCBI veri tabanındaki BLAST analizi sonuçları ..... - 120 -

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.2.1.1. Makaleden (Jackson vd., 2006) alınan primer setinin çoğalttığı genetik bölgenin NCBI veri tabanında bulunması. ..... - 20 -
Şekil 3.2.1.2. Makaleden (Jackson vd., 2006) alınan primerlerin çoğalttığı Non-Transcribed Spacer (NTS) bölgesi . ..... - 21 -
Şekil 3.2.1.3. Primer 3 programına Non-Transcribed Spacer (NTS) genetik bölgesinin DNA dizisinin girilmesi ve Primer 3 programı ile manuel tasarımı. ..... - 22 -
Şekil 3.2.1.4. Primer 3 programı kullanılarak yapılan manuel tasarım sonucu. ..... - 22 -
Şekil 3.2.1.5. Tasarlanan primer ve prob setlerinin NCBI Primer Blast programında yapılan spesifite testi sonucu. ..... - 23 -
Şekil 3.2.1.6. Tasarlanan primer ve prob setlerinin bağlandığı genetik bölgenin NCBI veri tabanından bulunması. ..... - 23 -
Şekil 3.2.1.7. Tasarlanan primer ve prob setlerinin bağlandığı genetik bölgenin NCBI nükleotid veri tabanından taranması. ..... - 23 -
Şekil 3.2.2.1. Makaleden (Miyajima vd., 2013) alınan probun bağlandığı DNA sekansının NCBI veri tabanından bulunması. ..... - 26 -
Şekil 3.2.2.2. Makale kapsamında (Miyajima vd., 2013) probun bağlandığı bölgenin genetik DNA dizisinin NCBI veri tabanından alınması ..... - 26 -
Şekil 3.2.2.3. Primer 3 programı ile yapılan manuel tasarım. ..... - 27 -
Şekil 3.2.2.4. Primer 3 programı ile yapılan manuel tasarım sonucu ..... - 27 -
Şekil 3.2.2.5. Manuel olarak tasarlanan primer dizilerinin NCBI veri tabanında hangi türlere bağlandığının gösterilmesi ..... - 28 -
Şekil 3.2.2.6. Manuel olarak tasarlanan prob ile reverse primerin bağlandığı bölgenin gösterilmesi.. ..... - 28 -
Şekil 3.2.2.7. Manuel olarak tasarlanan prob ile reverse primer dizisinin genetik anlamda bağlandığı bölgenin NCBI veri tabanı kapsamında hangi türlere ait olduğunun gösterilmesi . ..... - 29 -
Şekil 3.2.3.1. *Trichophyton rubrum* dermatofit patojenine ait ITS gen bölgesinin NCBI veri tabanından aranması ..... - 32 -
Şekil 3.2.3.2. NCBI veri tabanından indirilen ITS gen dizilerinden *Trichophyton rubrum*'a ait farklılık gösteren bölgenin seçilmesi. ..... - 33 -
Şekil 3.2.3.3. *Trichophyton rubrum*'a ait ITS gen bölgesi kapsamındaki DNA dizisinin NCBI veri tabanından indirilmesi ..... - 34 -

Şekil 3.2.3.4. NCBI veri tabanından Primer 3 programına *Trichophyton rubrum*'a ait ITS dizisinin aktarılması ve farklılık gösteren bölgenin prob olarak girilmesi. ..... - 34 -
Şekil 3.2.3.5. Primer 3 programında *Trichophyton rubrum* için tasarlanan primerler ve prob sonuçları. ..... - 35 -
Şekil 3.2.3.6. Prob dizisinin reverse primer olarak düşünülüp Primer 3 programında tasarlanan primer-prob setinin NCBI Primer Blast programı ile spesifitesinin test edilmesi. ..... - 36 -
Şekil 3.2.3.7. Forward primer ile probun bağlandığı genetik bölgenin spesifite testi için seçilmesi. ..... - 37 -
Şekil 3.2.3.8. Manuel olarak tasarlanan prob ile reverse primer dizisinin genetik anlamda bağlandığı bölgenin NCBI veri tabanı kapsamında *Trichophyton rubrum*'a ait olduğunun gösterilmesi. ..... - 37 -
Şekil 3.2.4.1. Makaleden (Yoshida vd., 2006) alınan primer setinin NCBI veri tabanı kapsamında çoğalttığı *Trichophyton tonsurans* dermatofit patojenik türlerinin gösterilmesi. ..... - 39 -
Şekil 3.2.4.2. Makaleden (Yoshida vd., 2006) alınan primer setinin NCBI veri tabanı kapsamında çoğalttığı DNA dizi bölgesinin gösterilmesi. ..... - 39 -
Şekil 3.2.4.3. Primer 3 programı kullanılarak yapılan manuel tasarım sonucunun gösterilmesi. ..... - 40 -
Şekil 3.2.4.4. Manuel olarak tasarlanan primer-prob setinin NCBI veri tabanı kapsamında NCBI Primer Blast programı aracılığı ile spesifitesinin test edilmesinin gösterilmesi. ..... - 41 -
Şekil 3.2.4.5. Manuel olarak tasarlanan primer-prob setinin çoğalttığı genetik bölgenin NCBI veri tabanından alınması. ..... - 42 -
Şekil 3.2.4.6. Manuel olarak tasarlanan primer-prob dizisinin genetik anlamda bağlandığı bölgenin NCBI veri tabanı kapsamında *Trichophyton tonsurans*'a ait olduğunun gösterilmesi. ..... - 43 -
Şekil 3.2.5.1. Makalede (Bergmans vd., 2008) kullanılan probun NCBI nükleotid veri tabanı kapsamında bağlandığı ITS-1 DNA dizi bölgelerinin gösterilmesi. ..... - 45 -
Şekil 3.2.5.2. *Trichophyton verrucosum* türüne ait referans alınan makalede (Bergmans vd., 2008) kullanılan probun NCBI veri tabanı kapsamında bağlandığı DNA dizisinin kopyalanmasının gösterilmesi. ..... - 46 -
Şekil 3.2.5.3. Kopyalanan DNA dizisinin Primer 3 programına aktarılması ve manuel olarak *Trichophyton verrucosum* türüne yönelik primer ve prob setinin tasarlanmasının gösterilmesi. ..... - 47 -
Şekil 3.2.5.4. Primer 3 programı kullanılarak manuel olarak yapılan primer ve prob setinin tasarlanması sonucunun gösterilmesi. ..... - 48 -
Şekil 3.2.5.5. Tasarlanan primer-prob setinin NCBI veri tabanında bağlanıp-çoğalttığı türlerin gösterilmesi. ..... - 49 -
Şekil 3.2.5.6. Forward primer ile prob oligonükleotid dizilerinin bağlandığı DNA bölgesinin gösterilmesi. ..... - 50 -
Şekil 3.2.5.7. Forward primer ile prob oligonükleotid dizilerinin bağlandığı DNA bölgesinin NCBI nükleotid veri tabanındaki blast çalışmalarının sonucunun gösterilmesi. ..... - 51 -
Şekil 3.2.6.1. Makalede (Wisselink vd., 2011) kullanılan probun NCBI nükleotid veri tabanı kapsamında bağlandığı bölgenin bulunmasının gösterilmesi. ..... - 53 -

Şekil 3.2.6.2. *Trichophyton violaceum* türüne ait referans alınan makalede (Wisselink vd., 2011) kullanılan probun NCBI veri tabanı kapsamında bağlandığı DNA dizisinin kopyalanmasının gösterilmesi. ..... - 54 -
Şekil 3.2.6.3. *Trichophyton violaceum* türüne ait ITS gen bölgesi dizilerinin Primer 3 programına girilmesi ve manuel primer ve prob setlerinin tasarlanmasının gösterilmesi……- 55 -
Şekil 3.2.6.4. Primer 3 programı kullanılarak manuel olarak yapılan primer ve prob setinin tasarlanması sonucunun gösterilmesi. ..... - 56 -
Şekil 3.2.6.5. Tasarlanan primer ve prob oligonükleotid dizilerinin spesifite testi için NCBI Primer Blast programına aktarılması ve ilgili veri tabanındaki tarama sonuçlarının gösterilmesi. ..... - 57 -
Şekil 3.2.6.6. Tasarlanan forward primer ve prob oligonükleotid dizilerinin bağlandığı genetik bölge sekansının gösterilmesi..... - 58 -
Şekil 3.2.6.7. Tasarlanan forward primer ve prob oligonükleotid dizilerinin bağlandığı genetik bölgenin NCBI nükleotid veri tabanında hangi türlere ait olduğunun gösterilmesi. ..... - 59 -
Şekil 4.1.1.1. Tricoplex 1 kapsamında *Trichophyton rubrum* dermatofit patojenine ait genomik DNA ile yapılan Multiplex Real-Time PCR sonucunun gösterilmesi..... - 82 -
Şekil 4.1.1.2. Tricoplex 2 kapsamında *Trichophyton rubrum* dermatofit patojenine ait genomik DNA ile yapılan Multiplex Real-Time PCR sonucunun gösterilmesi..... - 83 -
Şekil 4.1.2.1. Tricoplex 1 kapsamında *Trichophyton tonsurans* dermatofit patojenine ait genomik DNA ile yapılan Multiplex Real-Time PCR sonucunun gösterilmesi..... - 84 -
Şekil 4.1.2.2. Tricoplex 2 kapsamında *Trichophyton tonsurans* dermatofit patojenine ait genomik DNA ile yapılan Multiplex Real-Time PCR sonucunun gösterilmesi ..... - 84 -
Şekil 4.1.3.1. Tricoplex 1 kapsamında *Trichophyton verrucosum* dermatofit patojenine ait genomik DNA ile yapılan Multiplex Real-Time PCR sonucunun gösterilmesi... - 85 -
Şekil 4.1.3.2. Tricoplex 2 kapsamında *Trichophyton verrucosum* dermatofit patojenine ait genomik DNA ile yapılan Multiplex Real-Time PCR sonucunun gösterilmesi... - 86 -
Şekil 4.1.4.1. Tricoplex 2 kapsamında *Trichophyton violaceum* dermatofit patojenine ait genomik DNA ile yapılan Multiplex Real-Time PCR sonucunun gösterilmesi..... - 87 -
Şekil 4.1.4.2. Tricoplex 1 kapsamında *Trichophyton violaceum* dermatofit patojenine ait genomik DNA ile yapılan Multiplex Real-Time PCR sonucunun gösterilmesi..... - 87 -
Şekil 4.1.5.1. Tricoplex 2 kapsamında *Trichophyton interdigitale* dermatofit patojenine ait genomik DNA ile yapılan Multiplex Real-Time PCR sonucunun gösterilmesi... - 88 -
Şekil 4.1.5.2. Tricoplex 1 kapsamında *Trichophyton interdigitale* dermatofit patojenine ait genomik DNA ile yapılan Multiplex Real-Time PCR sonucunun gösterilmesi... - 89 -
Şekil 4.1.6.1. Tricoplex 2 kapsamında *Trichophyton mentagrophytes* dermatofit patojenine ait genomik DNA ile yapılan Multiplex Real-Time PCR sonucunun gösterilmesi. ..... - 90 -
Şekil 4.1.6.2. Tricoplex 1 kapsamında *Trichophyton mentagrophytes* dermatofit patojenine ait genomik DNA ile yapılan Multiplex Real-Time PCR sonucunun gösterilmesi. ..... - 90 -
Şekil 4.1.7.1. Tricoplex 1 Multiplex Real-Time PCR reaksiyonları kapsamında Çizelge 30.'da verilen referans fungal suşlar ile kurulan PCR sonuçlarının gösterilmesi..... - 94 -
Şekil 4.1.8.1. Tricoplex 1 Multiplex Real-Time PCR reaksiyonları kapsamında Çizelge 31.'de verilen referans fungal suşlar ile kurulan PCR sonuçlarının gösterilmesi..... - 97 -
Şekil 4.1.9.1. Tricoplex 1 Multiplex Real-Time PCR reaksiyonları kapsamında Çizelge 32.'de verilen referans fungal suşlar ile kurulan PCR sonuçlarının gösterilmesi..... - 99 -

Şekil 4.1.10.1. Tricoplex 2 Multiplex Real-Time PCR reaksiyonları kapsamında Çizelge 33.'de verilen referans fungal suşlar ile kurulan PCR sonuçlarının gösterilmesi.... - 103 -
Şekil 4.1.11.1. Tricoplex 2 Multiplex Real-Time PCR reaksiyonları kapsamında Çizelge 34.'de verilen referans fungal suşlar ile kurulan PCR sonuçlarının gösterilmesi.... - 106 -
Şekil 4.1.12.1. Tricoplex 2 Multiplex Real-Time PCR reaksiyonları kapsamında Çizelge 35.'de verilen referans fungal suşlar ile kurulan PCR sonuçlarının gösterilmesi.... - 108 -
Şekil 4.1.13.1. Tricoplex 1 Multiplex Real-Time PCR reaksiyonları kapsamında Çizelge 36.'da verilen referans bakteriyel suşlar ile kurulan PCR sonuçlarının gösterilmesi.-110-
Şekil 4.1.14.1. Tricoplex 2 Multiplex Real-Time PCR reaksiyonları kapsamında Çizelge 37.'de verilen referans bakteriyel suşlar ile kurulan PCR sonuçlarının gösterilmesi.-112-
Şekil 4.2.1. *Trichophyton rubrum* dermatofit küf patojenine ait seri seyreltmelere uygulanan Multiplex Real-Time PCR sonuçlarının gösterilmesi. ..... - 113 -
Şekil 4.2.2. *Trichophyton tonsurans* dermatofit küf patojenine ait seri seyreltmelere uygulanan Multiplex Real-Time PCR sonuçlarının gösterilmesi. ..... - 114 -
Şekil 4.2.3. *Trichophyton verrucosum* dermatofit küf patojenine ait seri seyreltmelere uygulanan Multiplex Real-Time PCR sonuçlarının gösterilmesi. ..... - 115 -
Şekil 4.2.4. *Trichophyton interdigitale* dermatofit küf patojenine ait seri seyreltmelere uygulanan Multiplex Real-Time PCR sonuçlarının gösterilmesi. ..... - 116 -
Şekil 4.2.5. *Trichophyton mentagrophytes* dermatofit küf patojenine ait seri seyreltmelere uygulanan Multiplex Real-Time PCR sonuçlarının gösterilmesi..... - 117 -
Şekil 4.2.6. *Trichophyton violaceum* dermatofit küf patojenine ait seri seyreltmelere uygulanan Multiplex Real-Time PCR sonuçlarının gösterilmesi. ..... - 118 -
Şekil 4.4.1. Sadece hedef türler kapsamında ITS-18S r RNA genetik bölgelerine yönelik yapılan DNA dizi analizi neticesinde UPGMA yöntemi ile çizilen filogenetik ağacın gösterilmesi. ..... - 121 -
Şekil 4.4.2. Hedef türler ile diğer dermatofit türler kapsamında ITS-18S r RNA genetik bölgelerine yönelik yapılan DNA dizi analizi neticesinde UPGMA yöntemi ile çizilen filogenetik ağacın gösterilmesi. ..... - 122 -
Şekil 5.9.1. Fungal barkod genlerin gösterilmesi-1 (Hidayat, Priyandoko, Wardiny & Islami, 2016). ..... - 130 -
Şekil 5.9.2. Fungal barkod genlerin gösterilmesi-2 (Robison, Chiang & Horgen, 2001). - 131 -
Şekil 5.9.3. Fungal barkod genlerin gösterilmesi-3 (Wu vd., 2014)..... - 132 -
Şekil 5.9.4. Fungal barkod genlerin gösterilmesi-4 (Kidd, Chen, Meyer & Halliday, 2001). ..... - 133 -
Şekil 5.9.5. Fungal barkod genlerin gösterilmesi-5 (Beta-Tubulin) (Hirsch vd., 2001)....- 133 -

BÖLÜM 1

GİRİŞ

Dermatofitler, dermatofitoz enfeksiyonlarına neden olan, insanlarda deri, saç ve tırnak gibi keratinize dokuları keratinaz enzimatik faaliyetleri ile enfekte eden *Epidermophyton*, *Microsporum* ve *Trichophyton* genuslarına mensup olan mikrofunguslardır. Bu bölgelerde yayılım göstermelerinin nedeni besin maddesi olarak keratin adı verilen hidrofobik protein molekülünü kullanmalarıdır. İnsanlarda tutulum gösterdiği keratinize dokularda yapısal deformasyonlar, kepeklenmeler ve renk değişimleri meydana getirirler. İnsanlarda enfektif olanlarına Antropofilik dermatofitler de denmektedir. Çalışma kapsamında 6 hedef *Trichophyton* türünün seçilmesinin sebebi de insanlarda en fazla hastalık oluşturanların ilgili türler olmasıdır. Tropikal ve subtropikal iklim kuşakları başta olmak üzere dünyanın birçok coğrafyasında yayılım göstermektedirler (Weitzman & Summerbell, 1995).

İnsandan insana direkt temas ve ayrıca enfekte eşyaların ortak kullanımları ile geçiş sağlanmaktadır. Enfeksiyonu meydana getirdikleri dokulara göre Tinea enfeksiyonları olarak da isimlendirilirler. Yayılım gösterdikleri vücut bölgesine göre adlandırılan enfeksiyonlar; saçlı deride Tinea capitis, ayakta Tinea pedis, kasık ve gövdede Tinea corporis, üst bacak ve pubik bölgede Tinea cruris, sakalda Tinea barbae, elde Tinea manuum, tırnaklarda ise Tinea unguium (onikomikoz) enfeksiyonları olarak nitelendirilmektedirler.

Alilamin, Amphotericin B, Azol, Fluconazole, Griseofulvin, Ithraconazole, Sikloproks, Terbinafin, Tolnaftat, Undesilinik Asit ve Variconazole gibi antifungal etkili ilaçlar tek ya da kombinler şeklinde dermatofitoz tedavilerde kullanılmaktadır. Ayrıca özellikle onikomikoz tırnak enfeksiyonlarında kurutucu boya olarak Jentient Viyole kullanılan tedavi yöntemleri arasındadır.

Günümüzde bilimsel anlamda tür teşhislerinin yapılması ve filogenetik sistematik ilişkilerin ortaya konmasında yararlanılan spesifitesi yüksek moleküler genetik temelli yöntemler, dermatofitler için de kullanılmaktadır. Moleküler tanılamalar kapsamında kullanılan moleküler belirteçlerin yetersizliği, tanımlanmamış fungal türler, fungal yapıların yaşam döngülerindeki farklılıklar gibi nedenler bu yöntemin sınırlayıcı faktörleri olsa da günümüzde en geçerli bilimsel tanılama yöntemi olarak halen moleküler teknikler kullanılmaktadır.

Bu tez çalışmasında amaç, patojen dermatofitler kapsamında yer alan *Trichophyton* genusuna ait 6 türün standart suşları kullanılarak Aktin, ATP6, Beta-Tubulin, IGS-1, ITS-1, ITS-2, ITS-3, ITS-4, Kalmodulin, NTS, RPB-1, RPB-2 ve TEF-1α gibi barkod genlerinin lokus bölgelerini hedef alan primer ve prob setlerinin tasarlanması amaçlanmıştır.

Spesifik tasarımlar ilk etapta ITS-1, ITS-2, ITS-3 ve ITS-4 gen bölgelerini hedef alarak yapılmış olup, adı geçen gen bölgelerini hedef alan tasarımlar ile özgün ve spesifik sonuçlar alınamaması durumunda ikincil ve üçüncül gen hedeflerine yönelik bilimsel çalışmaların yapılması amaçlanmıştır.

Çalışma kapsamında *Trichophyton interdigitale*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton tonsurans*, *Trichophyton verrucosum* ve *Trichophyton violaceum* dermatofit küfler olan bu mikrofungal elemanların tür tespitleri için moleküler test sarflarının geliştirilmesi de amaçlanmıştır.

Trichophyton genusuna mensup birçok türün meydana getirdiği dermatofitozislerin Multiplex-Real Time PCR esaslı moleküler tanılama yöntemi ile çok daha doğru ve hızlı bir şekilde tür teşhis ve tanılamasına olanak sağlanması da hedeflenmiştir.

Çalışma kapsamında insanların deri, saç ve tırnaklarında dermatofitozisler meydana getiren ve önemli bir dermatofit olan *Trichophyton* genusuna mensup türler

için spesifik olarak geliştirilen primer ve prob setlerinin referans kültür bankasında bulunan diğer yaygın mikrofungal elemanlar olan küflerle ve yaygın patojenik ve non-patojenik bakterilerle çapraz reaksiyonlar verip-vermediği de belirlenmesi araştırılmıştır.

Çalışmada *Trichophyton interdigitale*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton tonsurans*, *Trichophyton verrucosum* ve *Trichophyton violaceum* dermatofit küflerinin her biri için ayrı ayrı; Aktin, ATP6, Beta-Tubulin, IGS-1, ITS-1, ITS-2, ITS-3, ITS-4, Kalmodulin, NTS, RPB-1, RPB-2 ve TEF-1α gibi barkod genleri ile varsa özgün başka bir gen bölgesine yönelik çalışılması, çok sayıda bakteriyel ve fungal suşlar ile çapraz reaksiyon kontrolünün sağlanması çalışmanın özgünlük değerini yükseltmektedir. Ayrıca tasarlanan primer ve prob setlerinin çok daha doğru ve hızlı tanılamayı gerçekleştirmesi durumu nedeni ile dermatofit enfeksiyonlarında klinisyenlerin hastalar için çok daha erken bir zaman diliminde tedaviye başlama fırsatı sunulacaktır.

BÖLÜM 2

KAYNAK ÖZETLERİ

Dermatofit patojenler *Epidermophyton*, *Microsporum* ve *Trichophyton* genuslarına ait türleri içermektedir. İlgili patojenik formlar vücutta keratin yapısal özelliğini taşıyan deri, saç ve tırnak gibi dokuları enfekte ederler (Weitzman & Summerbell, 1995).

Fungal tanılama ve taksonomik ilişkilerin belirlenmesinde ve simbiyoz ilişkilerin anlaşılmasında moleküler genetik bilgiler önem arz ederler (Bruns, White & Taylor, 1991).

DNA barkod genleri referans alınarak oluşturulan yüksek kaliteli sekans veri tabanları sayesinde fungal tanımlama ve biyoçeşitliliğinin belirlenmesi konularında başarılı sonuçlar elde edilmektedir (Begerow, Nilsson, Unterseher & Maier, 2010).

DNA üzerinde hedeflenen sekansın *in vitro* koşullarda enzimatik olarak amplifikasyonunu gerçekleştiren moleküler biyoloji ve genetik prensiplere dayalı olan PCR yöntemi kullanılarak enfeksiyöz ve genetik temelli hastalıkların ve karsinojenik hastalıkların tanıları ve teşhisleri yapılmaktadır. PCR çalışmaları sıcaklık, zaman ve döngü sayılarının düzenlenebildiği medikal cihazlar kullanılarak DNA amplifikasyon işlemleri yapılmaktadır (Türkyılmaz & Esendal, 2002).

Polimeraz zincir reaksiyonuna (PCR) dayalı teşhisler söz konusu olmazsa global ölçekte en yaygın epidemileri kapsayan dermatofitozis etkeni patojenlerin tanılanması, klinik örneğin mikroskobik incelemesi ve *in vitro* kültüre alındığı uzun süren ve hassasiyeti düşük seyreden yöntemlere dayalı olmaktadır. Dermatofit patojenlere ait genetik sekans kayıtları 24 saatten kısa bir zaman diliminde ilgili patojenlerin Real-Time PCR testinde kullanılmak amacı ile tasarlanmıştır (Arabatzis vd., 2007).

Antifungal tedaviye hızlı bir şekilde başlanabilmesi için enfeksiyöz dermatofit patojenin doğru teşhisinin bir an önce yapılması önemlidir. Bu kapsamda ITS-1 ve ITS-2 gen bölgelerini hedef alan polimeraz zincir reaksiyonlarında kullanılmak üzere özelleşmiş oligonükleotid dizileri geliştirilmiştir (Hsiao vd., 2005).

Dermatofitoz karakteristik lezyonlarından kuşkulanılan hastalardan alınan klinik örneklerle yapılan geleneksel mikroskobi ve kültür çalışmaları ile senkron bir şekilde Beta-Tubulin gen bölgesi referans alınarak Real-Time PCR çalışmaları yapılmış ve tüm sonuçlar karşılaştırılmalı değerlendirildiğinde veriler birbirini destekler nitelikte bulunulmuş, tanılamada en hızlı ve doğru metodun genetik verilerin kullanıldığı Real-Time PCR olduğu belirlenmiştir (Motamedi vd., 2017).

Trichophyton rubrum türünün neden olduğu dermatofitoz çalışmasında alınan deri, saç ve tırnak klinik örneklerine yönelik yapılan moleküler tanılamalarda rDNA, SUB-1, SUB-2, SUB-3, SUB-4, SUB-5, SUB-6, SUB-7, RULAP-1 ve RULAP-2 virülans faktör etkeni genler ve 18 S rRNA-ITS-1 gen bölgesine yönelik PCR reakiyonları kurgulanmıştır (Alshibly & Al-Marshedy, 2019).

Dermatofit taksonomisinde rutin olarak kullanılmayan kalmodulin gen bölgesi hedef alınarak farklı dermatofit genus ve türlerinde çalışılmış, filogenetik kapsamda hem intraspesifik hem de interspesifik açıdan kalmodulin gen bölgesi ile ITS, BT2 ve TEF1-α gibi gen bölgeleri ile bir uyum göstermiştir (Ahmadi vd., 2016).

Dermatolojik hastalıkların önemli bir nedeni olan dermatofitlerin moleküler açıdan tanılanmalarında kullanılan yeni bilimsel teknikler sayesinde sadece tür düzeyinde değil türler arası seviyede alt tiplemenin yapılmasında ve suş farklılaşmasının analizinde de kullanılmıştır (Mochizuki, Takeda & Anzawa, 2017).

Eş zamanlı olarak birden fazla sayıdaki enfeksiyöz patojenin çok parametreli analizleri Multiplex Real-Time PCR reaksiyonları ile başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir (Barken, Haagensen & Tolker-Nielsen, 2007).

Çalışmada hedef türler olan *Trichophyton interdigitale*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton tonsurans*, *Trichophyton verrucosum* ve *Trichophyton violaceum* dermatofitlerinin her birine yönelik eş zamanlı olarak Aktin, ATP6, Beta-Tubulin, IGS-1, ITS-1, ITS-2, ITS-3, ITS-4, Kalmodulin, NTS, RPB-1, RPB-2 ve TEF-1α gibi barkod genleri ile varsa özgün başka bir gen bölgesine yönelik çalışılması, hedef türlerin her birine yönelik ve literatürde benzeri olmayan spesifitede forward primer, reverse primer ve prob oligonükleotid sekansların *in silico* formatta tasarlanması, tasarlanan primer ve probların sadece kendi hedeflerine yönelik çalışması ile 230 fungal ve 21 bakteri türü ile çapraz reaksiyon kontrolünün yapılarak çapraz reaksiyon vermediğinin Multiplex Real-Time PCR reaksiyonları ile desteklenmesi gibi kriterlerin birlikte gerçekleştirildiği bir çalışma literatürde bulunmamaktadır.

Trichophyton interdigitale türü için NTS, *Trichophyton rubrum* türü için ITS-2, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton tonsurans*, *Trichophyton verrucosum* ve *Trichophyton violaceum* türleri için ise ITS-1 gen bölgesine yönelik tasarlanan spesifik primer ve prob oligonükleotid sekansları sayesinde geleneksel kültür ve biyokimyasal tanılama yöntemlerine nazaran çok daha doğru ve hızlı tanılama imkanı verecektir. Çalışmada hedef olan türlerin neden olduğu dermatofitoz enfeksiyonu geçiren hastalardan alınan klinik materyallere yönelik tasarlanan primer ve prob setleri kullanılarak klinisyenlere çok daha hızlı tanı koyma ve ilgili hastalara çok daha erken bir zaman diliminde tedaviye başlama fırsatı sunacaktır.

Liyofilize formatta olan standart tür DNA'ları ile geleneksel kültür işlemlerinde üreyip-kolonize olan tür DNA'ları, çeşitli kimyasal solüsyonlar seyreltilmelidir. Çeşitli molaritelerde seyreltme yapılmasının nedeni Real-Time PCR uygulamasında önemli bir kriter olan LOD (Level of Detail) değerlerini yani tespit limitlerini belirlemektir (Forootan vd., 2017).

PCR çalışmaları açısından DNA ya da RNA genomik nükleik asit yapılarının ekstraksiyonu doğru bir şekilde yapılmaz ise PCR işlemleri esnasında doğru sonuçların

çıkması Taq DNA Polimeraz enzimini inhibe eden moleküller nedeniyle engellenebilir. Genomların ekstrakte edilmesi PCR'ın analitik, tanılama ve teşhis özgüllüğünü yüksek oranda arttıracaktır (Kahya, Büyükcangaz & Carlı, 2013).

Mikrobiyolojik kapsamda bakteriyel, fungal, paraziter ve viral patojenik ile non-patojenik yaşam formlarının tespiti, tanılanması, antijen yükünün ve kopya sayısının belirlenmesi bakımından kullanılan, çok daha doğru ve hızlı sonuç veren, moleküler biyoloji ve genetik prensiplere dayalı gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu bilimsel çalışmaların günümüzde en fazla kullanılan yöntemlerinden biri olarak literatürde bulunmaktadır (Kralik & Ricchi, 2017).

Liyofilize-yoğun bir formatta standart olarak ya da kültürden elde edilen tür DNA moleküllerinin yapısal ve genetik özelliklerini bozmadan ve distile suya oranla çok daha fazla saflık derecesine sahip olan bu solüsyon vasıtasıyla DNA moleküllerinin ilk seyreltme işlemleri yapılmaktadır (Millar, Jiru, Moore & Earle, 2000).

MGW ile seyreltmeleri başlatılan DNA moleküllerinin yine yapısal ve genetik özelliklerinin korunduğu, saflık derecesi yüksek bu kimyasal solüsyon ile yoğun DNA moleküllerinin seyreltme işlemleri tamamlanmaktadır (Torre, Agüero, Gomez-Aix & Aranda, 2020).

Hem hücresel süreçte hem de PCR işlemlerinde çoğaltılıp-işlem yapılan referans DNA molekülüdür.

DNA üzerinde istenilen hedef bölgenin çoğaltılmasını sağlayan oligonükleotid-primer setlerinin spesifikliğinin yüksek olması, amplifiye edilecek DNA molekülünde özgül olarak istenen bölgenin çoğaltılmasında işlevseldir. İstenilen bölgenin çoğaltılması kapsamında Forward (İleri), Reverse (Geri) ve Prob tasarımlar kullanılmaktadır. Primer-oligonükleotidler DNA molekülünde çoğaltılması istenen bölgeye tamamlayıcı nitelikte olan kısa genetik moleküllerdir. Primer-oligonükleotidler, DNA molekülünü oluşturan zincirlerden bir tanesine bağlanırken eş zamanlı olarak ilgili zincirin tamamlayıcı zinciri ile eşlenecek şekilde farklı sekans dizilerle tasarlanmaktadırlar.

PCR işlemlerinin ilk aşaması olan DNA molekülünün yüksek sıcaklık etkisi ile iki zincirinin birbirinden ayrılması sırasında yüksek sıcaklığın etkisi ile yapısında esas biyolojik görevi üstlenen, protein kısım olan, apoenzim-apoprotein komponentinin bozulmaması nedeni ile tercih edilen bir enzim olarak karşımıza çıkmaktadır. *Thermus aquaticus* isimli termofilik bir bakteri tarafından üretilen DNA Polimeraz enzimi olup, PCR işlemleri sırasında bu enzim oligonükleotidlerin 3' uçlarına uygun olan nükleotidleri ekleyerek DNA amplifikasyonunu gerçekleştirmektedir. Bu çalışma özelliğinden dolayı Forward ve Reverse primerler ile Problara ihtiyaç duymaktadır.

Taq Polimeraz enziminin aktivasyonu açısından substrat niteliğinde olan ve dolayısıyla DNA polimerizasyonu için önem arz eden nükleotid bileşenleridir.

PCR çalışmalarında işlevsel olarak kullanılan enzimlerin yapıları genellikle birleşik enzim (Holoenzim) özelliğindedir. Öyle ki enzimin biyolojik anlamda faaliyet gösteren esas protein kısmı (apoenzim-apoprotein)'na ek olarak bulunan yardımcı kısımda eğer bir vitamin molekülü ekleniyorsa (koenzim), bir mineral madde ekleniyorsa (kofaktör) adını almaktadırlar. Tampon çözeltilerin PCR işlemlerinde kullanılma nedenleri aktif enzim için gerekli mineral madde elektrolitleri ile vitamin kökenli koenzim moleküllerini enzime kazandırmaktadır.

Taq DNA Polimeraz enzimi başta olmak üzere DNA sentezinde görevli polimeraz enzimleri aktivasyonları için magnezyum iyonlarına ihtiyaç duymaktadırlar. Bundan dolayı ya $MgCl_2$ içeren bir tampon çözelti ya da direkt olarak $MgCl_2$ bileşiğinin kullanılması gerekmektedir. $MgCl_2$ bileşiğine; enzim aktivasyonunu sağlaması, d NTP moleküllerini kullanarak çözünür formatta farklı bileşikler oluşturması, DNA'nın çift iplik yapısının T_M (Melting Temperature: Erime Sıcaklığı) değerini yükseltmeleri ile Forward ve Reverse Primer yapılarının kalıp DNA molekülü ile kompleks oluşturma etkinliklerinin sağlamaları açılarından gereksinim duyulmaktadır.

PCR faaliyetlerinde *in vitro* koşullarda kullanılacak nükleotid dizilerinin, enzimlerin ve enzimlerin çalıştığı ortamın eppendorf tüp içerisindeki karışımlarına verilen isim olarak karşımıza çıkmaktadır.

Çalışılacak klinik materyal içeriğinde inhibitör madde varlığının bulunması, çevresel etmenlerden kaynaklı kontaminantların klinik materyale kontamine olması, reaktif tip ve hacimsel değerlerinin yanlış eklenmesi, PCR aşamalarında önem arz eden sıcaklık seviyelerinin doğru ayarlanamaması, çalışılan hem patojenik hem de non-patojenik yaşam formlarının nükleik asit genomlarında sonradan gelişen mutasyonların meydana gelmesi, kontaminasyon etmeni laboratuvar etmenlerinin kontrol edilmemesi ve çalışılan materyalde kontaminasyon ile yanlış pozitifliklerin meydana gelmesi ve PCR aşamalarında kullanılacak reaktifler ile malzemelerin optimize edilmemiş olması PCR çalışmalarında karşılaşılan sorunlar olarak karşımıza çıkmaktadır (Kahya vd., 2013).

BÖLÜM 3

MATERYAL VE METOD

3.1. Materyal

Bu çalışma kapsamında araştırma materyali olarak kullanılan ve standart suş olarak seçilen İspanya Tip Kültür Koleksiyon Merkezi (La Colección Española de Cultivos Tipo) ve Hollanda Fungal Tip Kültür Koleksiyon Merkezi (The Westerdijk Fungal Biodiversity Centre)'nden alınıp, tez çalışmasında kullanılan *Trichophyton* genusuna mensup dermatofitlerin tür isimleri ile kültür koleksiyonlarındaki standart suş numaraları Çizelge 1.'de verilmiştir.

Çizelge 1. Standart suşların tür isimleri ve numaraları

Dermatofit Tür İsmi	**Standart Suş Numarası**
Trichophyton rubrum	CECT 2794
Trichophyton mentagrophytes	CECT 2793
Trichophyton violaceum	CBS 319.31
Trichophyton tonsurans	CBS 318.31
Trichophyton verrucosum	CECT 2992
Trichophyton interdigitale	CECT 2921

3. 1. 1. Real-Time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

Çalışılan 6 standart *Trichophyton* dermatofit suşlarının sipariş edilerek temin edilen liyofilize haldeki yoğun genomik DNA molekülleri, yapısal özelliklerini bozmayan MGW solüsyonu ile NaN_3 çözeltileri sırayla kullanılarak 10^{-6} molar'dan 10^{-12} molar'a kadar seyreltildi. Yapılan seyreltmelerle Real-Time PCR işlemlerindeki LOD (Level of Detail) adı verilen tespit limitleri belirlenmiştir.

q-PCR reaksiyonları kapsamında eppendorf tüpleri içerisine alınan türlerin kalıp DNA molekülleri 2 µl hacimde, her türün forward ve reverse primerleri-prob sekansları bir reaksiyon için 0,365 µl hacimde, bir reaksiyon için 5 µl hacimde olacak şekilde dNTP moleküllerinin, tampon çözeltinin, $MgCl_2$ kofaktörünün ve 1U Taq DNA Polimeraz enziminin birlikte meydana getirdikleri qPCR mix çözeltilerinin üzerleri bir reaksiyon için 2,635 µl hacimde MGW solüsyonları ile tamamlanarak toplamda 10 µl hacimli kimyasal karışımlar PCR işlemlerinde kullanılmaktadır. Aşağıdaki çizelgelerde qPCR reaksiyonlarında çalışılan türler ile reaksiyonlar için gerekli olan reaktiflerin hacimsel değerleri her tür için ayrı ayrı olacak şekilde verilmiştir.

Çizelge 2. qPCR reaksiyonlarında kullanılan *Trichophyton interdigitale* reaktifleri ve hacim değerleri

Reaktif Adı	**1x µl**	**18x µl**
Trichophyton interdigitale-Forward	0,05	0,9
Trichophyton interdigitale-Reverse	0,05	0,9
Trichophyton interdigitale-Prob-FAM Boyalı	0,025	0,45
MGW	2,875	51,75
2x qPCR Mix	5	90
Genomik DNA	2	36
TOPLAM	**10**	**180**

Çizelge 3. qPCR reaksiyonlarında kullanılan *Trichophyton interdigitale+Trichophyton mentagrophytes* reaktifleri ve hacim değerleri

Reaktif Adı	**1x µl**	**18x µl**
Trichophyton interdigitale+Trichophyton mentagrophytes-Forward	0,05	0,9
Trichophyton interdigitale+Trichophyton mentagrophytes-Reverse	0,05	0,9
Trichophyton interdigitale+Trichophyton mentagrophytes-Prob-ROX	0,015	0,27

Boyalı		
MGW	2,885	51,93
2x qPCR Mix	5	90
Genomik DNA	2	36
TOPLAM	**10**	**180**

Çizelge 4. qPCR reaksiyonlarında kullanılan *Trichophyton rubrum* reaktifleri ve hacim değerleri

Reaktif Adı	**1x µl**	**18x µl**
Trichophyton rubrum-Forward	0,05	0,9
Trichophyton rubrum-Reverse	0,05	0,9
Trichophyton rubrum-Prob-FAM Boyalı	0,025	0,45
MGW	2,875	51,75
2x qPCR Mix	5	90
Genomik DNA	2	36
TOPLAM	**10**	**180**

Çizelge 5. qPCR reaksiyonlarında kullanılan *Trichophyton tonsurans* reaktifleri ve hacim değerleri

Reaktif Adı	**1x µl**	**18x µl**
Trichophyton tonsurans-Forward	0,05	0,9
Trichophyton tonsurans-Reverse	0,05	0,9
Trichophyton tonsurans-Prob-ROX Boyalı	0,015	0,27
MGW	2,885	51,93
2x qPCR Mix	5	90
Genomik DNA	2	36
TOPLAM	**10**	**180**

Çizelge 6. qPCR reaksiyonlarında kullanılan *Trichophyton verrucosum* reaktifleri ve hacim değerleri

Reaktif Adı	**1x µl**	**18x µl**
Trichophyton verrucosum-Forward	0,05	0,9
Trichophyton verrucosum-Reverse	0,05	0,9
Trichophyton verrucosum-Prob-HEX Boyalı	0,025	0,45
MGW	2,875	51,75
2x qPCR Mix	5	90
Genomik DNA	2	36
TOPLAM	**10**	**180**

Çizelge 7. qPCR reaksiyonlarında kullanılan *Trichophyton violaceum* reaktifleri ve hacim değerleri

Reaktif Adı	**1x µl**	**18x µl**
Trichophyton violaceum-Forward	0,05	0,9
Trichophyton violaceum-Reverse	0,05	0,9
Trichophyton violaceum-Prob-	0,025	0,45

HEX Boyalı		
MGW	2,875	51,75
2x qPCR Mix	5	90
Genomik DNA	2	36
TOPLAM	**10**	**180**

3. 2. Metod

Trichophyton interdigitale, Trichophyton mentagrophytes, Trichophyton rubrum, Trichophyton tonsurans, Trichophyton verrucosum ve *Trichophyton violaceum* dermatofit türlerinin DNA molekülleri, kontaminasyon riskini minimize edebilmek için UV filtreli laboratuvar biyogüvenlik kabininde işleme alınmıştır. Ayrıca -20 °C'de muhafaza edilen, çalışılacak her türün vidalı kapaklar içindeki, forward ve reverse primerleri, probları ve qPCR mix solüsyonları oda sıcaklığında çözündürülerek işleme alınmıştır.

İlerleyen aşamada literatüre uygun hacimlerdeki reaktif ve solüsyonlar, üzerlerine tür adları yazılan eppendorf tüpleri içerisine steril mikropipetler yardımı ile eklenmiştir. Bu hazırlanan karışımlar içerisine literatüre uygun MGW solüsyonları eklenmiştir.

Reaksiyon striplerindeki kuyucuklara 8 µl hacimdeki tüm qPCR Mix karışımları (dNTP+Taq DNA Polimeraz Enzimi+Tampon Çözelti+$MgCl_2$) 2'li gruplar halinde steril mikropipetler kullanılarak eppendorf tüplerinden striplere aktarılmış ve stripler kendi aparatları ile kapatılmıştır. Liyofilize-yoğun formattaki standart suş örnekleri sırasıyla MGW ve NaN_3 çözeltileri ile steril laboratuvar şartlarında tür DNA moleküllerinin yapısal özellikleri bozulmayacak biçimde 10^{-6} M'dan 10^{-12} M'a kadar seyreltilmiş ve her türün kendi seyreltik DNA'sı 2 µl hacimde daha önce hazırlanan striplere, her türün kendi karışım solüsyonun bulunduğu striplere, steril mikropipetler yardımı ile eklenmiştir. PCR reaksiyon striplerinin son kuyucukları her tür için çalışılan 2'li grupların tamamı için negatif kontrol olarak PCR çalışmasında bir referans olması açısından DNA molekülleri eklenmemiş ve diğer tüm reaktifler eklenmiştir.

Trichophyton interdigitale, Trichophyton mentagrophytes, Trichophyton rubrum, Trichophyton tonsurans, Trichophyton verrucosum ve *Trichophyton violaceum* dermatofit küflerinin her biri için NCBI nükleotid veri tabanından Aktin, ATP6, Beta-

Tubulin, IGS-1, ITS-1, ITS-2, ITS-3, ITS-4, Kalmodulin, NTS, RPB-1, RPB-2 ve TEF-1α gibi barkod genleri ile varsa özgün başka bir gen bölgesine ait genetik sekansların FASTA dosyaları indirilmiştir.

Clustal Omega programına, türler arasındaki DNA genetik dizilerinin benzerlikleri ve farklılıklarının belirlenmesi yani hedef gen bölgeleri bulunması için indirilen FASTA dosyaları yüklenmiştir. Elde edilen sonuçlardan farklılık gösteren bölgeler PROB olarak referans alınmış ve bu proba uygun olarak FORWARD ve REVERSE PRİMER tasarımları yapılmıştır. Eş zamanlı olarak, çalışılan türler ile ilgili çok az veri bulunduğundan ve tam genomik yapıları belli olmadığından, literatürden çok sayıda makale taramaları ve incelemeleri ilgili türler için forward ve reverse primer varlıkları ile bu primerlerin hangi gen bölgelerini ifade ettikleri kriterleri göz önüne alınarak yapılmıştır.

Primer 3 programına spesifik forward ve reverse primerler ile prob tasarımları için *Trichophyton interdigitale*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton tonsurans*, *Trichophyton verrucosum* ve *Trichophyton violaceum* dermatofit küflerinin her birine ait spesifik barkod genlerine ait DNA nükleotid dizileri NCBI nükleotid veri tabanından indirilip, ilgili programına aktarımı yapılmıştır. İndirilen FASTA dosyaları genetik sekans bilgilerini Primer 3 programına aktardıktan sonra çalışma açısından 5' forward primer tasarla anlamına gelen "Pick Left Primer" kısmı, 3' reverse primer tasarla anlamına gelen "Pick Right Primer" kısmı ile prob tasarla anlamına gelen "Pick Hybridization Probe" kısımları kapsamında işlemler gerçekleştirilmiştir. Primer 3 programında çalışmanın doğruluğu açısından "General Primer Picking Conditions" bölümünde "Primer T_m" kısımlarına literatür incelemeleri ile desteklenen sıcaklık değerleri olarak Minimum 59°C, Optimum 60°C, Maksimum 63°C olarak girilmiştir. "Max. Self Complementarity" kısmına 5 bilgisi girişi kontrol edilmiştir.

Primer 3 programı kapsamında "Internal Oligo (Hyb Oligo) General Conditions" bölümünde "Internal Oligo Size" bilgilerine literatür incelemeleri ile desteklenen ortalama doğru değerler olarak Minimum 18, Optimum 20, Maksimum 24 olarak, "Internal Oligo T_m" bilgilerine ortalama doğru değerler olarak Minimum 63°C, Optimum 66°C, Maksimum 70°C olarak girilmiştir. Bunlara ek olarak "Internal Oligo

Self Complementarity" kısmına 5, "Internal Oligo Max 3' End Self Complementarity" kısmına 3 yazılmıştır.

Primer 3 programına veriler işlendikten sonra her türe ait forward primer, reverse primer ve probların T_M değerleri belirlenmiş oldu ve sistemde çalışıldığında primerler ile problar arasındaki çalışma sıcaklıklarının arasındaki fark minimum 3°C, maksimum 10°C olacak şekilde tasarım ve planlamaları yapılmıştır.

Clustal Omega programından elde edilen ve farklılık gösteren oligonükleotid sekans dizi bölgeleri "Pick Hybridization Probe (Internal Oligo), or use Below" kısmına prob bilgisi olarak girilmiştir. Primerler ile ilgili kullanılan enzimler en iyi 55-63°C sıcaklık değerinde çalıştığından, problar ile ilgili kullanılan enzimler en iyi 63-70°C sıcaklık değerinde çalıştığından bu sıcaklık değerleri girişi, primerler ile problar arasındaki çalışma sıcaklıkları arasındaki fark minimum 3°C, maksimum 10°C olacak şekilde tasarım ve planlamaları yapılmıştır. Program üzerinde oligonükleotid dizi sekanslarının, 3' ucun kendi kendine bağlanıp bağlanmaması ve saç tokası (hairpin) moleküler yapısal özellikleri kontrol edildikten sonra "PICK PRIMERS" butonuna basıldıktan sonra kontrollü olarak işlenen tüm verilerin ışığında primer tasarımlarının gerçekleştirilmesi açısından değerlendirilmiştir.

Primer 3 programından elde edilen sonuçlar kapsamında primerlerin ve probların DNA nükleotid uzaklıkları tespit edilmiştir. Böylelikle tasarlanan probun forward kısma mı yoksa reverse kısma mı yakın olduğu belirlenmiştir. Literatür taramaları ve çalışmalar boyunca çok sayıdaki denemelerden elde edilen tecrübeler kapsamında tasarlanan prob, forward primere DNA nükleotid uzaklıkları bakımından yakın ise forward primer bilgilerini forward bilgileri kapsamında, reverse primer bilgileri prob olarak işlenmiştir. Aynı tarama verileri ve tecrübeler kapsamında tasarlanan prob, reverse primere DNA nükleotid uzaklıkları bakımından yakın ise reverse primer bilgilerini reverse bilgileri kapsamında, forward primer bilgileri prob olarak işlenmiştir. Programa işlenen veriler doğrultusunda Primer 3 programında "Pick Hybridization Probe (Internal Oligo), or use Below" satırına sekans bilgileri yazılmıştır. "PICK PRIMERS" butonuna basıldıktan sonra tasarımlar tamamlanmıştır.

Elde edilen sonuç verileri spesifite testleri için her türün prob ve primer tasarımlarının özgünlüğünü bilimsel anlamda onaylamak açısından NCBI Primer Blast

programına aktarımı gerçekleştirilmiştir. Bu programda "Database" kısmında otomatik olarak duran seçenek olan "Refseq m RNA" kısmı "nr (no reference)" olarak tüm veri tabanındaki bilgilerin taranabilmesi açısından değiştirilmiştir. "Organism" kısmı tüm veri tabanı datalarının taranabilmesi açısından silinip-sıfırlanmıştır. Bilgi aktarımlarının yapılması ve sistem tarama ayarlarının anlatılan şekilde değiştirilmesinin ardından "GET PRIMERS" butonuna basıldıktan sonra çıkan sonuçlar NCBI veri tabanına göre tasarlanan primerlerin çalıştığımız türe spesifik olduğu sanal ortamda *in silico* açıdan test edilmiştir.

Eş zamanlı olarak eğer prob sekansı forward primere yakın ise forward primerin ve probun bağlandığı genetik bölge nükleotid sekansları kopyalanmış ve NCBI Nükleotid Blast programına aktarılıp, ilgili genetik bölgelerin çalışılan türden başka bir canlı yaşam formuna ait olmadıkları tespit edilmiştir.

Tüm çalışılan dermatofit küf patojenleri için spesifik olarak tasarlanan, spesifite testleri ile özgünlüğü kanıtlanan Forward Primer, Reverse Primer ve Problar'ın *in silico* kapsamda bilimsel faaliyetleri tamamlanmış ve tür DNA'ları proje kapsamında sipariş ve temin edilmiştir.

Tüm bu uzun aşamalardan sonra PCR reaksiyonları çoklu hedeflere yönelik tasarlanıp-geliştirilen Multiplex Real-Time PCR mantığı ile gerçekleştirilmiştir. PCR işlemleri açısından *Trichophyton interdigitale*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton tonsurans*, *Trichophyton verrucosum* ve *Trichophyton violaceum* olmak üzere 6 hedef tür, FAM-HEX-ROX olmak üzere 3 PCR boyası kullanarak PCR reaksiyonlarının kurulumu gerçekleştirilmiştir. Tek PCR düzeneği üzerinde tüm PCR deneylerinin tamamlanması mümkün değildir çünkü PCR cihazında 96 adet test kuyucuğunun bulunması, çalışmalarda aynı boyaların kullanılması nedeni ile sonuçların yanlış pozitiflik vermesi ve çakışması, referans kültür veri bankasında bulunan çok sayıdaki bakteriyel ve fungal suşlar ile çapraz reaksiyon kontrolünün yapılması gibi nedenlerden dolayı PCR deneylerinin sayısı birden fazla olarak gerçekleştirilmiştir. 3 PCR mantık kurgusu başlığı çok sayıda PCR deneyleri gerçekleştirilmiştir.

Trichophyton rubrum, *Trichophyton tonsurans* ve *Trichophyton verrucosum* dermatofit küf patojenleri için TRICOPLEX 1 adı verilen 1. Multiplex primer ve prob

seti PCR mantıksal kurgusu, *Trichophyton interdigitale, Trichophyton mentagrophytes* ve *Trichophyton violaceum* dermatofit küf patojenleri için TRICOPLEX 2 adı verilen 2. Multiplex primer ve prob seti PCR mantıksal kurgusu, referans kültür bankasında bulunan bakteriyel ve fungal suşlar ile çapraz reaksiyon kontrolleri ve tespit limitlerinin LOD değer analizlerinin değerlendirilmesi açısından PCR mantıksal kurgusu şeklinde gerçekleştirilmiştir.

Çalışılan dermatofit küf patojenlerinin DNA molekülleri standart suş kapsamında temin edildiği için MGW ve NaN_3 solüsyonları ile yapılan seyreltmelerdeki kopya sayısı bilinmektedir. Bu kapsamda temin edilen tür DNA molekülleri 10^{-7} M hacimde 10^5 kopya mikrofungal DNA sayısını bulundurmaktadır. Örnek olarak yapılan en son seyreltmede 1 tane kopya/1 ml olup, PCR reaksiyonunda da çoğaldığı takdirde Analitik Duyarlılık yani Tespit Limiti (LOD) kapsamında 1 hücre/1 ml referans yorumu ile deneysel sonuçların açıklamaları gerçekleştirilmiştir.

Real-Time PCR reaksiyonları kapsamında kullanılan FAM-HEX-ROX isimli 3 PCR boyası, Tricoplex 1 PCR mantıksal kurgusu dahilinde *Trichophyton rubrum* için FAM boyası, *Trichophyton tonsurans* için ROX boyası ve *Trichophyton verrucosum* için HEX boyası kullanılmıştır. Tricoplex 2 PCR mantıksal kurgusu dahilinde *Trichophyton interdigitale* ile *Trichophyton mentagrophytes* kompleksi için ROX boyası, *Trichophyton interdigitale* için HEX boyası ve *Trichophyton violaceum* için FAM boyası kullanılmıştır. Tricoplex 1 ve Tricoplex 2 PCR kurgularında hangi tür için hangi boyanın kullanılacağına randomize olarak karar verilmiştir.

Çalışma kapsamında *in silico* tasarlanan probların proje kapsamında alımı yapıldıktan sonra prob ile bilinmesi gereken; türler için randomize olarak ataması yapılan ilgili boya ile baskılayıcı BHQ tip kimyasalları kompleks olarak Boya-Prob Sekans Nükleotid Dizisi-BHQ formatı ile gelmektedir. PCR reaksiyonlarında tasarlanan primerler ve probların mantıksal mekanizması; aranılan tür var ise primerler ve prob ilgili genetik bölgeye yapışmış, Taq DNA Polimeraz enzimi prob ile kompleks olan boya kimyasalını probtan kesmiş ve artık boya ile BHQ baskılayıcı kimyasal artık aynı kompleks zincir içerisinde olmadığından türe randomize atanan boya molekülleri ışıma vermiş ve bu şekilde Real-Time PCR cihazı açığa çıkan belli bir dalga boyundaki

ışınların absorbans değerlerine göre sigmoidal eğri vermiş ve çıkan sonuca göre aranılan türün varlığı kanıtlanmıştır.

Çalışmada bahsedilen tüm bilimsel tasarım ve deneysel içerikler kapsamında yine detayları verilen PCR reaksiyonlarında cihaza yüklenen tüm örneklemler için 1. Döngü Preinkübasyon-Denatürasyon olarak 5 dakika boyunca 95°C' de tutulmuş, DNA çift iplikli genomik yapıları açılmış ve aynı zamanda Taq DNA Polimeraz enziminin aktivasyonu gerçekleştirilmiştir. Sonrasında tasarlanan primer ve probların oligonükleotid sekanslarının spesifik bölgelere bağlandığı Annealing=Amplifikasyon=Hibridizasyon aşamasına geçilmiş ve 10 saniye süreyle 95°C' de tutulmuş ve 52°C'de 30 saniye süreyle tutulan DNA Polimeraz enziminin 5' yönünden 3' yöne doğru nükleotidleri Mg^{+2} iyonları varlığında, optimum koşullarda primerlerin uzayarak DNA sentezlemelerini içeren Extension (Uzama) aşamaları da 40 döngü olarak gerçekleştirilmiştir. Real-Time PCR sistemi (Roche, ABD) LightCycler96 cihazı ve yazılımı kullanılarak belirlenen (C_q) 37 değerinin altında ise reaksiyonlar pozitif olarak değerlendirilmiştir.

3. 2. 1. *Trichophyton interdigitale* Türüne Yönelik Spesifik Oligo Tasarımı

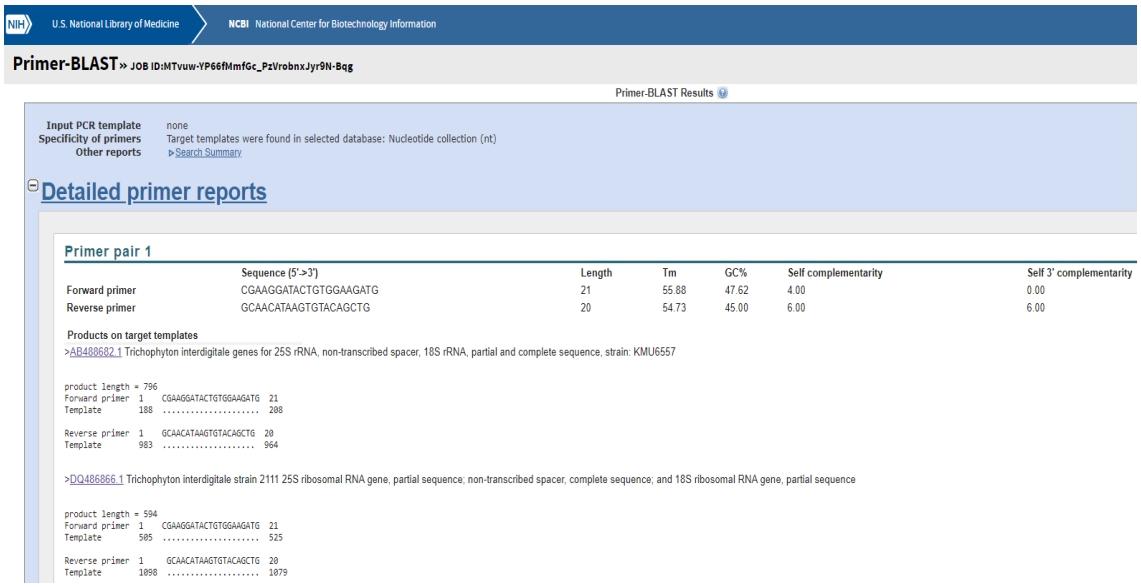
Google Scholar platformu üzerinde *Trichophyton interdigitale* dermatofit küf patojenine yönelik yapılan PCR çalışmaları araştırılmıştır. Araştırmalar neticesinde Birleşik Krallık ve Japonya'da ortak yürütülmüş bir bilimsel çalışma (Jackson, Mochizuki & Barton, 2006) referans olarak alınmıştır.

Bu bilimsel çalışma kapsamında *Trichophyton interdigitale* türüne ait non-transcribed spacer (NTS) genetik bölgesine yönelik primer setleri tasarımı gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.2.1.1.). İlgili bilimsel makale kapsamında kullanılan primerlerin genetik bölge NCBI nükleotid veri tabanından (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/) FASTA dosya formatında indirilmiştir (Şekil 3.2.1.2.).

İndirilen FASTA dosya formatı Primer 3 programına (http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/) aktarımı gerçekleştirildi. Primer 3 programı üzerinde DNA dizisi üzerinde manuel olarak tasarımlar gerçekleştirildi. Forward primer sekmesine DNA dizisi üzerinden bir bölge seçilen bir bölge girilmiştir. DNA dizisinden

seçilen bölgenin, Reverse Complement programı (https://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html) kullanılarak ters komplementer bölgesi belirlenip-alındıktan sonra reverse primer sekmesine girilmiştir. Prob olarak yine DNA dizisi üzerinden bir bölge seçilmiş ve Primer 3 programı üzerinde prob sekmesine veri girişi yapılmıştır. "Pick Primers" butonu ile veri bilgilerinin girişinin yapıldığı primerlere ait sıcaklık, 3' ucun kendi üzerine katlanıp bağlanıp bağlanmaması ve saç tokası (hairpin) moleküler yapısal özellikleri incelenmiştir (Şekil 3.2.1.3.).

Tasarlanan primerler ve prob setinde (Çizelge 8.) prob forward primere daha yakın olarak tasarlanmıştır (Şekil 3.2.1.4.). İlerleyen süreçte tasarlanan primer ve prob setinin fungal ve bakteriyel suşlar ile çapraz reaksiyon verip-vermediği durumunun tespit edilebilmesi için NCBI Primer Blast programı kapsamında forward primer sekmesine forward primer bilgileri, reverse primer sekmesine ise tasarladığımız prob oligonükleotid dizisinin reverse complement bilgisinin girişi yapılmıştır. "Get Primers" butonu ile prob ve reverse primerin hangi türleri çoğalttığı bilgisinin tespiti NCBI veri tabanında test edilmiştir (Şekil 3.2.1.5.). Tasarım faaliyetlerine NCBI veri tabanından sadece *Trichophyton interdigitale* dermatofit patojenik türünü çoğaltana kadar manuel olarak deneme yanılma yöntemi ile devam edilmiştir (Şekil 3.2.1.6.). Tasarlanan primerlerin NCBI veri tabanına göre özgünlüğünden emin olunduktan sonra başka bir spesifite testi denemesi amacı ile prob ve reverse primer dizisinin bağlandığı genetik bölge NCBI Nücleotide Blast programında (https://blast.ncbi.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch) yeniden test edilmiştir (Şekil 3.2.1.7.).



Şekil 3.2.1.1. Makaleden (Jackson vd., 2006) alınan primer setinin çoğalttığı genetik bölgenin NCBI veri tabanından bulunması.

Trichophyton interdigitale genes for 25S rRNA, non-transcribed spacer, 18S rRNA, partial and complete sequence, strain: KMU6557

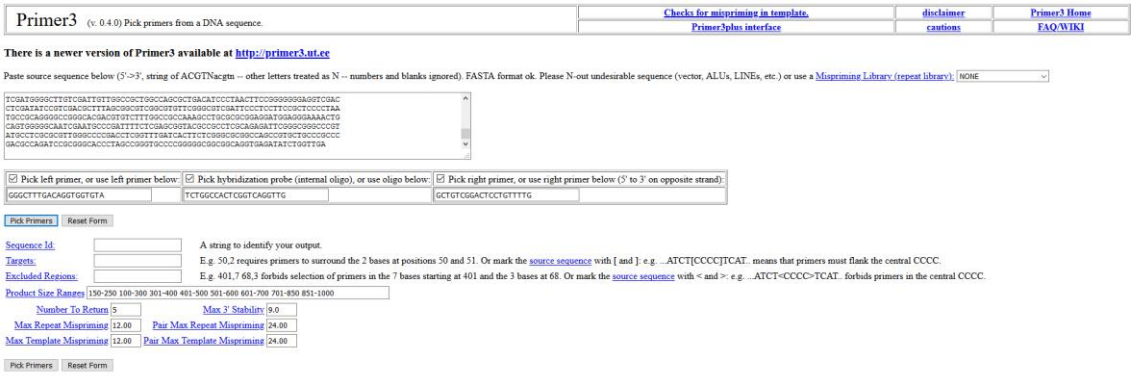
GenBank: AB488682.1

GenBank Graphics

>AB488682.1 Trichophyton interdigitale genes for 25S rRNA, non-transcribed spacer, 18S rRNA, partial and complete sequence, strain: KMU6557

CCTCTGCAGACGACTGAAGTGAGCAAGCGGGTCGTGTAAGCGGTCAAGTAGCCTTGTTGTTACGAGTCGC
TGAGCGTCAGCCCGATCCTTGCCTAGATTTGTTGTAACACTCTCCCACCAAGCGGCATCCGGCGAGAGAT
CCGGGCCTTTAGAGGGGGGGAAGCAGCAGGTTTTGGGGGGAGTGGAACGAAGGATACTGTGGAAGATGGT
ACTTTGGGAGGGGTCGGATGGGCTTTGACAGGTGGTGTATATAGCGTGGTCATGTCTGGCCACTCGGTCA
GGTTGTTATTTTTTGTCCTTCTGCGTTTTGTGCGTTGGGGGTGGGGGGCGACGGCGGCCTGCGGCCGCCG
CCTCGGGGGGGGCCCCTTCGGGGCCGGAAAATTTTTGAATTTTGGGCGCCGGAAAAGTGATTTTGAAGGC
GTAGTTGGGGGTCAAAACAGGAGTCCGACAGCTAAGTTTAGAGGGCGCGCGCGCCCGCCGGAGCAGTCCG
ACGCCTAAGCACAGGGCGCGCGGGGCAGTCCGACGCCTAAACTTGGGGCGCGCGGGGCAGTCCGCCAGCT
AAAGGGTAAGTTAAGGGTAGCCGTATTTAGGGCGCGCGCGCCCTGCGGAACGGCCCGACAGCTAAGTTGA
AGGCCGCGCGGCAGCAGTCCGACAGCTAAGTTTAGAGGGCGCGCGCGCCCGCCGGAGCAGTCCGACGCCT
AAGCACAGGGCGCGCGGGGCAGTCCGACGCCTAAACTTGGGGCGCGCGGGGCAGTCCGACAGCTAAAGAC
TAAGCTAAGGGTAACCGTACTTAGGGCGCGCGCGCCCTGCGGAGCGGCCCGACAGCTAAGTTGAAGGCCG
CGCGGGGCAGTCCGACGCCTAAGCATAAGGCGCGCTGAGGAGTCCGACAGCTAAATTGAGGGGCGCGCGT
GCACGCCGGAACGGTCCGACGCCGAAACTTGGGGGGCGCGCAGAGGAGTCCGGCAGCTGTACACTTATGT
TGCTAAAGGCAAAAGACATAGCCGTAGTTATAAAAATTTTAATAATAGAAATGAATACAAATACTTCATA
TTTTTTTACAATTTGCTATTTTGTAGATGCTGAATTGTAGAGAGCTCCTAACCACCGCGGGAGCGTTTGG
TATTGCGGCCCCCTAATCGCTCCGGGGTTGCTCCAGGCGTGCTCTACGGTCGATTTGGAGACGATTGATA
TGTACCTCGCCGCCGCCGGACGCCATTAGACCCTCCAAAATCGAGTGGTCCCAGGGGGGCCGTTTTCTGG
AAATGGACCCTCTGCACAAAATGGACCCTCTGGCCAAATGGGCCCTCTGGCAGGACGGCCCCTCTGGCAA
AACGGCCCCTCTGGACCAGACGGACCCTCTGGGCCATTTTGACAAAATGGACCCTCTGGCCGAGGGGCCA
CGGCCCCCCTAGGGGGGCCATTTGGGGCCGAAAAAAAAAGTGCTCCAAATCGCTCCGGGGTTGATCCAGG
CATACTCTACGGTCGATTTGGAGGCGATTGGTATAGACCTCACCGCCGCCGGACCCCTATGGACCCTCCA
AAACGGAGCGGTCCCAGGGGGGCCGTTTTCTAGAAATGGACCCTCTGGCCAAATGGGCCCTCTGGCAGGA
CGGCCCCTCTGGCAAAACGGCCCCTCTGGACCAGACGGACCCTCTGGGCCATTTTGACAAAATGGACCCT
CTGGCCGAGGGGCCACGGCCCCCCTAGGGGGGCCATTTGGGGCCGAAAAAAAAAGTGCTCCAAATCGCTC
CGGGGTTGATCCAGGCATACTCTACGGTCGATTTGGAGGCGATTGGTATAGACCTCACCGCCGCCGGACC
CCTATGGACCCTCCAAAAATGGGCGGCCCCAGGGGGTCCATTTTTCTAGAAAACGGCCCCCCCGGGGCGT
TTGGTATTGGAGGCCCGGAACGACTCCGGGGTTGCTCCAGGCGTGCTCTACGGGTGATTTGGAGCCGATT
GATATGTACCTCGCCGCCGCCGGACCCCTATGGACCCTCCAAAACGGAGTGGTCCCCATGGTCTGATAGT
TCCGCCCTTGTATTTTTTTCATTTTTGAGGCCGCCAGAATAGATTTTATGCAAATCTCTCTATATCTATAT
TATTTTCTACGGGAATGGGTGCGTCTTCGAGGCGAACGAGCCCTTCTCACCAAAAAAATAATAAAGTTGC
CCCGATCCGGCTGCGGCCCTCACACGTGACTGCTACTACTCCCCTATACCCCCCCTAGAGATGCCAGATC
GAAAGCACCCCTACCCGCCGACTTATGCCACCTTCGAGTTTTGAAATCAAAAAAATTTTGACTAAGTCCG
CGTTTTTGTTCTGTTCGAGCCTCTGCGAAACGTCAATTTTGCGGGCGTCAAGCCCACTTTCGACTCGACC
CATATAAATTTCGTGCAACACCGGACCCGACTGGGCCCACCCCACCCATCGCGTGCGAGGTCGCTTAAAC
AGACCTCGGTGAGTATATGTAGGGTGAGGTGATTCCGAAAAACAAAAAGTGGGCGAAGGGTATCTTCTCT
ACGTTTAGCGGTTGACCTTCATTCTAGCTATGGTTCTGGGGGCATTCGTGGGCTTGGGGGCGGCTGGTTG
GGCGTGGTTAGTTAAGACCTTTTAACTAAGGCTTAGCGGTCGACGCCCGGCTGGTTAAACCGTGCGGGCT
TCAGCGTGGCTAGTTGGGCGTGGGGCTTATCTAGGACCTTTTAATTAAGGCTTAGTGGTCGATGTCTAGC
TGGTGAAGCTTTGCGGGCTTGTGTATGGCTGGTTGGGCGTGGTCAGCTAGGATCTTTTAACTAAGGTTTA
GCGGTCGGCGTGCAACTGGTTAAGCCTTGCGGGCTTGGGCGCGACTGGTTGGGCGTGGTCAGCTGGGGGC
CTTTTAATTAAGGCTTAGCGGTCGACGTTTAGCTGGTAAAGCCTGGTTGGGCGTGGTTAGTTAGGACCTT
TTAACTAAGGCTTAGCGGTCGACGCCCGGCTGGTTAAGCCTCGTGGGCTTGGGCGCGGCTGGTTGGGCGT
GGTTAGTTAGGACCTTTTAATTAAGGCTTAGCGGCTCGTCTGTCTGTGATTCGTGCTTTTGGGTTTCTTG
TTCGCTGAGATCGGCTCTCGATGTCAAGGCTTCCAGCCCTAGGTTGGGCTTTCGACGTTCGGGGCGGTTC
TGCGGCCCTCGGCGGCCTCATGGCTCGGCTGAGGGTTGCCCGAATTCCTAACGTTCTCGTACGATAGGTT
TCGATGGGGCTTGTCGATTGTTGGCCGCTGGCCAGCGCTGACATCCCTAACTTCCGGGGGGGAGGTCGAC
CTCGATATCCGTCGACGCTTTAGCGGCGTCGGCGTGTTCGGGCGTCGATTCCCTCCTTCCGCTCCCCTAA
TGCCGCAGGGGCCGGGCACGACGTGTCTTTGGCCGCCAAAGCCTGCGCGCGGAGGATGGAGGGAAAACTG
CAGTGGGGGCAATCGAATGCCCGATTTTCTCGAGCGGTACGCCGCCTCGCAGAGATTCGGGCGGGCCCGT
ATGCCTCGCGCGTTGGGCCCCGACCTCGGTTTGATCACTTCTCGGGCGCGGCCAGCCGTGCTGCCCGCCC
GACGCCAGATCCGCGGGCACCCTAGCCGGGTGCCCCGGGGGCGGCGGCAGGTGAGATATCTGGTTGA

Şekil 3.2.1.2. Makaleden (Jackson vd., 2006) alınan primerlerin çoğalttığı Non-Transcribed Spacer (NTS) bölgesi.



Şekil 3.2.1.3. Primer 3 programına Non-Transcribed Spacer (NTS) genetik bölgesinin DNA dizisinin girilmesi ve Primer 3 programı ile manuel tasarımı.

Primer3 Output

```
PRIMER PICKING RESULTS FOR AB488682.1 Trichophyton interdigitale genes for 25S rRNA, non-transcribed spacer,

No mispriming library specified
No hyb oligo mishyb library specified
Using 1-based sequence positions
WARNING: Hybridization probe is unacceptable: Tm too high

OLIGO            start  len      tm      gc%   any   3'  seq
LEFT PRIMER        230   20   60.95    55.00  3.00  2.00 GGGCTTTGACAGGTGGTGTA
RIGHT PRIMER       452   20   60.83    55.00  5.00  0.00 GCTGTCGGACTCCTGTTTTG
HYB OLIGO          265   21   68.05    61.90  6.00  1.00 TCTGGCCACTCGGTCAGGTTG
SEQUENCE SIZE: 3637
INCLUDED REGION SIZE: 3637

PRODUCT SIZE: 223, PAIR ANY COMPL: 5.00, PAIR 3' COMPL: 0.00

    1 CCTCTGCAGACGACTGAAGTGAGCAAGCGGGTCGTGTAAGCGGTCAAGTAGCCTTGTTGT

   61 TACGAGTCGCTGAGCGTCAGCCCGATCCTTGCCTAGATTTGTTGTAACACTCTCCCACCA

  121 AGCGGCATCCGGCGAGAGATCCGGGCCTTTAGAGGGGGGGAAGCAGCAGGTTTTGGGGGG

  181 AGTGGAACGAAGGATACTGTGGAAGATGGTACTTTGGGAGGGGTCGGATGGGCTTTGACA
                                                     >>>>>>>>>>>

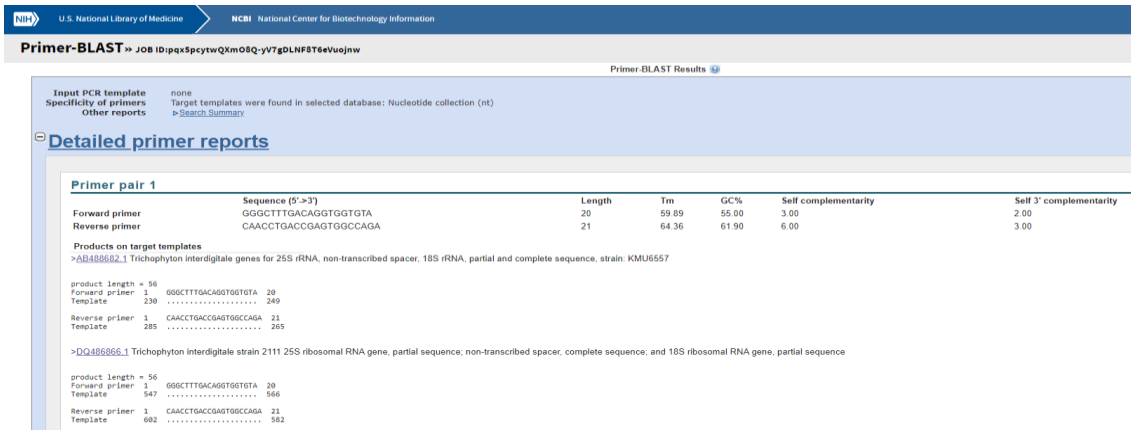
  241 GGTGGTGTATATAGCGTGGTCATGTCTGGCCACTCGGTCAGGTTGTTATTTTTTGTCCTT
      >>>>>>>>>               ^^^^^^^^^^^^^^^^^^^^^^^

  301 CTGCGTTTTGTGCGTTGGGGGTGGGGGGCGACGGCGGCCTGCGGCCGCCGCCTCGGGGGG

  361 GGCCCCTTCGGGGCCGGAAAATTTTTGAATTTTGGGCGCCGGAAAAGTGATTTTGAAGGC

  421 GTAGTTGGGGGTCAAAACAGGAGTCCGACAGCTAAGTTTAGAGGGCGCGCGCGCCCGCCG
                  <<<<<<<<<<<<<<<<<<<
```

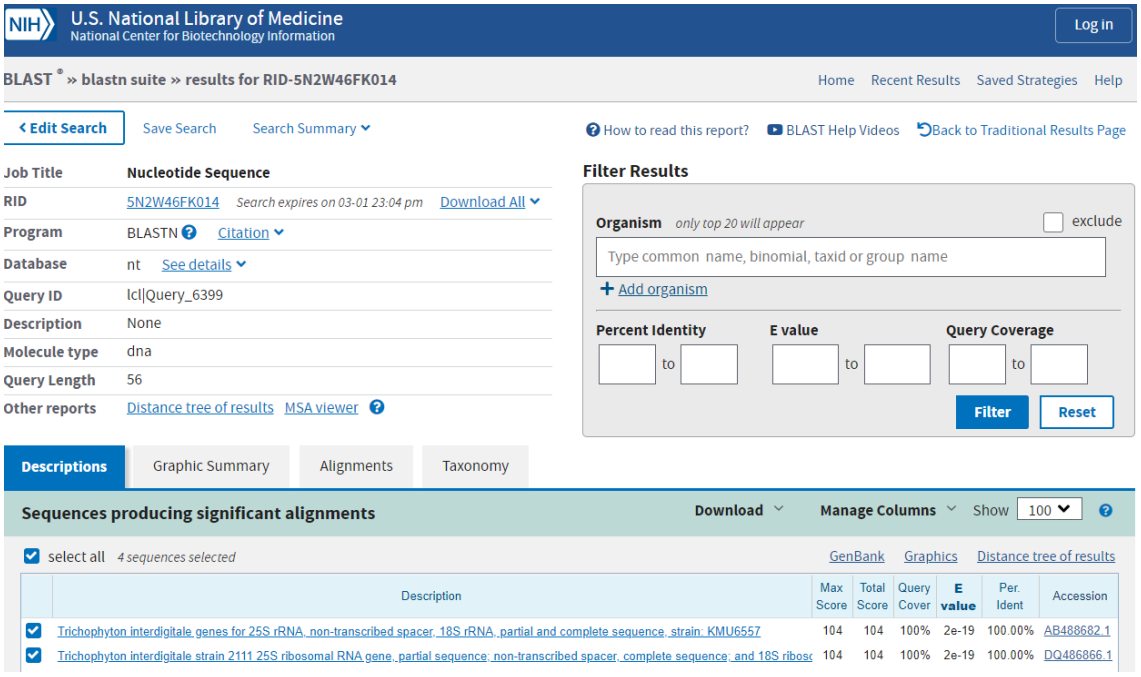
Şekil 3.2.1.4. Primer 3 programı kullanılarak yapılan manuel tasarım sonucu.



Şekil 3.2.1.5. Tasarlanan primer ve prob setlerinin NCBI Primer Blast programında yapılan spesifite testi sonucu.



Şekil 3.2.1.6. Tasarlanan primer ve prob setlerinin bağlandığı genetik bölgenin NCBI veri tabanından bulunması.



Şekil 3.2.1.7. Tasarlanan primer ve prob setlerinin bağlandığı genetik bölgenin NCBI nükleotid veri tabanından taranması.

Çizelge 8. *Trichophyton interdigitale* için tasarlanan primer ve prob setleri

Forward Primer	GGGCTTTGACAGGTGGTGTA
Reverse Primer	GCTGTCGGACTCCTGTTTTG
Prob	TCTGGCCACTCGGTCAGGTTG

3. 2. 2. *Trichophyton interdigitale* ile *Trichophyton mentagrophytes* Türlerine Yönelik Ortak Spesifik Oligo Tasarımı

Trichophyton mentagrophytes dermatofit patojenik küf türü ile *Trichophyton interdigitale* dermatofit patojenik küf türü için girilen NCBI nükleotid veri bilgileri, ilgili iki türü birbirinden ayırmak için yeterli olmadığından iki türü kapsayacak ortak primer ve prob setlerinin tasarımı yapılmıştır. *Trichophyton mentagrophytes* tür tespitinde tasarlanan primer ve prob setleri ile pozitif sonuçlar alıp, *Trichophyton interdigitale* türü için negatif sonuç alındığı takdirde hedef türün *Trichophyton mentagrophytes* olacağı sonucunun çıkarımı yapılmıştır.

Bu kapsamda Google Scholar platformu üzerinde *Trichophyton mentagrophytes* dermatofit patojenine yönelik yapılmış olan PCR çalışmaları araştırılmıştır. Araştırmalar neticesinde Japonya'da bir bilimsel çalışma (Miyajima vd., 2013) referans olarak alınmıştır (Şekil 3.2.2.1.) .

Bu bilimsel çalışma kapsamında *Trichophyton mentagrophytes* türüne ait internal-transcribed spacer 1 (ITS-1) genetik bölgesine yönelik spesifik prob setleri tasarımı gerçekleştirilmiştir. İlgili bilimsel makale kapsamında kullanılan prob oligonükleotid dizisinin bağlandığı genetik bölge NCBI nükleotid veri tabanından (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/) FASTA dosya formatında indirilmiştir (Şekil 3.2.2.2.).

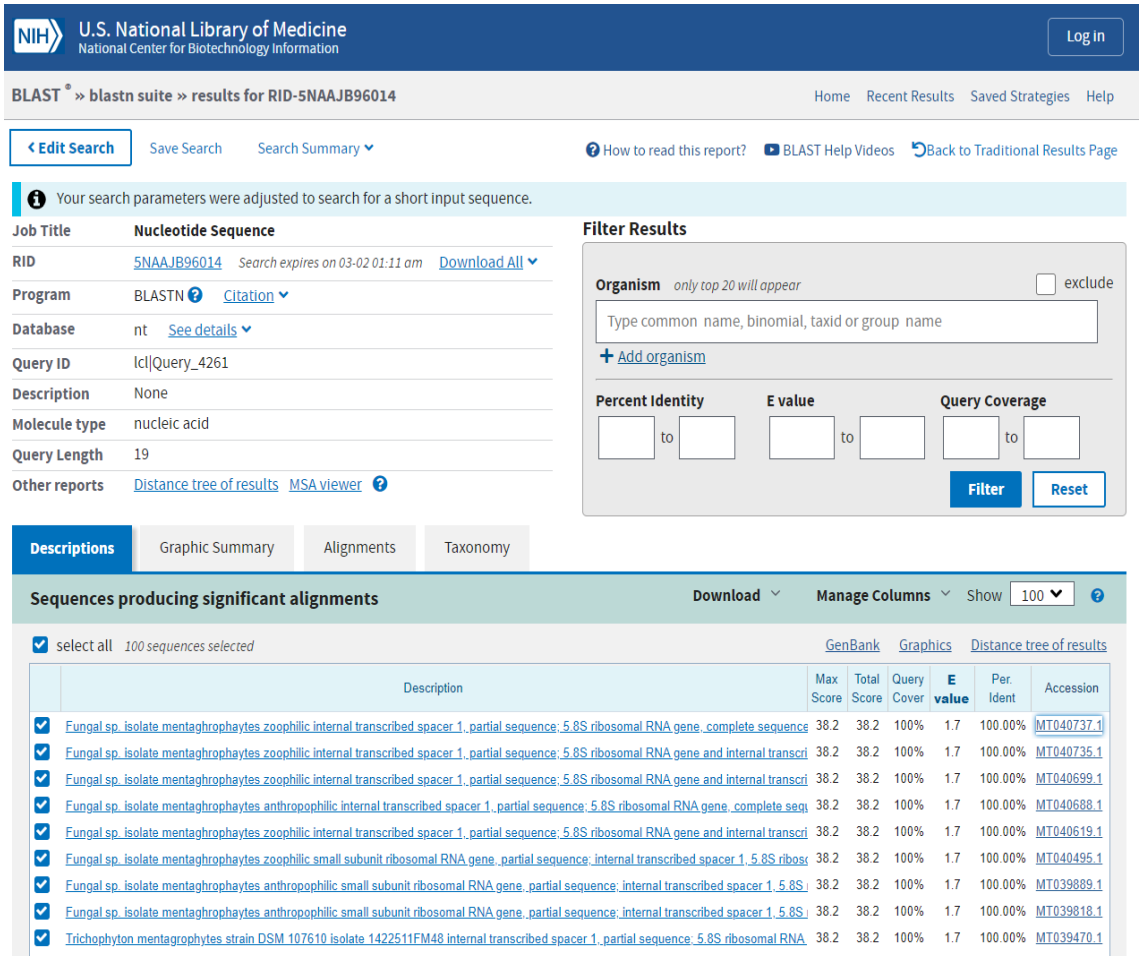
Primer 3 programı kapsamında DNA dizisi referans alınarak manuel olarak tasarımlar yapılmıştır. Forward primer sekmesine DNA genetik dizisi üzerinden seçilen bir bölge girişi yapılmıştır. DNA dizisinden seçilen bölgenin, Reverse Complement programı (https://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html) kullanılarak ters komplementer bölgesi belirlenip-alındıktan sonra reverse primer sekmesine girilmiştir.

Prob dizisi olarak yine DNA dizisi üzerinde bir bölge seçilmiş ve Primer 3 programında prob sekmesine veri girişleri yapılmıştır. "Pick Primers" butonu ile veri bilgileri girişi yapılan primerlere ait sıcaklık, 3' ucun kendi üzerine katlanıp bağlanıp

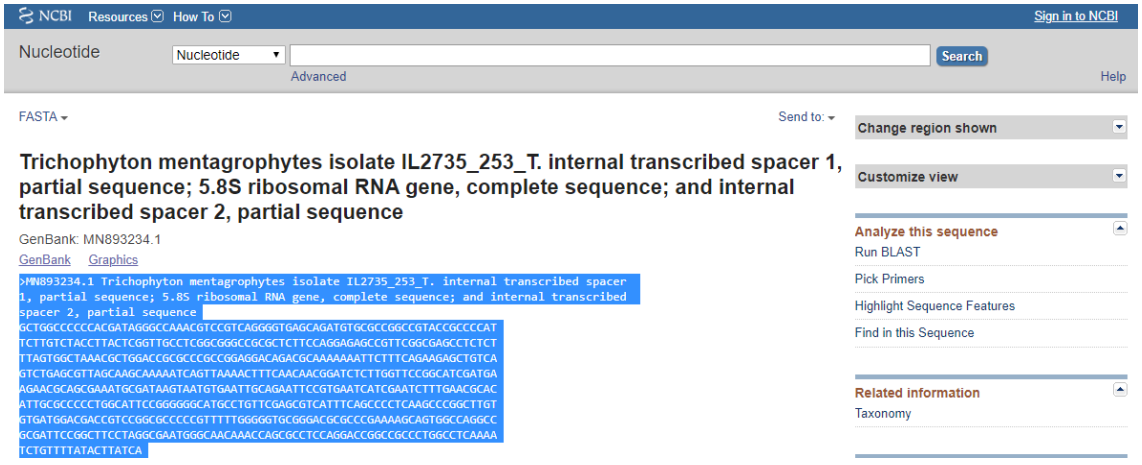
bağlanmaması ve saç tokası (hairpin) moleküler yapısal özellikleri incelenmiştir (Şekil 3.2.2.3.).

Tasarlanan primerler ve prob setinde (Çizelge 9.) prob reverse primere daha yakın olarak tasarlanmıştır (Şekil 3.2.2.4.). İlerleyen süreçte tasarlanan primer ve prob setinin fungal ve bakteriyel suşlar ile çapraz reaksiyon verip-vermediği durumunun tespit edilebilmesi için NCBI Primer Blast programı kapsamında forward primer sekmesine prob dizisi bilgileri, reverse primer sekmesine ise reverse primer bilgileri girilmiştir (Şekil 3.2.2.5.). "Get Primers" butonu ile prob ve reverse primer dizilerinin hangi türleri çoğalttığının belirlenmesi amacı ile NCBI veri tabanı kullanılarak test etme çalışmaları yapılmıştır (Şekil 3.2.2.6.).

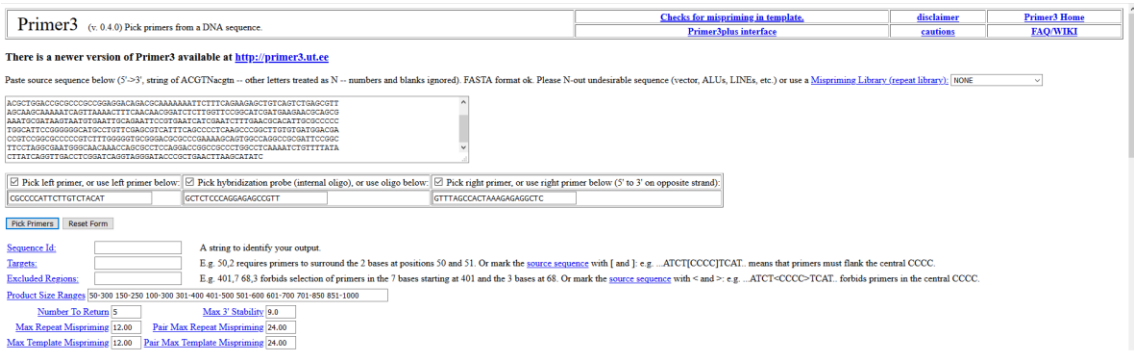
Tasarlama işlemlerine NCBI veri tabanında sadece *Trichophyton interdigitale* ile *Trichophyton mentagrophytes* dermatofitleri çoğaltılana kadar manuel olarak deneme-yanılma metodu ile devam edilmiştir. Tasarlanan primerlerin NCBI veri tabanı referans alınarak özgünlüğünden emin olunduktan sonra spesifite testlerinin devamı için prob ve primerlerin bağlandığı genetik bölge NCBI Nucleotide Blast programında (https://blast.ncbi.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch) yeniden test edilmiştir (Şekil 3.2.2.7.). Tasarımlar tamamladığında prob dizisi reverse primer bölgesine daha yakın olduğundan Primer 3 programında tasarlanan prob dizisinin ters komplementer bölgesi proje kapsamında alınmış ve ilerleyen deneysel aşamalara geçilmiştir.



Şekil 3.2.2.1. Makaleden (Miyajima vd., 2013) alınan probun bağlandığı DNA sekansının NCBI veri tabanından bulunması.



Şekil 3.2.2.2. Makale kapsamında (Miyajima vd., 2013) probun bağlandığı bölgenin genetik DNA dizisinin NCBI veri tabanından alınması.



Şekil 3.2.2.3. Primer 3 programı ile yapılan manuel tasarım.

Primer3 Output

```
No mispriming library specified
No hyb oligo mishyb library specified
Using 1-based sequence positions
WARNING: Right primer is unacceptable: High end self complementarity/High 3' stability; Hybridization probe is unacceptable: Tm too high

OLIGO            start  len      tm     gc%   any   3' seq
LEFT PRIMER         52   20   59.96   50.00  4.00  2.00 CGCCCCATTCTTGTCTACAT
RIGHT PRIMER       142   23   57.96   47.83  7.00  5.00 GTTTAGCCACTAAAGAGAGGCTC
HYB OLIGO           96   20   65.40   65.00 12.00  2.00 GCTCTCCCAGGAGAGCCGTT
SEQUENCE SIZE: 614
INCLUDED REGION SIZE: 614

PRODUCT SIZE: 91, PAIR ANY COMPL: 4.00, PAIR 3' COMPL: 2.00

    1 ACGATAGGGCCAAACGTCCGTCAGGGGTGAGCAGATGTGCGCCGGCCGTACCGCCCCATT
                                                      >>>>>>>>>

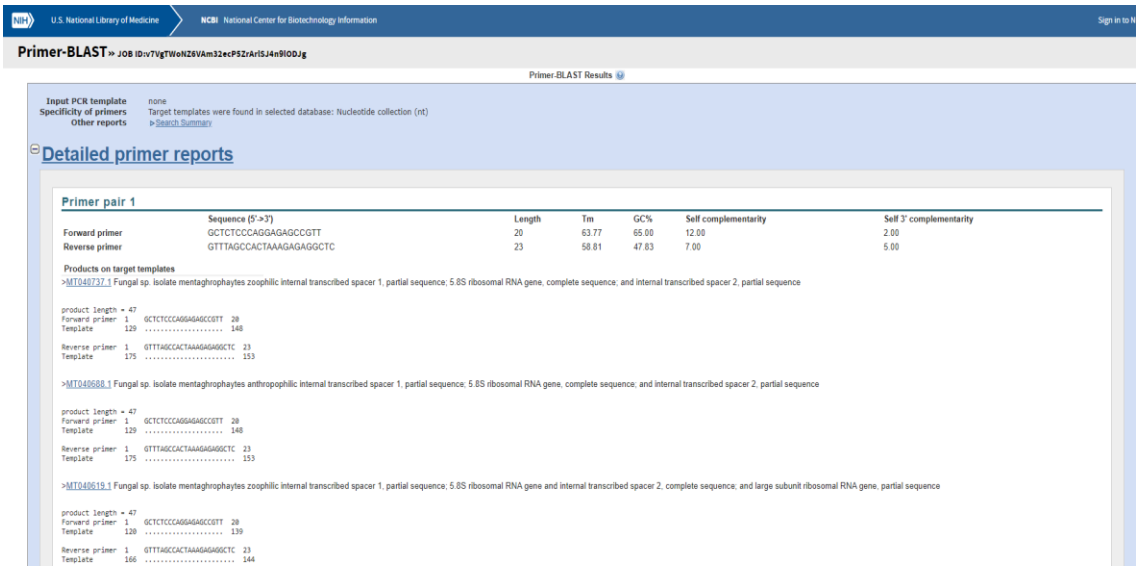
   61 CTTGTCTACATTACTCGGTTGCCTCGGCGGGCCGCGCTCTCCCAGGAGAGCCGTTCGGCG
      >>>>>>>>>>>                        ^^^^^^^^^^^^^^^^^^^^^    <

  121 AGCCTCTCTTTAGTGGCTAAACGCTGGACCGCGCCCGCCGGAGGACAGACGCAAAAAAAT
      <<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<

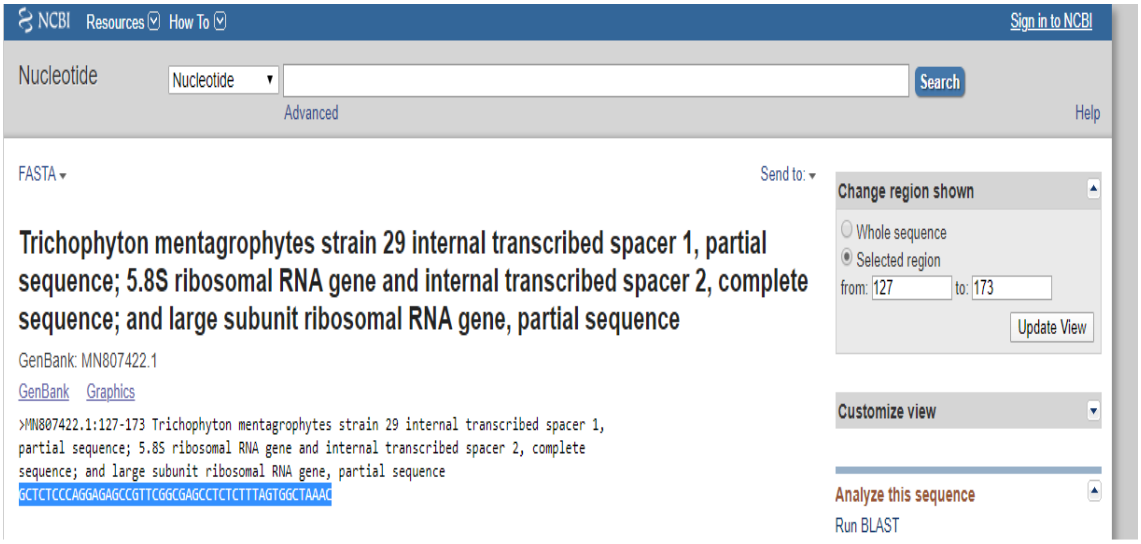
  181 TCTTTCAGAAGAGCTGTCAGTCTGAGCGTTAGCAAGCAAAAATCAGTTAAAACTTTCAAC


  241 AACGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGA
```

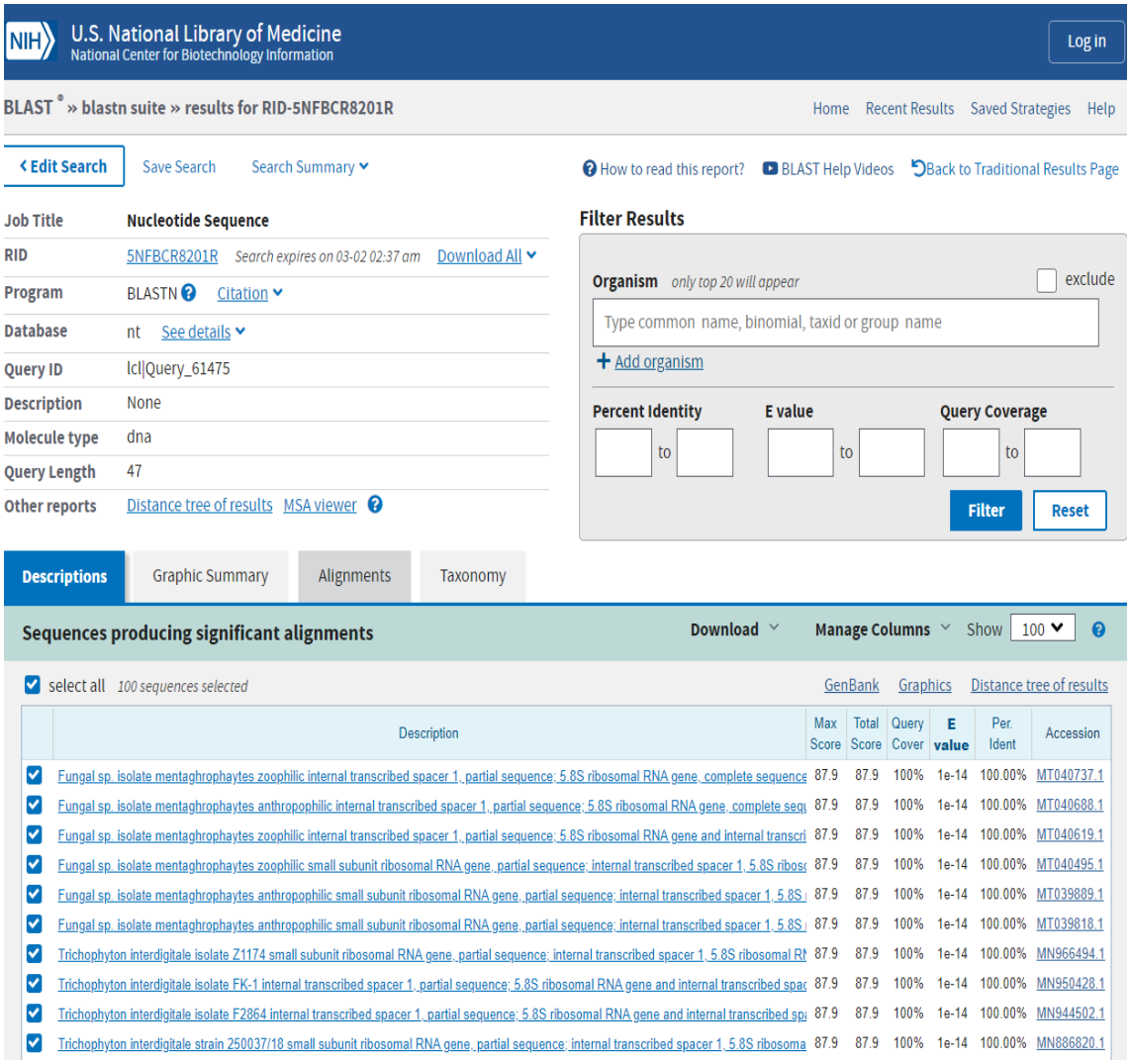
Şekil 3.2.2.4. Primer 3 programı ile yapılan manuel tasarım sonucu.



Şekil 3.2.2.5. Manuel olarak tasarlanan primer dizilerinin NCBI veri tabanında hangi türlere bağlandığının gösterilmesi.



Şekil 3.2.2.6. Manuel olarak tasarlanan prob ile reverse primerin bağlandığı bölgenin gösterilmesi.



Şekil 3.2.2.7. Manuel olarak tasarlanan prob ile reverse primer dizisinin genetik anlamda bağlandığı bölgenin NCBI veri tabanı kapsamında hangi türlere ait olduğunun gösterilmesi.

Çizelge 9. *Trichophyton interdigitale* ile *Trichophyton mentagrophytes* için tasarlanan primer ve prob setleri

Forward Primer	CGCCCCATTCTTGTCTACAT
Reverse Primer	GTTTAGCCACTAAAGAGAGGCTC
Prob	AACGGCTCTCCTGGGAGAGC

3. 2. 3. *Trichophyton rubrum* Türüne Yönelik Spesifik Oligo Tasarımı

Google Scholar platformu üzerinde *Trichophyton rubrum* dermatofit küf patojenine yönelik yapılan PCR çalışmaları araştırılmıştır. Araştırmalar neticesinde Polonya'da yapılmış bir bilimsel çalışma (Kobylak, Bykowska, Nowicki & Brillowska-Dabrowska, 2015) referans olarak alınmıştır (Şekil 3.2.3.1.).

Veri tabanından indirilen FASTA dosyaları, canlı türleri arasındaki DNA dizilerinin benzerlik ve farklılıklarını belirlemek amacı ile Clustal Omega (https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/) programına dosyalar yüklenmiştir. Elde edilen veriler kapsamında farklılık gösteren bölge prob dizisi olarak referans alınmış ve buna uygun olarak forward ile reverse primer tasarımları gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.2.3.2.).

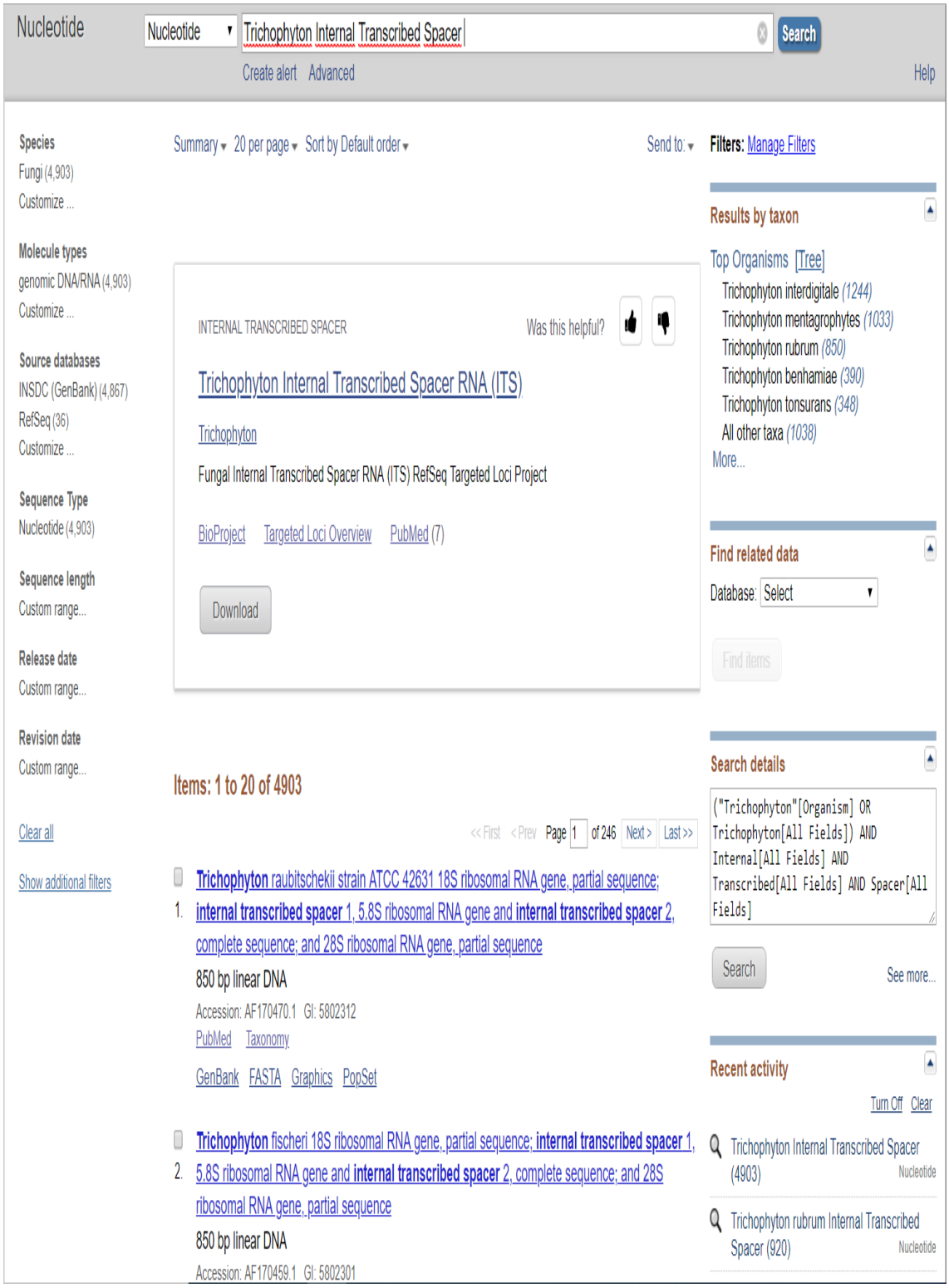
Bu bilimsel çalışma kapsamında *Trichophyton rubrum* türüne ait internal-transcribed spacer 2 (ITS-2) genetik bölgesine yönelik primer setleri tasarımı gerçekleştirilmiştir. İlgili bilimsel makale kapsamında kullanılan primerlerin genetik bölge NCBI nükleotid veri tabanından (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/) FASTA dosya formatında indirilmiştir (Şekil 3.2.3.3.).

Trichophyton rubrum dermatofit patojeninin internal-transcribed spacer 2 (ITS-2) gen bölgesine ait olan DNA dizisi, forward ve reverse primer tasarımları için NCBI nüleotid veri tabanından indirilip Primer 3 programına (http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/) aktarımı gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.2.3.4.).

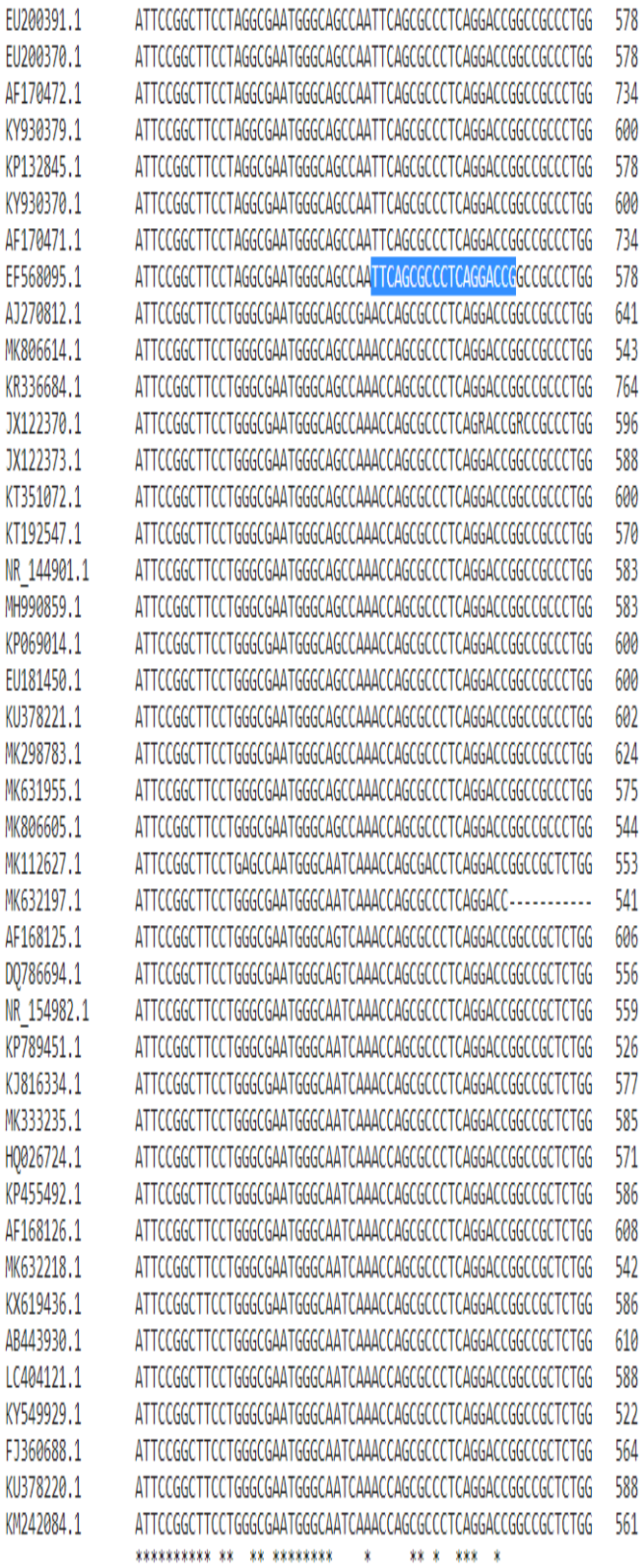
Clustal Omega programından elde edilmiş, farklılık gösteren nükleotid dizisi "Pick Hybridization Probe (Internal Oligo), or Use Oligo Below" sekmesine prob bilgisi olarak girilmiştir. Primerlere ait sıcaklık, 3' ucun kendi üzerine katlanıp bağlanıp bağlanmaması ve saç tokası (hairpin) moleküler yapısal özellikleri incelenmiştir. "Pick Primers" butonuna basılarak primer tasarımları gerçekleştirilmiştir Bu bilimsel çalışma kapsamında *Trichophyton rubrum* türüne ait internal-transcribed spacer 2 (ITS-2) genetik bölgesine yönelik primer ve prob setleri tasarımı gerçekleştirilmiştir (Çizelge 10.). İlgili bilimsel makale kapsamında kullanılan primerlerin genetik bölge NCBI nükleotid veri tabanından (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/) FASTA dosya formatında indirilmiştir (Şekil 3.2.3.4.).

Primer 3 programından elde edilen sonuçlardan primerlerin ve probların arasında bulunan DNA nükleotid sayısal uzaklığı belirlenmiştir. Bundan dolayı tasarlanan probun hangi primer bölgeye yakın olduğu araştırılmış ve sonuç olarak probun forward primere daha yakın olduğu belirlenmiştir (Şekil 3.2.3.5.). Probun, forward primer dizisine daha yakın olması nedeni ile forward primer bilgisi yine forward primer olarak, prob bilgisi ise reverse primer bilgisi olarak NCBI Primer Blast

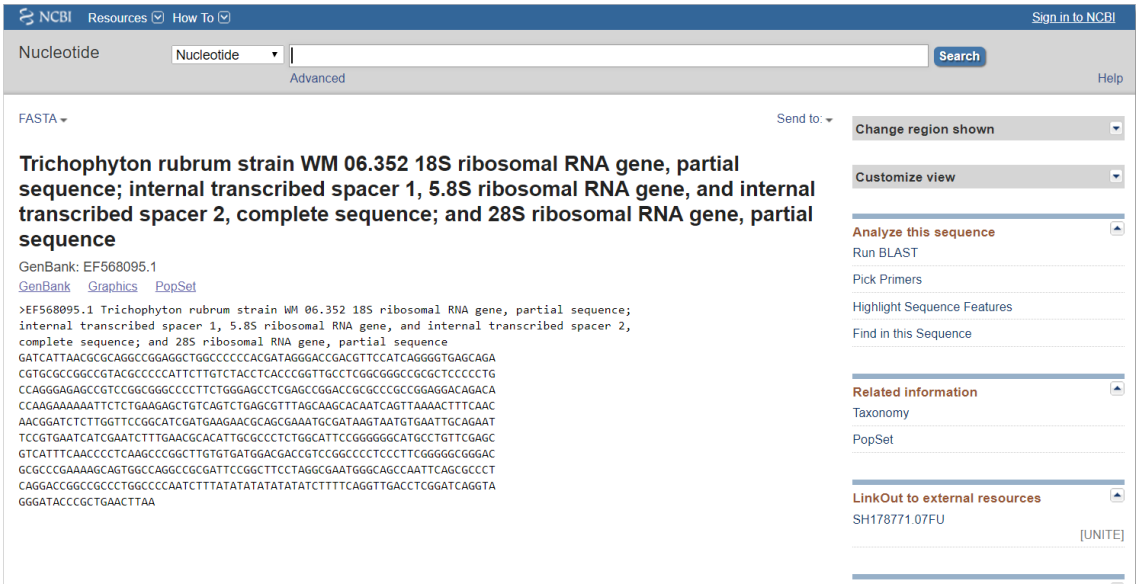
(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/) programına spesifite testi için aktarılmış ve çıkan sonuçlara göre NCBI veri tabanını referans alarak tasarlanan primerlerin *Trichophyton rubrum* dermatofit patojenine özgün olduğu *in silico* kapsamda kanıtlanmıştır (Şekil 3.2.3.6.). Bununla birlikte forward primer ile prob oligonükleotid dizilerinin bağlandığı genetik bölge (Şekil 3.2.3.7.), NCBI Nucleotide Blast (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch) aktarılmış ve ilgili bölgenin yalnızca *Trichophyton rubrum* türüne ait olduğu test edilip-belirlenmiştir (Şekil 3.2.3.8.).



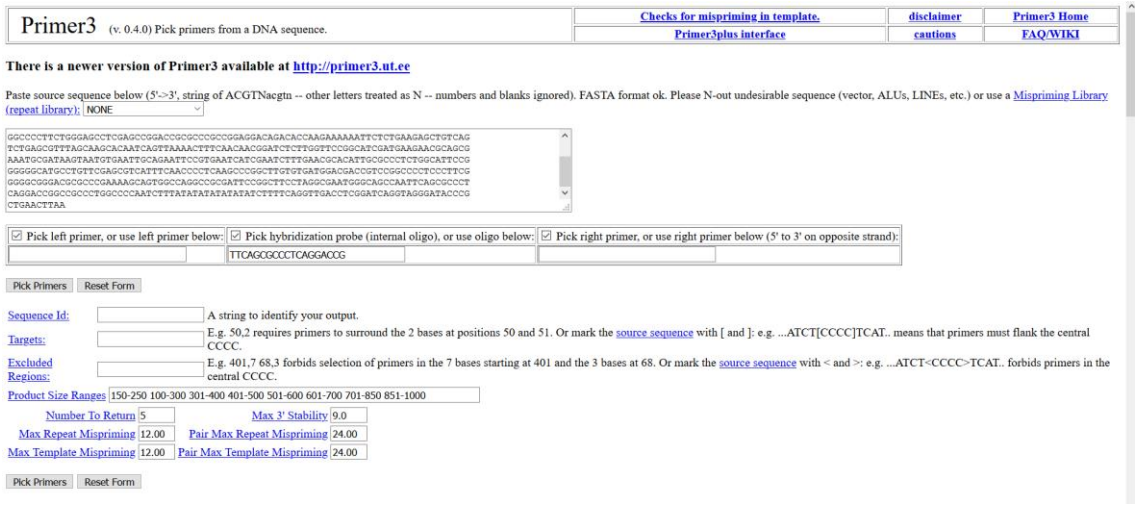
Şekil 3.2.3.1. *Trichophyton rubrum* dermatofit patojenine ait ITS gen bölgesinin NCBI veri tabanından aranması.



Şekil 3.2.3.2. NCBI veri tabanından indirilen ITS gen dizilerinden *Trichophyton rubrum*'a ait farklılık gösteren bölgenin seçilmesi.



Şekil 3.2.3.3. *Trichophyton rubrum*'a ait ITS gen bölgesi kapsamındaki DNA dizisinin NCBI veri tabanından indirilmesi.



Şekil 3.2.3.4. NCBI veri tabanından Primer 3 programına *Trichophyton rubrum*'a ait ITS dizisinin aktarılması ve farklılık gösteren bölgenin prob olarak girilmesi.

```
OLIGO          start  len      tm      gc%   any   3' seq
LEFT PRIMER      527   18   62.64   55.56  6.00  2.00 TTCCTAGGCGAATGGGCA
RIGHT PRIMER     632   20   60.07   55.00  4.00  2.00 CCTACCTGATCCGAGGTCAA
HYB OLIGO        550   19   69.30   68.42  5.00  3.00 TTCAGCGCCCTCAGGACCG
SEQUENCE SIZE: 650
INCLUDED REGION SIZE: 650

PRODUCT SIZE: 106, PAIR ANY COMPL: 4.00, PAIR 3' COMPL: 0.00

   1 GATCATTAACGCGCAGGCCGGAGGCTGGCCCCCCACGATAGGGACCGACGTTCCATCAGG


  61 GGTGAGCAGACGTGCGCCGGCCGTACGCCCCCATTCTTGTCTACCTCACCCGGTTGCCTC


 121 GGCGGGCCGCGCTCCCCCTGCCAGGGAGAGCCGTCCGGCGGGCCCCTTCTGGGAGCCTCG


 181 AGCCGGACCGCGCCCGCCGGAGGACAGACACCAAGAAAAAATTCTCTGAAGAGCTGTCAG


 241 TCTGAGCGTTTAGCAAGCACAATCAGTTAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCGG


 301 CATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCCGTGAATC


 361 ATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTCTGGCATTCCGGGGGGCATGCCTGTTCGAGC


 421 GTCATTTCAACCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGATGGACGACCGTCCGGCCCCTCCCTTCG


 481 GGGGCGGGACGCGCCCGAAAAGCAGTGGCCAGGCCGCGATTCCGGCTTCCTAGGCGAATG
                                              >>>>>>>>>>>>>>


 541 GGCAGCCAATTCAGCGCCCTCAGGACCGGCCGCCCTGGCCCCAATCTTTATATATATATA
     >>>>     ^^^^^^^^^^^^^^^^^^


 601 TATCTTTTCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAA
               <<<<<<<<<<<<<<<<<<<
```

Şekil 3.2.3.5. Primer 3 programında *Trichophyton rubrum* için tasarlanan primerler ve prob sonuçları.



Detailed primer reports

rubrum 1/657

Primer pair 1

	Sequence (5'->3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	TTCCTAGGCGAATGGGCA	18	58.27	55.56	6.00	2.00
Reverse primer	CGGTCCTGAGGGCGCTGAA	19	64.53	68.42	5.00	2.00

Products on target templates

>MN966527.1 Trichophyton rubrum isolate Z99371 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence

product length = 42
Forward primer 1 TTCCTAGGCGAATGGGCA 18
Template 549 566

Reverse primer 1 CGGTCCTGAGGGCGCTGAA 19
Template 590 572

>MN893238.1 Trichophyton rubrum isolate IL2800_259_T small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence

product length = 42
Forward primer 1 TTCCTAGGCGAATGGGCA 18
Template 563 580

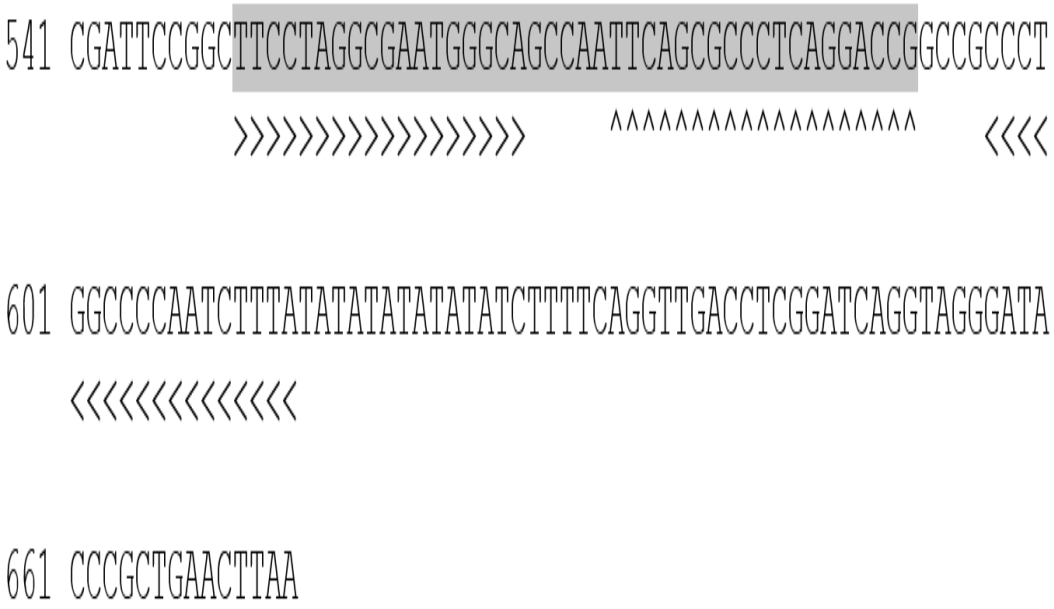
Reverse primer 1 CGGTCCTGAGGGCGCTGAA 19
Template 604 586

>MN885450.1 Trichophyton sp. isolate IL2796_206_T rubrum internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence

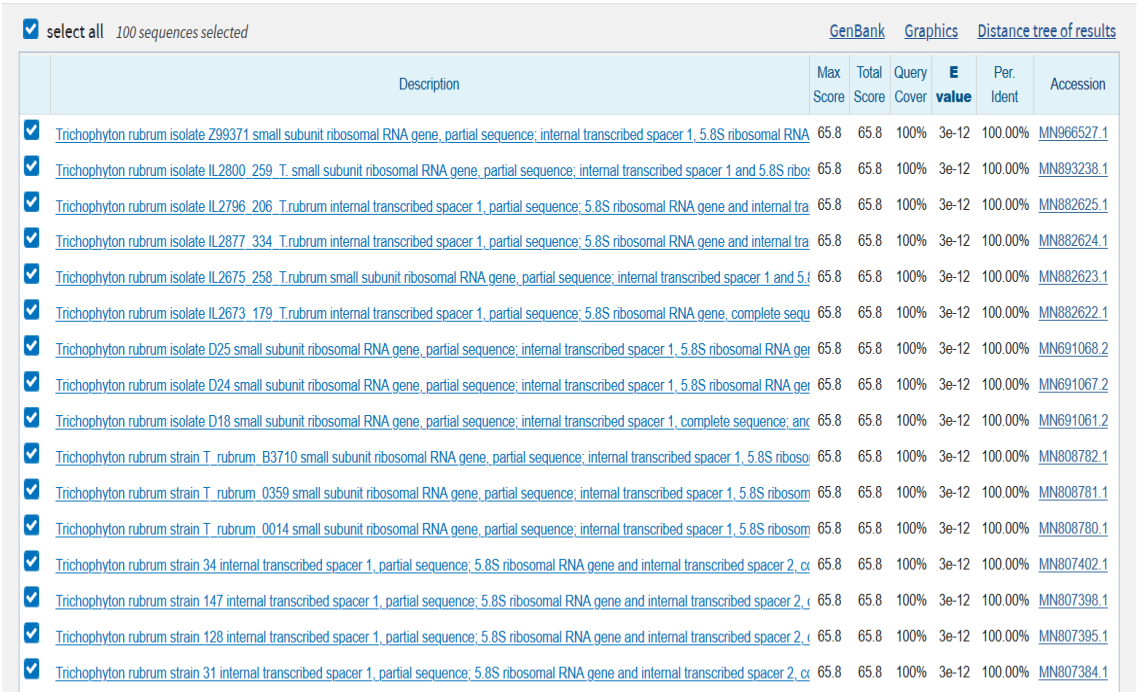
product length = 42
Forward primer 1 TTCCTAGGCGAATGGGCA 18
Template 552 569

Reverse primer 1 CGGTCCTGAGGGCGCTGAA 19
Template 593 575

Şekil 3.2.3.6. Prob dizisinin reverse primer olarak düşünülüp Primer 3 programında tasarlanan primer-prob setinin NCBI Primer Blast programı ile spesifitesinin test edilmesi.



Şekil 3.2.3.7. Forward primer ile probun bağlandığı genetik bölgenin spesifite testi için seçilmesi.



Şekil 3.2.3.8. Manuel olarak tasarlanan prob ile reverse primer dizisinin genetik anlamda bağlandığı bölgenin NCBI veri tabanı kapsamında *Trichophyton rubrum*'a ait olduğunun gösterilmesi.

Çizelge 10. *Trichophyton rubrum* için tasarlanan primer ve prob setleri

Forward Primer	TTCCTAGGCGAATGGGCA
Reverse Primer	TAAAGATTGGGGCCAGGG
Prob	TTCAGCGCCCTCAGGACCG

3. 2. 4. *Trichophyton tonsurans* Türüne Yönelik Spesifik Oligo Tasarımı

Google Scholar platformu üzerinde *Trichophyton tonsurans* dermatofit küf patojenine yönelik yapılan PCR çalışmaları araştırılmıştır. Araştırmalar neticesinde Japonya'da yapılmış bir bilimsel çalışma (Yoshida vd., 2006) referans olarak alınmıştır (Şekil 3.2.4.1.).

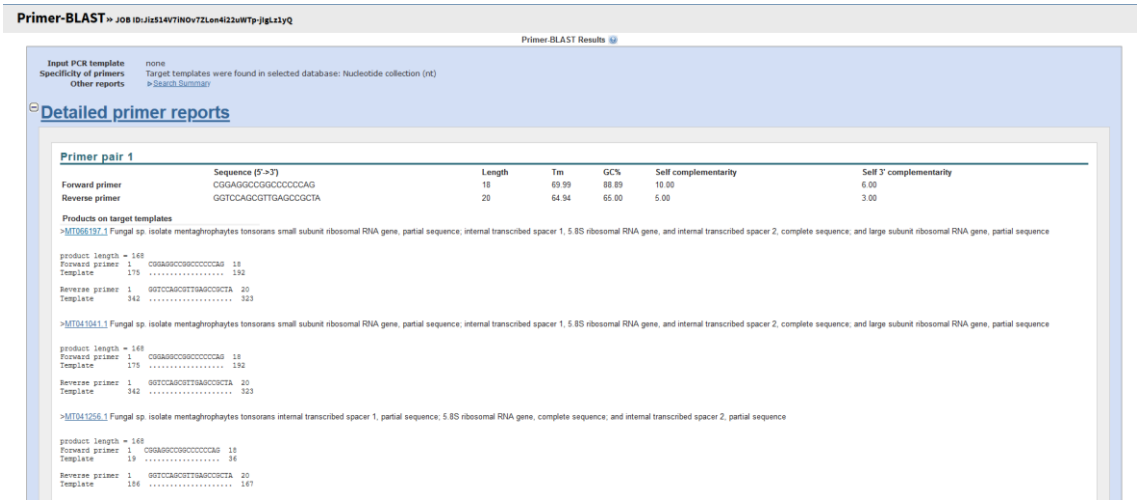
Bu çalışma kapsamında *Trichophyton tonsurans* türüne ait internal transcribed spacer 1 (ITS-1) genetik bölgesine yönelik spesifik primer tasarımı yapılmıştır. İlgili çalışmada kullanılan primerlerin çoğalttığı genetik bölge NCBI nükleotid veri tabanından (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/) FASTA dosyaları formatında indirilmiştir (Şekil 3.2.4.2.).

Primer 3 programına (http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/) indirilen FASTA dosyaları aktarılmıştır. Primer 3 programında DNA dizilerine yönelik manuel tasarımlar yapılmıştır. Forward primer sekmesine DNA dizisinden seçilen bir bölge girişi yapılmıştır. DNA dizisinden seçilen bölge, Reverse Complement programı (https://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html) vasıtasıyla reverse complementi alındıktan sonra reverse primer veriler girilmiştir. Prob dizisi için yine DNA dizisi üzerinde bir bölge seçilmiş ve Primer 3 programında prob sekmesine verileri girilmiştir. "Pick Primers" butonu ile girilen primerlerin sıcaklık, 3' ucun kendi üzerine katlanıp bağlanıp bağlanmaması ve saç tokası (hairpin) moleküler yapısal özellikleri incelenmiştir (Şekil 3.2.4.3.).

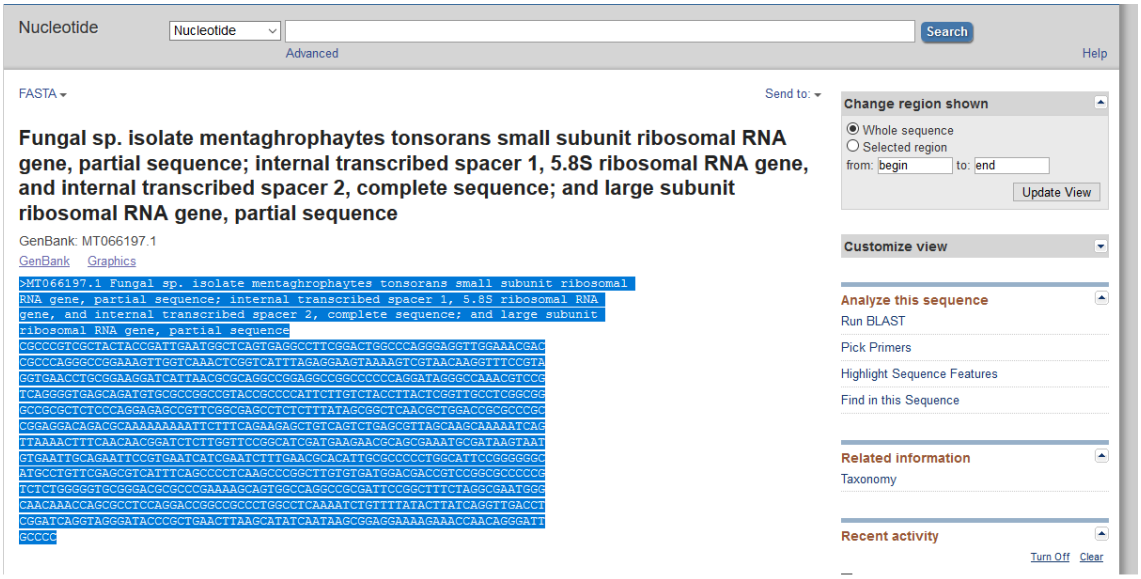
Tasarlanan primer ve prob setinde (Çizelge 11.), prob reverse primer oligonükleotid dizisine yakın olarak tasarlanmıştır (Şekil 3.2.4.3.). İlerleyen süreçte tasarlanan primer ve prob setinin bakteriyel ve fungal türler ile çapraz reaksiyon verip-vermediğinin testini gerçekleştirebilmek için NCBI Primer Blast programı kullanılmıştır. Bu programda forward primer sekmesine prob verileri, reverse primer sekmesine ise reverse primer verileri girilmiştir (Şekil 3.2.4.4.).

"Get Primers" butonu ile primerlerin hangi türleri çoğalttığı NCBI veri tabanından test edilmiştir (Şekil 3.2.4.5.). Tasarım işlemlerine yalnızca *Trichophyton tonsurans* dermatofit küf patojenini çoğaltana kadar manuel olarak deneme-yanılma metodu ile NCBI veri tabanından devam edilmiştir. Tasarlanan primerlerin NCBI veri tabanı kapsamında özgünlüğünden emin olunduktan ek bir spesifite testi için prob ile

reverse primer oligonükleotid dizilerinin bağlandığı genetik bölge NCBI Nucleotide Blast (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch) programına yüklenmiştir (Şekil 3.2.4.6.). Tasarım özgünlüklerinin özgünlüğünü *in silico* kapsamda kanıtladıktan sonra tasarlanan primer ve prob setinde prob, reverse primere daha yakın olduğundan probun bağlandığı genetik bölgenin ters complementi proje kapsamında temin edilmiştir.



Şekil 3.2.4.1. Makaleden (Yoshida vd., 2006) alınan primer setinin NCBI veri tabanı kapsamında çoğalttığı *Trichophyton tonsurans* dermatofit patojenik türlerinin gösterilmesi.



Şekil 3.2.4.2. Makaleden (Yoshida vd., 2006) alınan primer setinin NCBI veri tabanı kapsamında çoğalttığı DNA dizi bölgesinin gösterilmesi.

```
No mispriming library specified
No hyb oligo mishyb library specified
Using 1-based sequence positions
WARNING: Left primer is unacceptable: High 3' stability; Hybridization probe is unacceptable: Tm too high

OLIGO           start  len      tm     gc%   any    3' seq
LEFT PRIMER       137   19   62.18   57.89  8.00  1.00 CGTAGGTGAACCTGCGGAA
RIGHT PRIMER      338   20   61.40   50.00  5.00  2.00 CAGCGTTGAGCCGCTATAAA
HYB OLIGO         261   20   69.67   65.00  4.00  3.00 TTACTCGGTTGCCTCGGCGG
SEQUENCE SIZE: 845
INCLUDED REGION SIZE: 845

PRODUCT SIZE: 202, PAIR ANY COMPL: 4.00, PAIR 3' COMPL: 0.00

   1 CGCCCGTCGCTACTACCGATTGAATGGCTCAGTGAGGCCTTCGGACTGGCCCAGGGAGGT


  61 TGGAAACGACCGCCCAGGGCCGGAAAGTTGGTCAAACTCGGTCATTTAGAGGAAGTAAAA


 121 GTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAACGCGCAGGCCGGAGG
                 >>>>>>>>>>>>>>>>>>>


 181 CCGGCCCCCCAGGATAGGGCCAAACGTCCGTCAGGGGTGAGCAGATGTGCGCCGGCCGTA


 241 CCGCCCCATTCTTGTCTACCTTACTCGGTTGCCTCGGCGGGCCGCGCTCTCCCAGGAGAG
                     ^^^^^^^^^^^^^^^^^^^


 301 CCGTTCGGCGAGCCTCTCTTTATAGCGGCTCAACGCTGGACCGCGCCCGCCGGAGGACAG
                   <<<<<<<<<<<<<<<<<<<


 361 ACGCAAAAAAAAATTCTTTCAGAAGAGCTGTCAGTCTGAGCGTTAGCAAGCAAAAATCAG


 421 TTAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGC


 481 GATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGC


 541 CCCCTGGCATTCCGGGGGGCATGCCTGTTCGAGCGTCATTTCAGCCCCTCAAGCCCGGCT


 601 TGTGTGATGGACGACCGTCCGGCGCCCCCGTCTCTGGGGGTGCGGGACGCGCCCGAAAAG

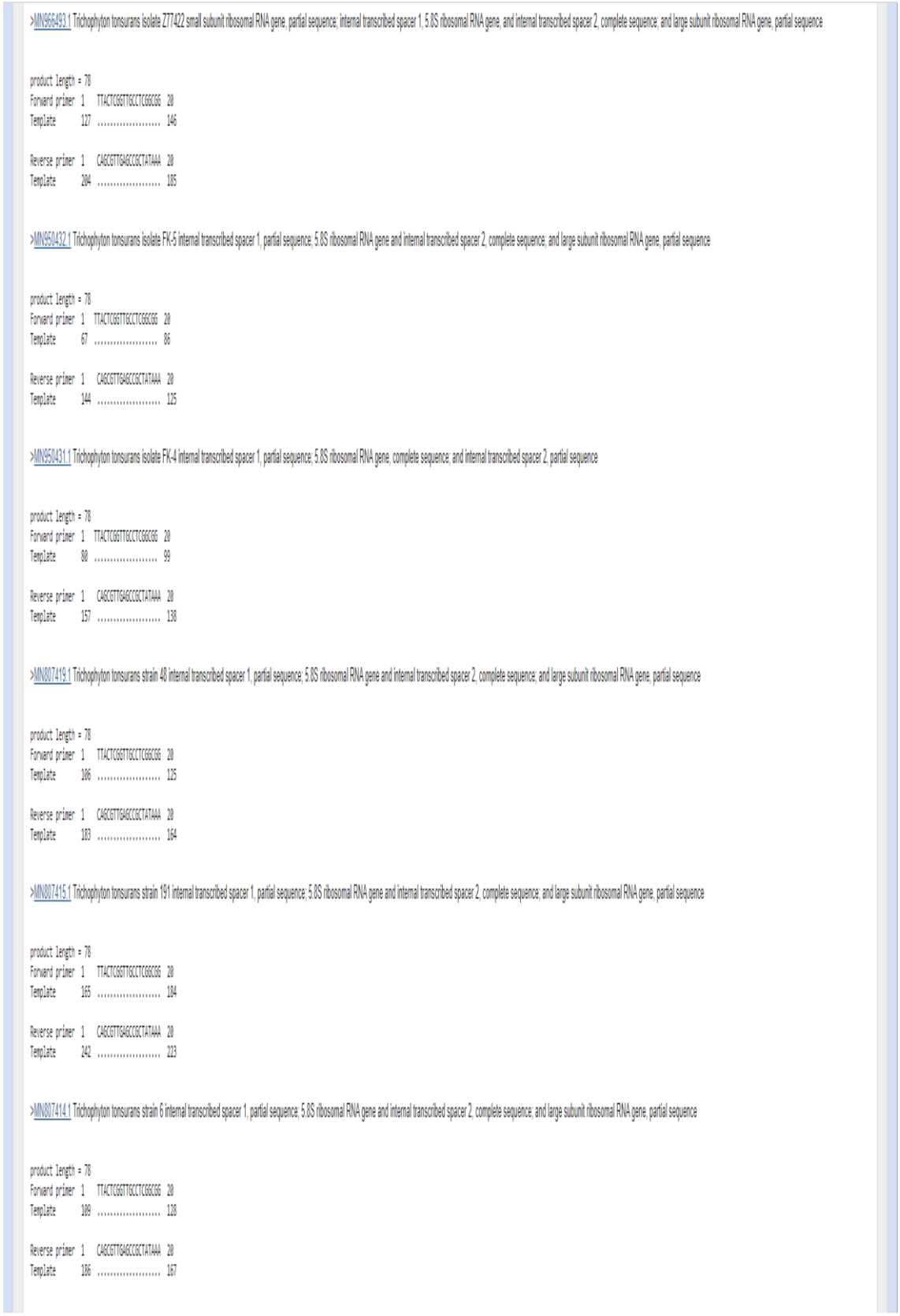

 661 CAGTGGCCAGGCCGCGATTCCGGCTTTCTAGGCGAATGGGCAACAAACCAGCGCCTCCAG


 721 GACCGGCCGCCCTGGCCTCAAAATCTGTTTTATACTTATCAGGTTGACCTCGGATCAGGT


 781 AGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATT


 841 GCCCC
```

Şekil 3.2.4.3. Primer 3 programı kullanılarak yapılan manuel tasarım sonucunun gösterilmesi.



Şekil 3.2.4.4. Manuel olarak tasarlanan primer-prob setinin NCBI veri tabanı kapsamında NCBI Primer Blast programı aracılığı ile spesifitesinin test edilmesinin gösterilmesi.



Şekil 3.2.4.5. Manuel olarak tasarlanan primer-prob setinin çoğalttığı genetik bölgenin NCBI veri tabanından alınması.



Şekil 3.2.4.6. Manuel olarak tasarlanan primer-prob dizisinin genetik anlamda bağlandığı bölgenin NCBI veri tabanı kapsamında *Trichophyton tonsurans*'a ait olduğunun gösterilmesi.

Çizelge 11. *Trichophyton tonsurans* için tasarlanan primer ve prob setleri

Forward Primer	CGTAGGTGAACCTGCGGAA
Reverse Primer	CAGCGTTGAGCCGCTATAAA
Prob	CCGCCGAGGCAACCGAGTAA

3. 2. 5. *Trichophyton verrucosum* Türüne Yönelik Spesifik Oligo Tasarımı

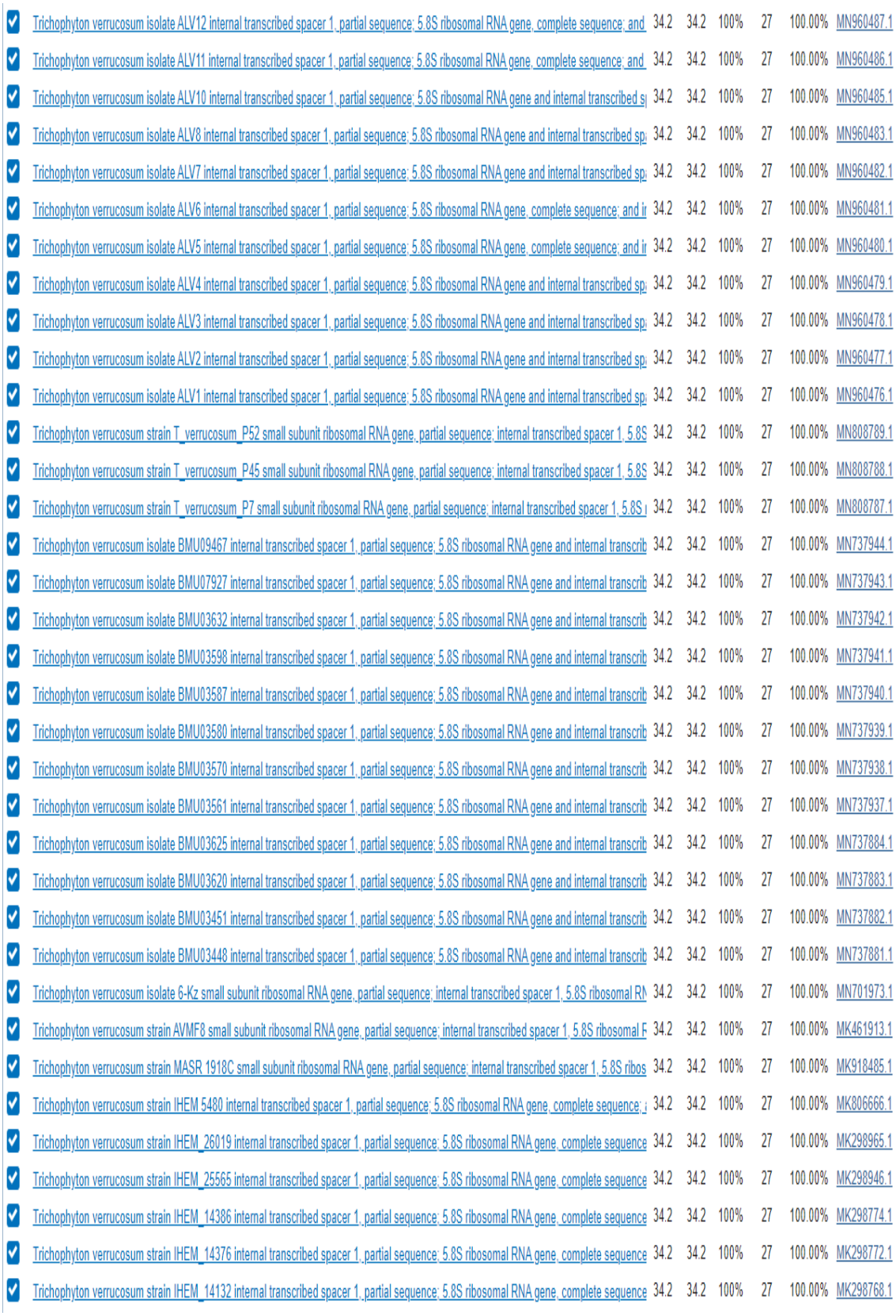
Google Scholar platformu üzerinde *Trichophyton verrucosum* dermatofit küf patojenine yönelik yapılan PCR çalışmaları araştırılmıştır. Araştırmalar neticesinde Hollanda'da yapılmış bir bilimsel çalışma (Bergmans vd., 2008) referans olarak alınmıştır (Şekil 3.2.5.1.).

Bu çalışma kapsamında *Trichophyton verrucosum* türüne ait internal transcribed spacer 1 (ITS-1) genetik bölgesine yönelik spesifik prob tasarımı yapılmıştır. İlgili çalışma kapsamında kullanılan prob oligonükleotid dizisinin bağlandığı genetik bölge NCBI nükleotid veri tabanından (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/) FASTA dosyaları formatında indirimi gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.2.5.2.). Primer 3 programına (http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/) ilgili FASTA dosyaları yüklenmiştir (Şekil 3.2.5.3.).

Primer 3 programı kullanılarak DNA dizisinden manuel olarak tasarımlar yapılmıştır. Forward primer sekmesine DNA dizisi üzerinden seçilen bir bölge girişi yapılmıştır. DNA dizisi üzerinden seçilen bir bölge, Reverse Complement programı (https://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html) yardımı ile ters komplementi alındıktan sonra reverse primer sekmesine veriler girilmiştir. Prob olarak yine DNA dizisinden bir bölge seçilmiş ve Primer 3 programında prob sekmesine veri girişi yapılmıştır. "Pick Primers" butonu ile girilen primerlerin sıcaklık, 3' ucun kendi üzerine katlanıp bağlanıp bağlanmaması ve saç tokası (hairpin) moleküler yapısal özellikleri incelenmiştir (Şekil 3.2.5.3.).

Tasarlanan primer-prob setinde (Çizelge 12.) prob oligonükleotid dizisi forward primer dizisine daha yakın olarak tasarlanmıştır (Şekil 3.2.5.4.). Daha sonraki aşamada tasarlanan primer-prob setlerinin bakteriyel ve fungal türler ile çapraz reaksiyon verip-vermediğinin testini gerçekleştirebilmek için NCBI Primer Blast programı kullanılmıştır. Bu program kapsamında forward primer sekmesine forward primer, reverse primer sekmesine ise prob oligonükleotid dizisinin ters komplementi bilgileri girilmiştir (Şekil 3.2.5.5.).

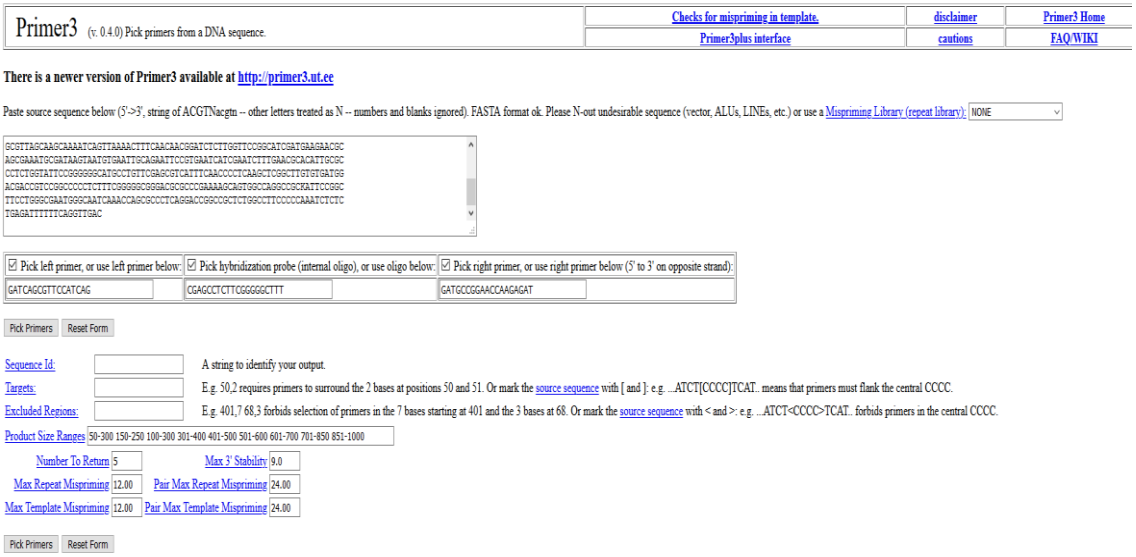
"Get Primers" butonu ile primerlerin hangi türleri çoğalttığı NCBI veri tabanından test edilmiştir (Şekil 3.2.5.6.). Tasarım işlemlerine yalnızca *Trichophyton tonsurans* dermatofit küf patojenini çoğaltana kadar manuel olarak deneme-yanılma metodu ile NCBI veri tabanından devam edilmiştir. Tasarlanan primerlerin NCBI veri tabanı kapsamında özgünlüğünden emin olunduktan ek bir spesifite testi için prob ile reverse primer oligonükleotid dizilerinin bağlandığı genetik bölge NCBI Nucleotide Blast (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch) programına yüklenmiştir (Şekil 3.2.5.7.).



Şekil 3.2.5.1. Makalede (Bergmans vd., 2008) kullanılan probun NCBI nükleotid veri tabanı kapsamında bağlandığı ITS-1 DNA dizi bölgelerinin gösterilmesi.



Şekil 3.2.5.2. *Trichophyton verrucosum* türüne ait referans alınan makalede (Bergmans vd., 2008) kullanılan probun NCBI veri tabanı kapsamında bağlandığı DNA dizisinin kopyalanmasının gösterilmesi.



Şekil 3.2.5.3. Kopyalanan DNA dizisinin Primer 3 programına aktarılması ve manuel olarak *Trichophyton verrucosum* türüne yönelik primer ve prob setinin tasarlanmasının gösterilmesi.

```
OLIGO          start  len     tm    gc%   any   3'  seq
LEFT PRIMER       21   17   52.95   52.94  4.00 1.00 GATCAGCGTTCCATCAG
RIGHT PRIMER     268   19   60.03   52.63  4.00 2.00 GATGCCGGAACCAAGAGAT
HYB OLIGO        131   20   69.01   65.00  5.00 0.00 CGAGCCTCTTCGGGGGCTTT
SEQUENCE SIZE: 580
INCLUDED REGION SIZE: 580

PRODUCT SIZE: 248, PAIR ANY COMPL: 5.00, PAIR 3' COMPL: 1.00

   1 AGGCTGGCCCCCACGATAGGGATCAGCGTTCCATCAGGGGTGTGCAGATGTGCGCCGGCC
                     >>>>>>>>>>>>>>>>>

  61 TTACRCCCCATTCTTGTCTACCTTACTCGGTTGCCTCGGCGGGCCGCGCTCTCCCCGGAG


 121 AGTCGTCCGGCGAGCCTCTTCGGGGGCTTTAGCTGGATCGCGCCCGCCGGAGGACAGACA
              ^^^^^^^^^^^^^^^^^^^

 181 TCAAAAAATCTTGAAGAGCTGTCAGTCTGAGCGTTAGCAAGCAAAATCAGTTAAAACTTT


 241 CAACAACGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAAT
            <<<<<<<<<<<<<<<<<<

 301 GTGAATTGCAGAATTCCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTCTGGTAT


 361 TCCGGGGGGGCATGCCTGTTCGAGCGTCATTTCAACCCCTCAAGCTCGGCTTGTGTGATGG


 421 ACGACCGTCCGGCCCCCTCTTTCGGGGGCGGGACGCGCCCGAAAAGCAGTGGCCAGGCCG

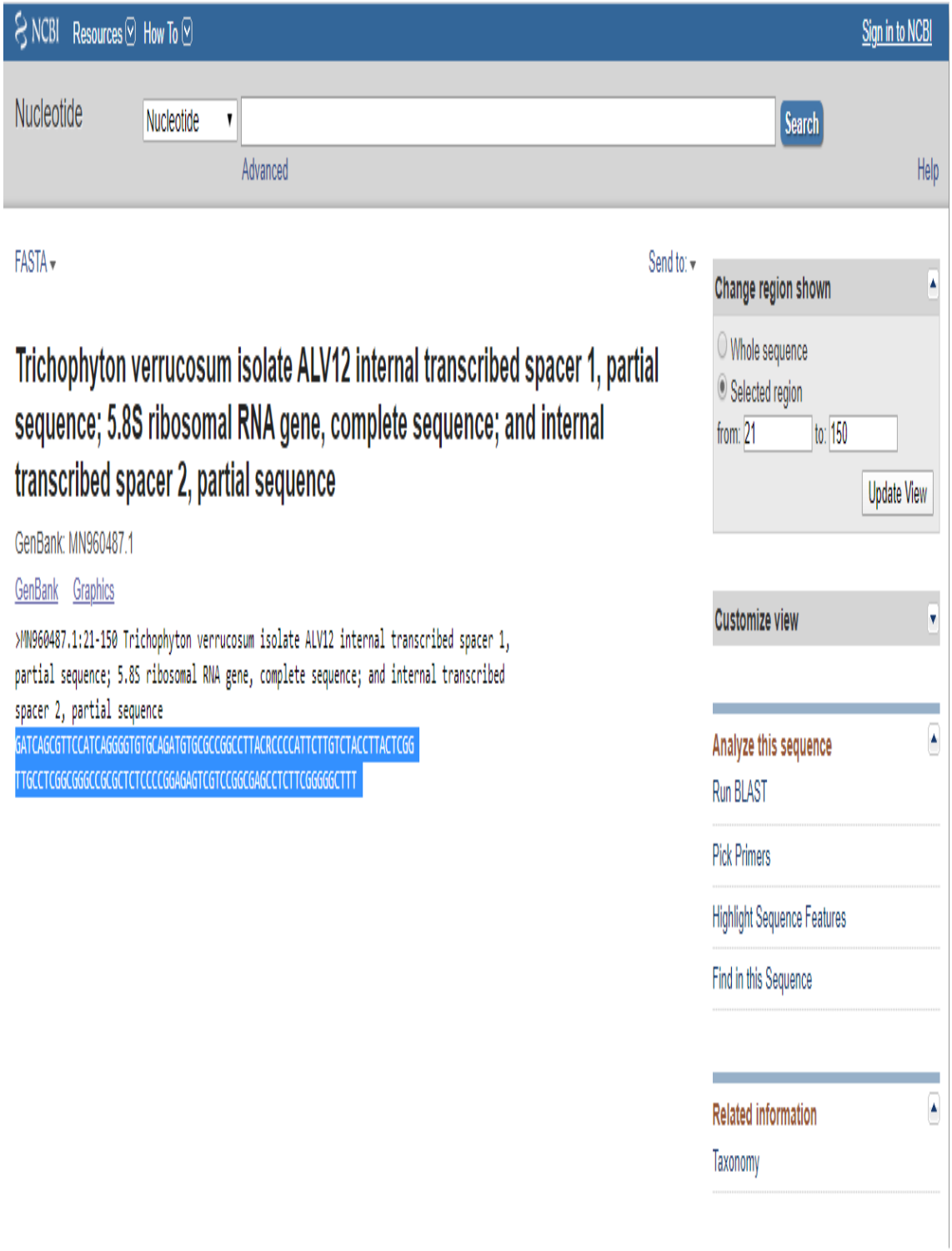

 481 CKATTCCGGCTTCCTGGGCGAATGGGCAATCAAACCAGCGCCCTCAGGACCGGCCGCTCT


 541 GGCCTTCCCCCAAATCTCTCTGAGATTTTTTCAGGTTGAC
```

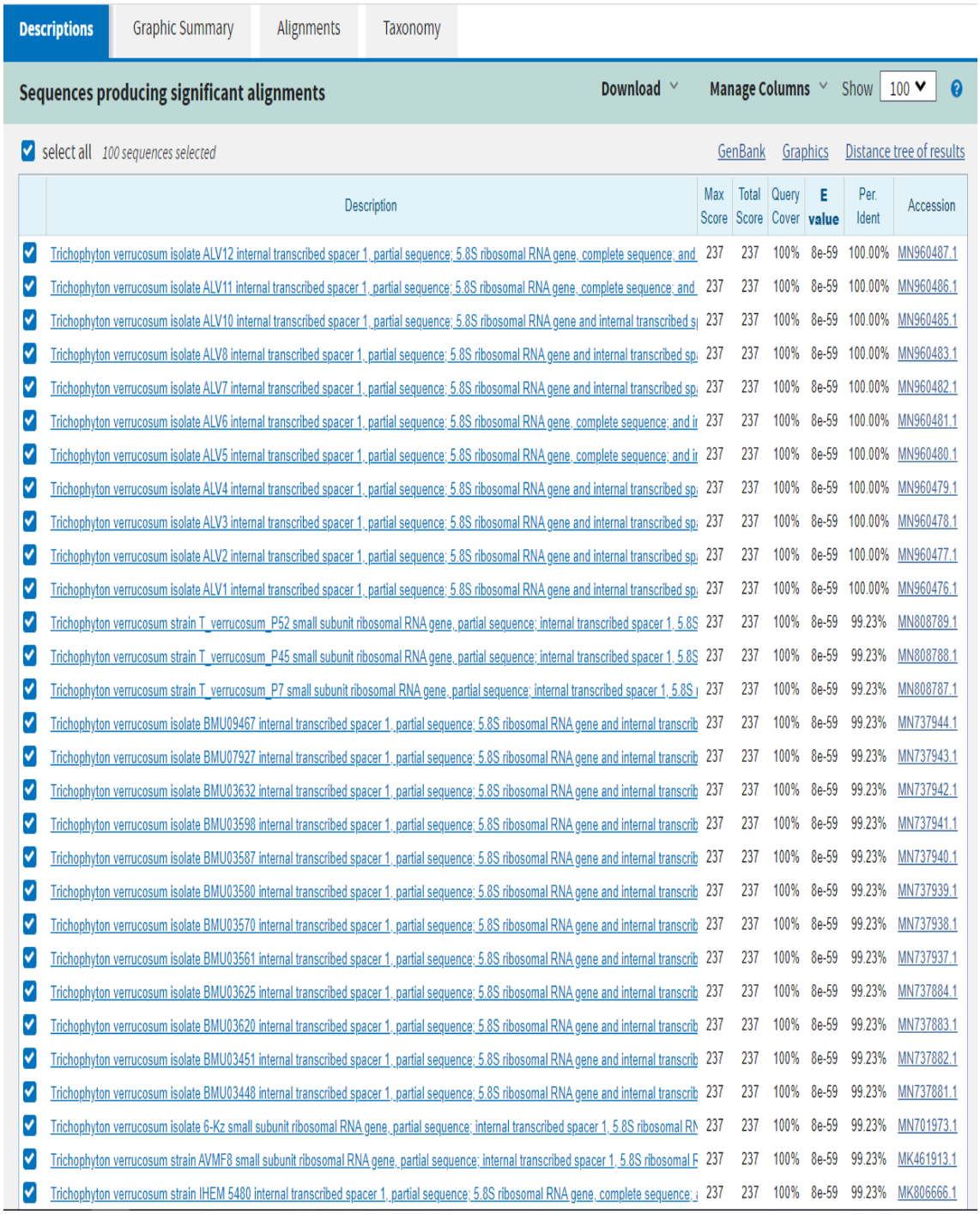
Şekil 3.2.5.4. Primer 3 programı kullanılarak manuel olarak yapılan primer ve prob setinin tasarlanması sonucunun gösterilmesi.



Şekil 3.2.5.5. Tasarlanan primer-prob setinin NCBI veri tabanında bağlanıp-çoğalttığı türlerin gösterilmesi.



Şekil 3.2.5.6. Forward primer ile prob oligonükleotid dizilerinin bağlandığı DNA bölgesinin gösterilmesi.



Descriptions | Graphic Summary | Alignments | Taxonomy

Sequences producing significant alignments — Download — Manage Columns — Show 100

select all 100 sequences selected — GenBank | Graphics | Distance tree of results

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
Trichophyton verrucosum isolate ALV12 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and	237	237	100%	8e-59	100.00%	MN960487.1
Trichophyton verrucosum isolate ALV11 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and	237	237	100%	8e-59	100.00%	MN960486.1
Trichophyton verrucosum isolate ALV10 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed s	237	237	100%	8e-59	100.00%	MN960485.1
Trichophyton verrucosum isolate ALV8 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spa	237	237	100%	8e-59	100.00%	MN960483.1
Trichophyton verrucosum isolate ALV7 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spa	237	237	100%	8e-59	100.00%	MN960482.1
Trichophyton verrucosum isolate ALV6 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and in	237	237	100%	8e-59	100.00%	MN960481.1
Trichophyton verrucosum isolate ALV5 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and in	237	237	100%	8e-59	100.00%	MN960480.1
Trichophyton verrucosum isolate ALV4 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spa	237	237	100%	8e-59	100.00%	MN960479.1
Trichophyton verrucosum isolate ALV3 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spa	237	237	100%	8e-59	100.00%	MN960478.1
Trichophyton verrucosum isolate ALV2 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spa	237	237	100%	8e-59	100.00%	MN960477.1
Trichophyton verrucosum isolate ALV1 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spa	237	237	100%	8e-59	100.00%	MN960476.1
Trichophyton verrucosum strain T_verrucosum_P52 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S	237	237	100%	8e-59	99.23%	MN808789.1
Trichophyton verrucosum strain T_verrucosum_P45 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S	237	237	100%	8e-59	99.23%	MN808788.1
Trichophyton verrucosum strain T_verrucosum_P7 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S r	237	237	100%	8e-59	99.23%	MN808787.1
Trichophyton verrucosum isolate BMU09467 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcrib	237	237	100%	8e-59	99.23%	MN737944.1
Trichophyton verrucosum isolate BMU07927 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcrib	237	237	100%	8e-59	99.23%	MN737943.1
Trichophyton verrucosum isolate BMU03632 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcrib	237	237	100%	8e-59	99.23%	MN737942.1
Trichophyton verrucosum isolate BMU03598 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcrib	237	237	100%	8e-59	99.23%	MN737941.1
Trichophyton verrucosum isolate BMU03587 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcrib	237	237	100%	8e-59	99.23%	MN737940.1
Trichophyton verrucosum isolate BMU03580 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcrib	237	237	100%	8e-59	99.23%	MN737939.1
Trichophyton verrucosum isolate BMU03570 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcrib	237	237	100%	8e-59	99.23%	MN737938.1
Trichophyton verrucosum isolate BMU03561 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcrib	237	237	100%	8e-59	99.23%	MN737937.1
Trichophyton verrucosum isolate BMU03625 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcrib	237	237	100%	8e-59	99.23%	MN737884.1
Trichophyton verrucosum isolate BMU03620 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcrib	237	237	100%	8e-59	99.23%	MN737883.1
Trichophyton verrucosum isolate BMU03451 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcrib	237	237	100%	8e-59	99.23%	MN737882.1
Trichophyton verrucosum isolate BMU03448 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcrib	237	237	100%	8e-59	99.23%	MN737881.1
Trichophyton verrucosum isolate 6-Kz small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RN	237	237	100%	8e-59	99.23%	MN701973.1
Trichophyton verrucosum strain AVMF8 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal R	237	237	100%	8e-59	99.23%	MK461913.1
Trichophyton verrucosum strain IHEM 5480 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; a	237	237	100%	8e-59	99.23%	MK806666.1

Şekil 3.2.5.7. Forward primer ile prob oligonükleotid dizilerinin bağlandığı DNA bölgesinin NCBI nükleotid veri tabanındaki blast çalışmalarının sonucunun gösterilmesi.

Çizelge 12. *Trichophyton verrucosum* için tasarlanan primer ve prob setleri

Forward Primer	GATCAGCGTTCCATCAG
Reverse Primer	GATGCCGGAACCAAGAGAT
Prob	CGAGCCTCTTCGGGGGCTTT

3. 2. 6. *Trichophyton violaceum* Türüne Yönelik Spesifik Oligo Tasarımı

Google Scholar platformu üzerinde *Trichophyton violaceum* dermatofit küf patojenine yönelik yapılan PCR çalışmaları araştırılmıştır. Araştırmalar neticesinde Hollanda'da yapılmış bir bilimsel çalışma (Wisselink, Van Zanten & Kooistra-Smid, 2011) referans olarak alınmıştır (Şekil 3.2.6.1.).

Bu çalışma kapsamında *Trichophyton violaceum* türüne ait internal transcribed spacer 1 (ITS-1) genetik bölgesine yönelik spesifik prob tasarımı yapılmıştır. İlgili çalışmada kullanılan probun bağlandığı genetik bölge NCBI nükleotid veri tabanından (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/) FASTA dosyaları formatında indirilmiştir (Şekil 3.2.6.2.). Primer 3 programına (http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/) ilgili FASTA dosyaları yüklenmiştir (Şekil 3.2.6.3.).

Primer 3 programı kullanılarak DNA dizisinden manuel olarak tasarımlar yapılmıştır. Forward primer sekmesine DNA dizisi üzerinden seçilen bir bölge girişi yapılmıştır. DNA dizisi üzerinden seçilen bir bölge, Reverse Complement programı (https://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html) yardımı ile ters komplementi alındıktan sonra reverse primer sekmesine veriler girilmiştir. Prob olarak yine DNA dizisinden bir bölge seçilmiş ve Primer 3 programında prob sekmesine veri girişi yapılmıştır. "Pick Primers" butonu ile girilen primerlerin sıcaklık, 3' ucun kendi üzerine katlanıp bağlanıp bağlanmaması ve saç tokası (hairpin) moleküler yapısal özellikleri incelenmiştir (Şekil 3.2.6.3.).

Tasarlanan primer-prob setinde (Çizelge 13.) prob oligonükleotid dizisi forward primer dizisine daha yakın olarak tasarlanmıştır (Şekil 3.2.6.4.). Daha sonraki aşamada tasarlanan primer-prob setlerinin bakteriyel ve fungal türler ile çapraz reaksiyon verip-vermediğinin testini gerçekleştirebilmek için NCBI Primer Blast programı kullanılmıştır. Bu program kapsamında forward primer sekmesine forward primer, reverse primer sekmesine ise prob oligonükleotid dizisinin ters komplementi bilgileri girilmiştir (Şekil 3.2.6.5.).

"Get Primers" butonu ile prob ve forward primerin hangi türleri çoğalttığı NCBI veri tabanından test edilmiştir (Şekil 3.2.6.6.). Tasarım işlemlerine yalnızca *Trichophyton violaceum* dermatofit küf patojenini çoğaltana kadar manuel olarak deneme-yanılma metodu ile NCBI veri tabanından devam edilmiştir. Tasarlanan

primerlerin NCBI veri tabanı kapsamında özgünlüğünden emin olunduktan ek bir spesifite testi için prob ile reverse primer oligonükleotid dizilerinin bağlandığı genetik bölge NCBI Nucleotide Blast (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch) programına yüklenmiştir (Şekil 3.2.6.7.).

Tasarım özgünlüklerinin özgünlüğünü *in silico* kapsamda kanıtladıktan sonra tasarlanan primer ve prob setinde prob, reverse primere daha yakın olduğundan probun bağlandığı genetik bölgenin ters complementi proje kapsamında temin edilmiştir.

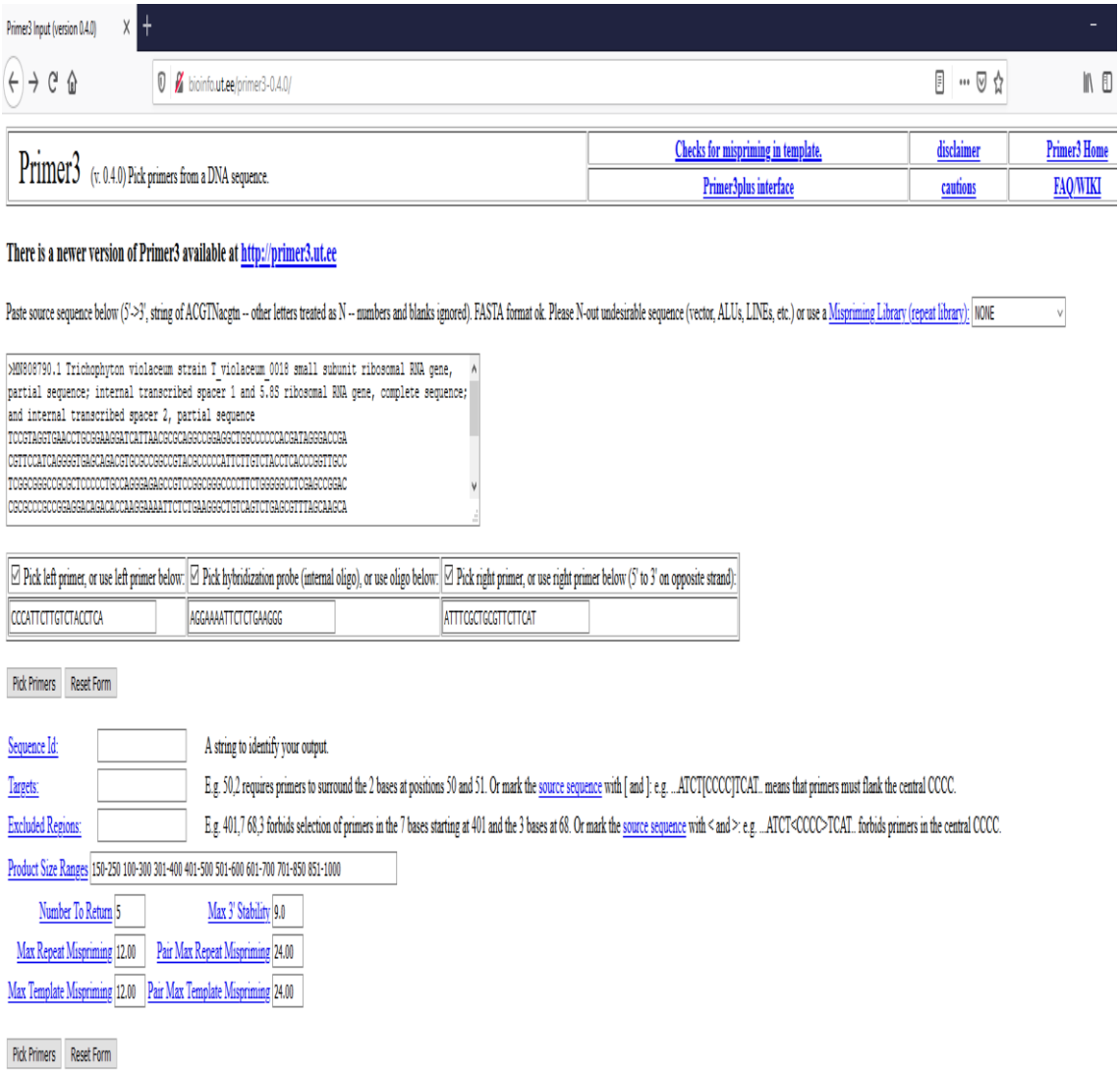


Trichophyton violaceum strain T_violaceum_0018 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1 and 5.8	42.1	42.1	100%	0.11	100.00%	MN808790.1
Trichophyton violaceum strain 28 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2	42.1	42.1	100%	0.11	100.00%	MN807421.1
Trichophyton violaceum strain 51 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2	42.1	42.1	100%	0.11	100.00%	MN807372.1
Trichophyton violaceum isolate BMU07951 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribe	42.1	42.1	100%	0.11	100.00%	MN737950.1
Trichophyton violaceum isolate BMU07950 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribe	42.1	42.1	100%	0.11	100.00%	MN737949.1
Trichophyton violaceum isolate BMU07949 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribe	42.1	42.1	100%	0.11	100.00%	MN737948.1
Trichophyton violaceum isolate BMU03959 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribe	42.1	42.1	100%	0.11	100.00%	MN737947.1
Trichophyton violaceum isolate BMU03354 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribe	42.1	42.1	100%	0.11	100.00%	MN737946.1
Trichophyton violaceum isolate BMU03341 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribe	42.1	42.1	100%	0.11	100.00%	MN737945.1
Trichophyton violaceum isolate BMU07954 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribe	42.1	42.1	100%	0.11	100.00%	MN737880.1
Trichophyton violaceum isolate BMU03958 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribe	42.1	42.1	100%	0.11	100.00%	MN737879.1
Trichophyton violaceum isolate BMU03343 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribe	42.1	42.1	100%	0.11	100.00%	MN737878.1
Trichophyton violaceum isolate BMU03340 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribe	42.1	42.1	100%	0.11	100.00%	MN737877.1
Trichophyton violaceum strain CBS 730.88 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; a	42.1	42.1	100%	0.11	100.00%	MK806614.1
Trichophyton violaceum strain CBS 305.60 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; a	42.1	42.1	100%	0.11	100.00%	MK806613.1
Trichophyton violaceum strain IHEM 1279 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; ar	42.1	42.1	100%	0.11	100.00%	MK806612.1
Trichophyton violaceum strain IHEM 19041 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; a	42.1	42.1	100%	0.11	100.00%	MK806611.1
Trichophyton violaceum strain IHEM 4711 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; an	42.1	42.1	100%	0.11	100.00%	MK806610.1
Trichophyton violaceum strain HS 216-6181 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence;	42.1	42.1	100%	0.11	100.00%	MK806609.1
Trichophyton violaceum strain CBS 118536 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; a	42.1	42.1	100%	0.11	100.00%	MK806608.1
Trichophyton violaceum strain CBS 376.92 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; a	42.1	42.1	100%	0.11	100.00%	MK806607.1
Trichophyton violaceum strain HS 217-5329 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence;	42.1	42.1	100%	0.11	100.00%	MK806606.1
Trichophyton violaceum strain HS 217-1976 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence;	42.1	42.1	100%	0.11	100.00%	MK806605.1
Trichophyton violaceum strain HS 217-1900 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence;	42.1	42.1	100%	0.11	100.00%	MK806604.1
Trichophyton violaceum strain HS 215-633 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; a	42.1	42.1	100%	0.11	100.00%	MK806603.1
Trichophyton violaceum strain IHEM 3779 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; ar	42.1	42.1	100%	0.11	100.00%	MK806602.1
Trichophyton violaceum strain IHEM 3760 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; ar	42.1	42.1	100%	0.11	100.00%	MK806601.1
Trichophyton violaceum strain IHEM 4887 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; ar	42.1	42.1	100%	0.11	100.00%	MK806600.1
Trichophyton violaceum strain IHEM 3663 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; ar	42.1	42.1	100%	0.11	100.00%	MK806599.1
Trichophyton violaceum strain CBS 141829 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; a	42.1	42.1	100%	0.11	100.00%	MK806598.1
Trichophyton violaceum strain CBS 141826 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; a	42.1	42.1	100%	0.11	100.00%	MK806597.1
Trichophyton violaceum strain CBS 141825 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; a	42.1	42.1	100%	0.11	100.00%	MK806596.1
Trichophyton violaceum strain CBS 120320 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; a	42.1	42.1	100%	0.11	100.00%	MK806595.1
Trichophyton violaceum strain CBS 375.92 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; a	42.1	42.1	100%	0.11	100.00%	MK806594.1
Trichophyton violaceum strain CBS 555.84 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; a	42.1	42.1	100%	0.11	100.00%	MK806593.1
Trichophyton violaceum strain CBS 677.82 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; a	42.1	42.1	100%	0.11	100.00%	MK806592.1

Şekil 3.2.6.1. Makalede (Wisselink vd., 2011) kullanılan probun NCBI nükleotid veri tabanı kapsamında bağlandığı bölgenin bulunmasının gösterilmesi.



Şekil 3.2.6.2. *Trichophyton violaceum* türüne ait referans alınan makalede (Wisselink vd., 2011) kullanılan probun NCBI veri tabanı kapsamında bağlandığı DNA dizisinin kopyalanmasının gösterilmesi.



Şekil 3.2.6.3. *Trichophyton violaceum* türüne ait ITS gen bölgesi dizilerinin Primer 3 programına girilmesi ve manuel primer ve prob setlerinin tasarlanmasının gösterilmesi.

Primer3 Output

```
PRIMER PICKING RESULTS FOR MK299075.1:135-479 Trichophyton violaceum strain IHEM_26915 internal

No mispriming library specified
No hyb oligo mishyb library specified
Using 1-based sequence positions
OLIGO          start  len      tm      gc%   any   3'  seq
LEFT PRIMER        1   20   60.33   55.00  2.00  0.00 GCCCCCATTCTTGTCTACCT
RIGHT PRIMER     345   20   59.85   45.00  4.00  2.00 GTTGAAATGACGCTCGAACA
HYB OLIGO        128   28   67.81   46.43  6.00  5.00 AGGAAAATTCTCTGAAGGGCTGTCAGTC
SEQUENCE SIZE: 345
INCLUDED REGION SIZE: 345

PRODUCT SIZE: 345, PAIR ANY COMPL: 4.00, PAIR 3' COMPL: 1.00

    1 GCCCCCATTCTTGTCTACCTCACCCGGTTGCCTCGGCGGGCCGCGCTCCCCCTGCCAGGG
      >>>>>>>>>>>>>>>>>>>

   61 AGAGCCGTCCGGCGGGCCCCTTCTGGGGGCCTCGAGCCGGACCGCGCCCGCCGGAGGACA


  121 GACACCAAGGAAAATTCTCTGAAGGGCTGTCAGTCTGAGCGTTTAGCAAGCACAATCAGT
             ^^^^^^^^^^^^^^^^^^^^^^^^^^^^^^^

  181 TAAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGC

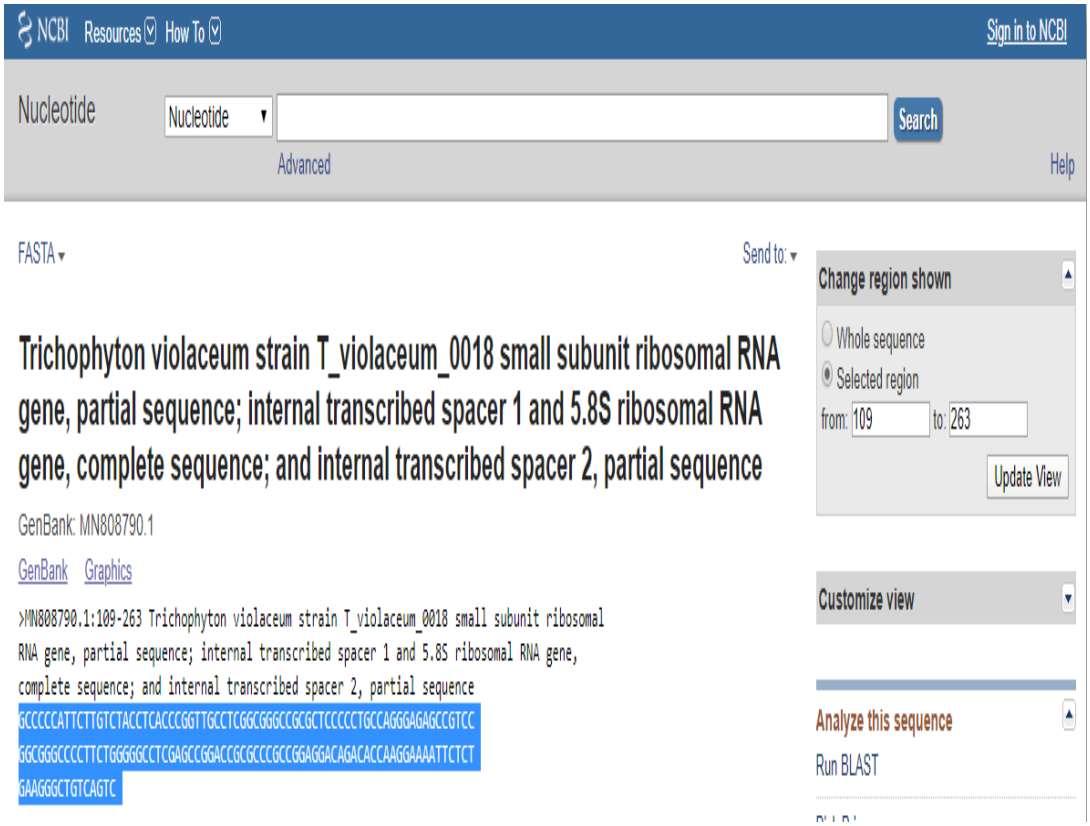

  241 GATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGC


  301 CCTCTGGCATTCCGGGGGGGCATGCCTGTTCGAGCGTCATTTCAAC
                           <<<<<<<<<<<<<<<<<<<
```

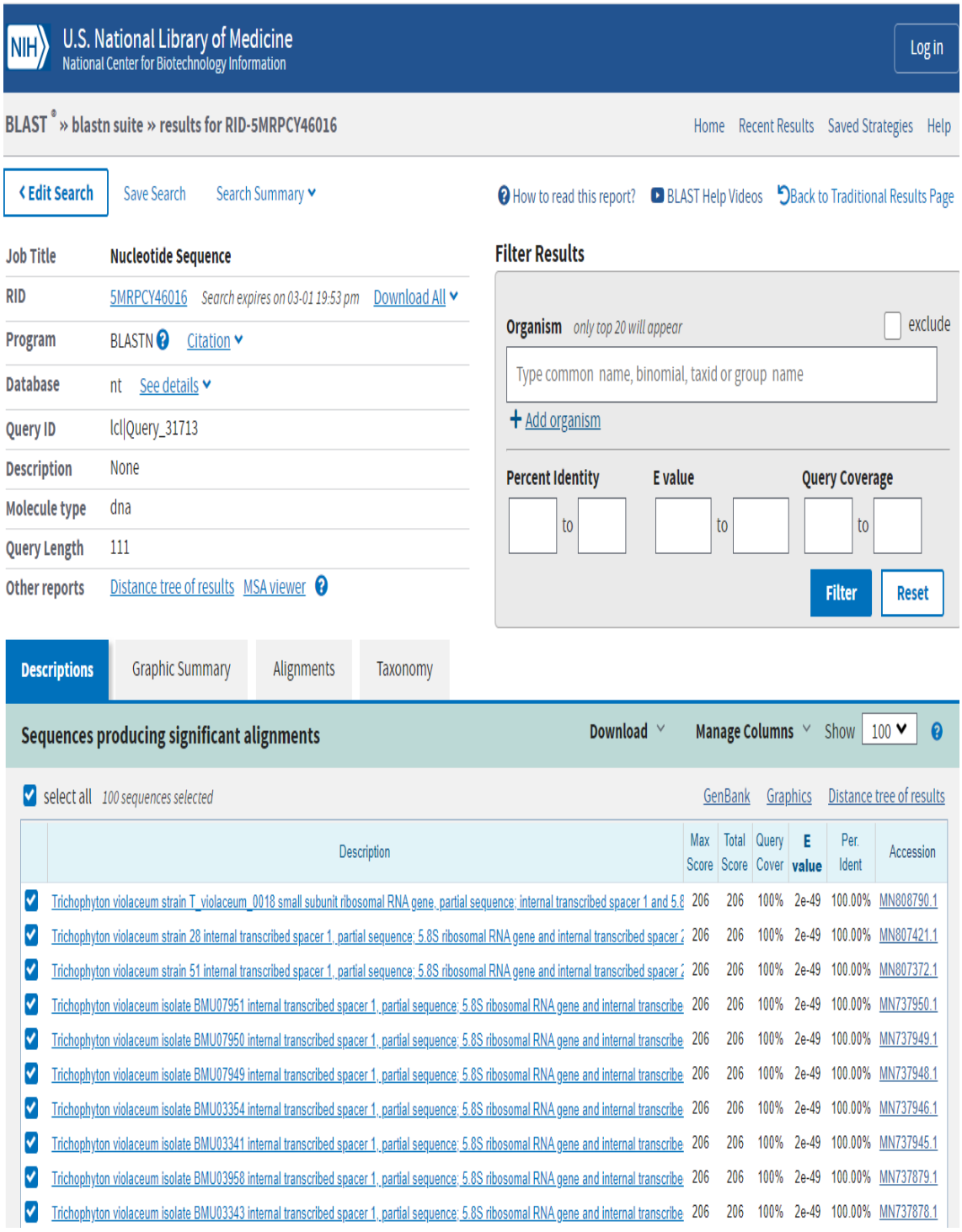
Şekil 3.2.6.4. Primer 3 programı kullanılarak manuel olarak yapılan primer ve prob setinin tasarlanması sonucunun gösterilmesi.



Şekil 3.2.6.5. Tasarlanan primer ve prob oligonükleotid dizilerinin spesifite testi için NCBI Primer Blast programına aktarılması ve ilgili veri tabanındaki tarama sonuçlarının gösterilmesi.



Şekil 3.2.6.6. Tasarlanan forward primer ve prob oligonükleotid dizilerinin bağlandığı genetik bölge sekansının gösterilmesi.



Şekil 3.2.6.7. Tasarlanan forward primer ve prob oligonükleotid dizilerinin bağlandığı genetik bölgenin NCBI nükleotid veri tabanında hangi türlere ait olduğunun gösterilmesi.

Çizelge 13. *Trichophyton violaceum* için tasarlanan primer ve prob setleri

Forward Primer	GCCCCCATTCTTGTCTACCT
Reverse Primer	GTTGAAATGACGCTCGAACA
Prob	AGGAAAATTCTCTGAAGGGCTGTCAGTC

3. 2. 7. Real-Time PCR Reaksiyonları

qPCR reaksiyonları kapsamında 1 ng template (kalıp) DNA molekülü, 1 U Hot-Start Taq DNA Polimeraz enzimi, 0,5 µM ayrı ayrı tüm oligonükleotid dizileri, 0,25 µM FAM ve HEX boyalı oligolar, 0,15 µM ROX boyalı oligolar ve 2,5 µM $MgCl_2$ bileşiği içerecek şekilde hazırlanmıştır.

Tüm deneylerdeki PCR reaksiyonlarında 95°C sıcaklık değerinde 5 dakika; 40 döngü, 95°C sıcaklık değerinde 10 saniye, 52°C sıcaklık değerinde 30 saniye süre ile ısıl döngü programı uygulanmıştır. PCR reaksiyonlarının gerçekleştirilmesi için LightCycler® 96 Real-Time PCR Sistemi (Roche, ABD) kullanılmıştır. PCR reaksiyonlarında önem arz eden eşik döngü sayıları (Cq) LightCycler® 96 cihaz yazılımı kullanılarak belirlenmiş ve Cq değeri 37 değerinin altında olan PCR reaksiyonları pozitif olarak kabul edilmiştir.

Çalışma kapsamında hedef türlerime yönelik tasarlanan forward ve reverse primerler ile prob oligonükleotid sekansları, bağlandıkları hedef gen bölgeleri, kullanılan PCR boyaları ve baskılayıcı elemanlar ile ortaya çıkan ürün boyutları Çizelge 14.'de gösterilmiştir.

Çizelge 14. Çalışma kapsamında tasarlanan primer-prob setlerinin isimleri, kullanılan prob boyaları ile ürün boyutlarının gösterilmesi

Türün Adı	Oligo Adı	Gen Adı	5'	Oligo Sekansı	3'	Ürün Boyutu
Trichophyton tonsurans	T_tonsurans_F	ITS-1		CGTAGGTGAACCTGCGGAA		202
Trichophyton tonsurans	T_tonsurans_R			CAGCGTTGAGCCGCTATAAA		
Trichophyton tonsurans	T_tonsurans_P		ROX	CCGCCGAGGCAACCGAGTAA	BHQ 2	
Trichophyton rubrum	T_rubrum_F	ITS-2		TTCCTAGGCGAATGGGCA		64
Trichophyton rubrum	T_rubrum_R			TAAAGATTGGGGCCAGGG		
Trichophyton rubrum	T_rubrum_P		FAM	TTCAGCGCCCTCAGGACCG	BHQ 1	
Trichophyton vioaceum	T_violaceum_F	ITS-1		GCCCCCATTCTTGTCTACCT		345
Trichophyton vioaceum	T_violaceum_R			GTTGAAATGACGCTCGAACA		
Trichophyton vioaceum	T_violaceum_P		HEX	AGGAAAATTCTCTGAAGGGCTGTCAGTC	BHQ 1	
Trichophyton verrucosum	T_verrucosum_F	ITS-1		GATCAGCGTTCCATCAG		248
Trichophyton verrucosum	T_verrucosum_R			GATGCCGGAACCAAGAGAT		
Trichophyton verrucosum	T_verrucosum_P		HEX	CGAGCCTCTTCGGGGGCTTT	BHQ 1	
Trichophyton interdigitale	T_interdigitale_F	NTS		GGGCTTTGACAGGTGGTGTA		223
Trichophyton interdigitale	T_interdigitale_R			GCTGTCGGACTCCTGTTTTG		
Trichophyton interdigitale	T_interdigitale_P		FAM	TCTGGCCACTCGGTCAGGTTG	BHQ 1	
Trichophyton mentagrophytes_interdigitale	T_mentag_inter_F	ITS-1		CGCCCCATTCTTGTCTACAT		91
Trichophyton mentagrophytes_interdigitale	T_mentag_inter_R			GTTTAGCCACTAAAGAGAGGCTC		
Trichophyton mentagrophytes_interdigitale	T_mentag_inter_P		ROX	AACGGCTCTCCTGGGAGAGC	BHQ 2	

Çalışma kapsamında kullanılan primer-prob setlerinden 2 adet Multiplex Kit tasarımı gerçekleştirildi ve TRICOPLEX 1 ile TRICOPLEX 2 olarak adlandırılması yapılmıştır.

Çizelge 15. Tasarlanan 1. Multiplex Primer ve Prob setleri (Tricoplex 1)

Hedef Tür	Prob Boyası
Trichophyton tonsurans	ROX
Trichophyton rubrum	FAM
Trichophyton verrucosum	HEX

Çizelge 16. Tasarlanan 2. Multiplex Primer ve Prob setleri (Tricoplex 2)

Hedef Tür	Prob Boyası
Trichophyton mentagrophytes/interdigitale	ROX
Trichophyton vioalceum	HEX
Trichophyton interdigitale	FAM

Çizelge 17. Multiplex Real-Time PCR reaksiyonları karışımlarının hazırlanması

Bileşen	1 X Reaksiyon (1 µL)
2x qPCR Mix (Biosepeedy, Bioeksen (Türkiye))	5 µL
Primer-Prob karışımı	0.365 µL
Moleküler ölçekli su	2.635 µL
DNA	2 µL
Toplam	10 µL

Çizelge 18. Multiplex Real-Time PCR reaksiyonları kapsamında kullanılan ısıl döngü programlarının gösterilmesi

1 Döngü	40 Döngü		Okuma
Ön İnkübasyon	Amplifikasyon		
95 °C 5 dk.	95 °C 10 sn.	52 °C 30 sn.	FAM/HEX/ROX

3. 2. 8. Analitik Duyarlılık ve Çalışmanın Özgüllüğünün Belirlenmesi

Çalışmanın özgüllüğünün belirlenmesi kapsamında çalışılan *Trichophyton* türlerinin tespiti için Tricoplex 1 ile Tricoplex 2 Multiplex Real-Time PCR reaksiyonları 3'er kez hedef mikrofunguslar ve hedef olmayan mikrofunguslar ile deney planları kurulmuştur.

Çizelge 19. Çalışılan 6 hedef *Trichophyton* türü için tasarlanan Multiplex Real-Time PCR deney planları

Deney Sırası	**Multiplex Reaksiyon**	**Hedef Tür**
1. Deney	Tricoplex 1	*Trichophyton rubrum*
	Tricoplex 2	*Trichophyton rubrum*
2. Deney	Tricoplex 1	*Trichophyton tonsurans*
	Tricoplex 2	*Trichophyton tonsurans*
3. Deney	Tricoplex 1	*Trichophyton verrucosum*
	Tricoplex 2	*Trichophyton verrucosum*
4. Deney	Tricoplex 1	*Trichophyton violaceum*
	Tricoplex 2	*Trichophyton violaceum*
5. Deney	Tricoplex 1	*Trichophyton interdigitale*
	Tricoplex 2	*Trichophyton interdigitale*
6. Deney	Tricoplex 1	*Trichophyton mentagrophytes*
	Tricoplex 2	*Trichophyton mentagrophytes*

Çalışmada gerçekleştirilen deneylerde kontaminasyon riskini önleyebilmek için *Trichophyton* türlerine yönelik yapılan Real-Time PCR reaksiyonları ayrı ayrı yapıldığından dolayı hepsine farklı deney numara ve adları verilmiştir. Spesifite testleri için 6 hedef *Trichophyton* türlerinin her biri ayrı ayrı olarak Tricoplex 1 ve Tricoplex 2 Multiplex Real-Time PCR reaksiyonları deneylerine eklenmiştir.

1. deney kapsamında Tricoplex 1 ve Tricoplex 2 Multiplex Real-Time PCR reaksiyonu için sadece *Trichophyton rubrum* türünün genomik DNA molekülü, 2. deney için sadece *Trichophyton tonsurans* türünün genomik DNA molekülü, 3. deney için sadece *Trichophyton verrucosum* türünün genomik DNA molekülü, 4. deney için sadece *Trichophyton violaceum* türünün genomik DNA molekülü, 5. deney kapsamında sadece *Trichophyton interdigitale* türünün genomik DNA molekülü ve 6. deney kapsamında sadece *Trichophyton mentagrophytes* türünün genomik DNA molekülü eklenmiştir.

Çizelge 20. Tricoplex 1 kapsamında özgüllüğün belirlenmesi için hedef olmayan mikrofunguslar ile yapılan Real-Time PCR deney planı-1

7. Deney	**Referans Suş No (CECT & CBS Kodu)**	**Tür**	**Multiplex**
	CBS 116328	*Alternaria alternariae*	Tricoplex 1
	CBS 126989	*Alternaria alternariae*	Tricoplex 1
	CECT 20560	*Alternaria alternata*	Tricoplex 1
	CECT 20923	*Alternaria alternata*	Tricoplex 1
	CBS 747.68	*Alternaria atra*	Tricoplex 1
	CBS 101140	*Alternaria atra*	Tricoplex 1
	CBS 106.27	*Alternaria citri*	Tricoplex 1
	CBS 192.81	*Alternaria citri*	Tricoplex 1
	CBS 183.44	*Alternaria cucurbitae*	Tricoplex 1
	CBS 483.81	*Alternaria cucurbitae*	Tricoplex 1
	CBS 655.96	*Alternaria longipes*	Tricoplex 1
	CBS 917.96	*Alternaria longipes*	Tricoplex 1
	CBS 686.68	*Alternaria tenuissima*	Tricoplex 1
	CBS 880.95	*Alternaria tenuissima*	Tricoplex 1
	CBS 721.96	*Aspergillus aculeatus*	Tricoplex 1
	CBS 117783	*Aspergillus aculeatus*	Tricoplex 1
	CECT 2086	*Aspergillus carbonarius*	Tricoplex 1
	CECT 20384	*Aspergillus carbonarius*	Tricoplex 1
	CECT 2673	*Aspergillus clavatus*	Tricoplex 1
	CECT 2674	*Aspergillus clavatus*	Tricoplex 1
	CECT 2687	*Aspergillus flavus*	Tricoplex 1
	CECT 20802	*Aspergillus flavus*	Tricoplex 1
	CECT 20388	*Aspergillus foetidus var. acidus*	Tricoplex 1
	CECT 20389	*Aspergillus foetidus var. acidus*	Tricoplex 1
	CECT 2071	*Aspergillus fumigatus*	Tricoplex 1
	CECT 20827	*Aspergillus fumigatus*	Tricoplex 1
	CBS 117620	*Aspergillus minisclerotigenes*	Tricoplex 1
	CBS 117633	*Aspergillus minisclerotigenes*	Tricoplex 1
	CBS 115656	*Aspergillus neoniger*	Tricoplex 1
	CBS 115657	*Aspergillus neoniger*	Tricoplex 1
	CBS 129193	*Aspergillus nidulans*	Tricoplex 1
	CBS 126972	*Aspergillus nidulans*	Tricoplex 1
	CECT 2088	*Aspergillus niger*	Tricoplex 1
	CECT 20385	*Aspergillus niger*	Tricoplex 1
	CBS 260.88	*Aspergillus nomius*	Tricoplex 1
	CBS 123901	*Aspergillus nomius*	Tricoplex 1

	CECT 2093	*Aspergillus ochraceus*	Tricoplex 1
	CECT 2948	*Aspergillus ochraceus*	Tricoplex 1
	CECT 2094	*Aspergillus oryzae*	Tricoplex 1
	CECT 2095	*Aspergillus oryzae*	Tricoplex 1
	CECT 2680	*Aspergillus parasiticus*	Tricoplex 1
	CECT 2681	*Aspergillus parasiticus*	Tricoplex 1
	CBS 100929	*Aspergillus sojae*	Tricoplex 1
	CBS 100930	*Aspergillus sojae*	Tricoplex 1
	CECT 20399	*Aspergillus tamarii*	Tricoplex 1
	CBS 118098	*Aspergillus tamarii*	Tricoplex 1
	CECT 20365	*Aspergillus terreus*	Tricoplex 1
	CECT 20404	*Aspergillus terreus*	Tricoplex 1
	CECT 2575	*Aspergillus tubingensis*	Tricoplex 1
	CECT 20393	*Aspergillus tubingensis*	Tricoplex 1
	CBS 133.55	*Aspergillus ustus*	Tricoplex 1
	CBS 121617	*Aspergillus ustus*	Tricoplex 1
	CECT 2814	*Aspergillus versicolor*	Tricoplex 1
	CECT 2903	*Aspergillus versicolor*	Tricoplex 1
	CBS 112803	*Aspergillus westerdijkiae*	Tricoplex 1
	CBS 134398	*Aspergillus westerdijkiae*	Tricoplex 1
	CBS 105.40	*Chaetomium globosum*	Tricoplex 1
	CECT 2110	*Cladosporium cladosporioides*	Tricoplex 1
	CECT 20805	*Cladosporium cladosporioides*	Tricoplex 1
	CBS 122.47	*Cladosporium sphaerospermum*	Tricoplex 1
	CBS 117728	*Cladosporium sphaerospermum*	Tricoplex 1
	CECT 2107	*Cladosporium cucumerinum*	Tricoplex 1
	CBS 177.54	*Cladosporium cucumerinum*	Tricoplex 1
	CECT 20904	*Cladosporium herbarum*	Tricoplex 1
	CBS 299.67	*Cladosporium macrocarpum*	Tricoplex 1
	CBS 121623	*Cladosporium macrocarpum*	Tricoplex 1
	CECT 20421	*Cladosporium oxysporum*	Tricoplex 1
	CBS 115324	*Cladosporium oxysporum*	Tricoplex 1
	CBS 195.54	*Cladosporium variabile*	Tricoplex 1
	CBS 121635	*Cladosporium variabile*	Tricoplex 1
	CECT 2586	*Eurotium amstelodami*	Tricoplex 1
	CECT 20298	*Eurotium amstelodami*	Tricoplex 1
	CECT 20300	*Eurotium chevalieri*	Tricoplex 1
	CBS 121704	*Eurotium chevalieri*	Tricoplex 1
	CECT 2922	*Eurotium herbariorum=Eurotium pseudoglaucum= Aspergillus glaucus*	Tricoplex 1
	CBS 334.75	*Fusarium acuminatum*	Tricoplex 1
	CBS 102796	*Fusarium acuminatum*	Tricoplex 1
	CBS 239.94	*Fusarium avenaceum*	Tricoplex 1

	CECT 20493	*Fusarium culmorum*	Tricoplex 1
	CECT 20494	*Fusarium culmorum*	Tricoplex 1
	BİLGİ YOK	*Fusarium culmorum*	Tricoplex 1
	CBS 108944	*Fusarium dimerum var. dimerum*	Tricoplex 1
	CBS 110141	*Fusarium dimerum var. dimerum*	Tricoplex 1
	CECT 20925	*Fusarium equiseti*	Tricoplex 1
	CBS 185.31	*Fusarium equiseti*	Tricoplex 1
	CECT 20270	*Fusarium graminearum*	Tricoplex 1
	CECT 20924	*Fusarium graminearum*	Tricoplex 1
	CBS 123566	*Fusarium incarnatum*	Tricoplex 1
	CBS 132821	*Fusarium incarnatum*	Tricoplex 1
	CECT 20920	*Fusarium oxysporum*	Tricoplex 1
	CECT 20165	*Fusarium poae*	Tricoplex 1
	CECT 20569	*Fusarium proliferatum*	Tricoplex 1
	CECT 20546	*Fusarium proliferatum*	Tricoplex 1
	CBS 187.34	*Fusarium sambucinum*	Tricoplex 1
	CBS 146.95	*Fusarium sambucinum var. sambucinum*	Tricoplex 1

Çalışma kapsamında özgüllüğün belirlenmesi için yapılan Multiplex Real-Time PCR deneylerinde TÜBİTAK 214Z008 projesi ile çeşitli uluslarası referans merkezlerinden [CBS, Centraalbureau voor Schimmelcultures (Utrecht, The Netherlands); CECT (La Colección Española de Cultivos Tipo (Valencia, Spain) vb.] temini sağlanan referans mikrofungal suşlar kullanılmıştır.

PCR reaksiyonların gerçekleştirilmesi için kullanılan LightCycler® 96 Real-Time PCR sistemi (Roche, ABD) tek bir reaksiyon deneyinde 96 hedef çalışabilmesinden kaynaklı Tricoplex 1 Multiplex Real-Time PCR'ının özgüllüğü 3 deney başlığında test edilmiştir. İlk iki deney kapsamında 95 hedef ile 1 negatif kontrol için reaksiyon kurulmuştur. 3. deney kapsamında ise 40 hedef ve 1 negatif kontrol kullanılmıştır. Çizelge 20.'de verilen 95 hedef ile 1 negatif kontrol için 3 kez Real-Time PCR reaksiyonu kurulmuştur.

Çizelge 21. Tricoplex 1 kapsamında özgüllüğün belirlenmesi için hedef olmayan mikrofunguslar ile yapılan Real-Time PCR deney planı-2

8. Deney	**Referans Suş No (CECT & CBS Kodu)**	**Tür**	**Multiplex**

	CECT 20232	*Fusarium solani*	Tricoplex 1
	CBS 115323	*Fusarium solani*	Tricoplex 1
	CECT 20166	*Fusarium sporotrichioides*	Tricoplex 1
	CBS 115700	*Fusarium sporotrichioides var. sporotrichioides*	Tricoplex 1
	CBS 215.76	*Fusarium subglutinans*	Tricoplex 1
	CBS 119831	*Fusarium subglutinans*	Tricoplex 1
	CECT 20150	*Fusarium tricinctum*	Tricoplex 1
	CBS 253.50	*Fusarium tricinctum*	Tricoplex 1
	CECT 20926	*Fusarium verticillioides*	Tricoplex 1
	CBS 114579	*Fusarium verticillioides*	Tricoplex 1
	CBS 213.73	*Graphiopsis chlorocephala*	Tricoplex 1
	CBS 100405	*Graphiopsis chlorocephala*	Tricoplex 1
	CBS 285.64	*Microascus manginii*	Tricoplex 1
	CBS 254.69	*Microascus manginii*	Tricoplex 1
	CECT 20765	*Mucor circinelloides*	Tricoplex 1
	CBS 120584	*Mucor circinelloides f. circinelloides*	Tricoplex 1
	CECT 2653	*Mucor mucedo*	Tricoplex 1
	CBS 640.67	*Mucor mucedo*	Tricoplex 1
	CECT 20422	*Mucor plumbeus*	Tricoplex 1
	CECT 20552	*Mucor plumbeus*	Tricoplex 1
	CECT 2670	*Mucor racemosus*	Tricoplex 1
	CECT 20821	*Mucor racemosus*	Tricoplex 1
	CBS 544.65	*Neosartorya fischeri*	Tricoplex 1
	CBS 832.88	*Neosartorya fischeri*	Tricoplex 1
	CECT 2983	*Paecilomyces variotii*	Tricoplex 1
	CECT 20360	*Paecilomyces variotii*	Tricoplex 1
	CBS 109575	*Penicillium aethiopicum*	Tricoplex 1
	CBS 109602	*Penicillium aethiopicum*	Tricoplex 1
	CBS 291.48	*Penicillium atramentosum*	Tricoplex 1
	CBS 243.73	*Penicillium atramentosum*	Tricoplex 1
	CECT 20226	*Penicillium aurantiogriseum*	Tricoplex 1
	CBS 253.55	*Penicillium brasilianum*	Tricoplex 1
	CBS 334.74	*Penicillium brasilianum*	Tricoplex 1
	CECT 2316	*Penicillium brevicompactum*	Tricoplex 1
	CECT 20227	*Penicillium brevicompactum*	Tricoplex 1
	CECT 2267	*Penicillium camemberti*	Tricoplex 1
	CECT 20271	*Penicillium camemberti*	Tricoplex 1
	CBS 466.95	*Penicillium carneum*	Tricoplex 1
	CBS 112297	*Penicillium carneum*	Tricoplex 1
	CECT 2668	*Penicillium chrysogenum*	Tricoplex 1
	CECT 20273	*Penicillium chrysogenum*	Tricoplex 1
	CECT 20438	*Penicillium citreonigrum*	Tricoplex 1

	CECT 20426	*Penicillium citreonigrum*	Tricoplex 1
	CECT 20794	*Penicillium citrinum*	Tricoplex 1
	CECT 20822	*Penicillium citrinum*	Tricoplex 1
	CECT 20767	*Penicillium commune*	Tricoplex 1
	CBS 216.30	*Penicillium commune*	Tricoplex 1
	CECT 2270	*Penicillium corylophilum*	Tricoplex 1
	CECT 2273	*Penicillium corylophilum*	Tricoplex 1
	CBS 110074	*Penicillium crustosum*	Tricoplex 1
	CBS 110075	*Penicillium crustosum*	Tricoplex 1
	CBS 114.74	*Penicillium cyclopium*	Tricoplex 1
	CBS 101136	*Penicillium cyclopium*	Tricoplex 1
	CECT 2954	*Penicillium digitatum*	Tricoplex 1
	CECT 20795	*Penicillium digitatum*	Tricoplex 1
	CBS 474.84	*Penicillium discolor*	Tricoplex 1
	CBS 222.92	*Penicillium discolor*	Tricoplex 1
	CBS 347.97	*Penicillium echinulatum*	Tricoplex 1
	CBS 112289	*Penicillium echinulatum*	Tricoplex 1
	CECT 2278	*Penicillium expansum*	Tricoplex 1
	CECT 2280	*Penicillium expansum*	Tricoplex 1
	CBS 292.97	*Penicillium freii*	Tricoplex 1
	CBS 112022	*Penicillium freii*	Tricoplex 1
	CECT 2914	*Penicillium funiculosum*	Tricoplex 1
	CECT 20553	*Penicillium glabrum*	Tricoplex 1
	CECT 20826	*Penicillium glabrum*	Tricoplex 1
	CECT 2605	*Penicillium griseofulvum*	Tricoplex 1
	CECT 2919	*Penicillium griseofulvum*	Tricoplex 1
	CBS 135.41	*Penicillium hirsutum*	Tricoplex 1
	CBS 110099	*Penicillium hirsutum*	Tricoplex 1
	CECT 2762	*Penicillium islandicum*	Tricoplex 1
	CECT 20332	*Penicillium italicum*	Tricoplex 1
	CECT 2294	*Penicillium italicum*	Tricoplex 1
	CBS 110149	*Penicillium melanoconidium*	Tricoplex 1
	CBS 115506	*Penicillium melanoconidium*	Tricoplex 1
	CBS 257.94	*Penicillium nalgiovense*	Tricoplex 1
	CBS 109608	*Penicillium nalgiovense*	Tricoplex 1
	CECT 20766	*Penicillium nordicum*	Tricoplex 1
	CBS 606.68	*Penicillium nordicum*	Tricoplex 1
	CBS 219.30	*Penicillium oxalicum*	Tricoplex 1
	CBS 838.96	*Penicillium oxalicum*	Tricoplex 1
	CBS 107.11	*Penicillium palitans*	Tricoplex 1
	CBS 112205	*Penicillium palitans*	Tricoplex 1
	CBS 101032	*Penicillium paneum*	Tricoplex 1
	CBS 114483	*Penicillium paneum*	Tricoplex 1

	CECT 20933	*Penicillium polonicum*	Tricoplex 1
	CECT 2918	*Penicillium polonicum*	Tricoplex 1
	CECT 20441	*Penicillium purpurogenum*	Tricoplex 1
	CECT 20436	*Penicillium purpurogenum*	Tricoplex 1
	CECT 2905	*Penicillium roqueforti*	Tricoplex 1
	CECT 20509	*Penicillium roqueforti*	Tricoplex 1
	CBS 343.59	*Penicillium sclerotigenum*	Tricoplex 1
	CBS 112566	*Penicillium sclerotigenum*	Tricoplex 1
	CECT 20818	*Penicillium solitum*	Tricoplex 1
	CBS 470.84	*Penicillium solitum*	Tricoplex 1

Çizelge 21.'de verilen 95 hedef ile 1 negatif kontrol için 3 kez Real-Time PCR reaksiyonu kurulmuştur.

Çizelge 22. Tricoplex 1 kapsamında özgüllüğün belirlenmesi için hedef olmayan mikrofunguslar ile yapılan Real-Time PCR deney planı-3

9. Deney	**Referans Suş No (CECT & CBS Kodu)**	**Tür**	**Multiplex**
	CECT 2906	*Penicillium verrucosum*	Tricoplex 1
	CBS 190.72	*Penicillium verrucosum*	Tricoplex 1
	CECT 2320	*Penicillium viridicatum*	Tricoplex 1
	CBS 101034	*Penicillium viridicatum*	Tricoplex 1
	CBS 536.65	*Petromyces alliaceus*	Tricoplex 1
	CBS 511.69	*Petromyces alliaceus*	Tricoplex 1
	CECT 20262	*Phoma glomerata*	Tricoplex 1
	CECT 2774	*Rhizopus oryzae*	Tricoplex 1
	CECT 2672	*Rhizopus oryzae*	Tricoplex 1
	CECT 2344	*Rhizopus stolonifer*	Tricoplex 1
	CBS 263.28	*Rhizopus stolonifer var. stolonifer*	Tricoplex 1
	CECT 2984	*Scopulariopsis brevicaulis*	Tricoplex 1
	CECT 2985	*Scopulariopsis brevicaulis*	Tricoplex 1
	CBS 119.43	*Scopulariopsis flava*	Tricoplex 1
	CBS 207.61	*Scopulariopsis flava*	Tricoplex 1
	CBS 668.74	*Scopulariopsis fusca*	Tricoplex 1
	CBS 102829	*Scopulariopsis fusca*	Tricoplex 1
	CBS 114313	*Stachybotrys chartarum*	Tricoplex 1
	CBS 119366	*Stachybotrys chartarum*	Tricoplex 1
	CBS 235.94	*Talaromyces funiculosus*	Tricoplex 1
	CBS 117284	*Talaromyces islandicus*	Tricoplex 1
	CBS 250.56	*Talaromyces piceus*	Tricoplex 1

	CBS 350.61	*Talaromyces piceus*	Tricoplex 1
	CBS 100488	*Talaromyces radicus*	Tricoplex 1
	CBS 100489	*Talaromyces radicus*	Tricoplex 1
	CBS 101144	*Talaromyces ruber*	Tricoplex 1
	CBS 132700	*Talaromyces ruber*	Tricoplex 1
	CBS 371.48	*Talaromyces rugulosus*	Tricoplex 1
	CBS 111.64	*Talaromyces rugulosus*	Tricoplex 1
	CBS 193.69	*Talaromyces verruculosus*	Tricoplex 1
	CBS 624.72	*Talaromyces verruculosus*	Tricoplex 1
	CECT 2928	*Trichoderma harzianum*	Tricoplex 1
	CECT 2413	*Trichoderma harzianum*	Tricoplex 1
	CECT 2412	*Trichoderma longibrachiatum*	Tricoplex 1
	CECT 723	*Trichoderma longibrachiatum*	Tricoplex 1
	CECT 2460	*Trichoderma virens*	Tricoplex 1
	CECT 2410	*Trichothecium roseum*	Tricoplex 1
	CECT 20223	*Trichothecium roseum*	Tricoplex 1
	CECT 20820	*Wallemia sebi*	Tricoplex 1
	CBS 120010	*Wallemia sebi*	Tricoplex 1

Çizelge 22.'de verilen 40 hedef ile 1 negatif kontrol için 3 kez Real-Time PCR reaksiyonu kurulmuştur.

Çizelge 23. Tricoplex 2 kapsamında özgüllüğün belirlenmesi için hedef olmayan mikrofunguslar ile yapılan Real-Time PCR deney planı-1

10. Deney	**Referans Suş No (CECT & CBS Kodu)**	**Tür**	**Multiplex**
	CBS 116328	*Alternaria alternariae*	Tricoplex 2
	CBS 126989	*Alternaria alternariae*	Tricoplex 2
	CECT 20560	*Alternaria alternata*	Tricoplex 2
	CECT 20923	*Alternaria alternata*	Tricoplex 2
	CBS 747.68	*Alternaria atra*	Tricoplex 2
	CBS 101140	*Alternaria atra*	Tricoplex 2
	CBS 106.27	*Alternaria citri*	Tricoplex 2
	CBS 192.81	*Alternaria citri*	Tricoplex 2
	CBS 183.44	*Alternaria cucurbitae*	Tricoplex 2
	CBS 483.81	*Alternaria cucurbitae*	Tricoplex 2
	CBS 655.96	*Alternaria longipes*	Tricoplex 2
	CBS 917.96	*Alternaria longipes*	Tricoplex 2
	CBS 686.68	*Alternaria tenuissima*	Tricoplex 2
	CBS 880.95	*Alternaria tenuissima*	Tricoplex 2

	CBS 721.96	*Aspergillus aculeatus*	Tricoplex 2
	CBS 117783	*Aspergillus aculeatus*	Tricoplex 2
	CECT 2086	*Aspergillus carbonarius*	Tricoplex 2
	CECT 20384	*Aspergillus carbonarius*	Tricoplex 2
	CECT 2673	*Aspergillus clavatus*	Tricoplex 2
	CECT 2674	*Aspergillus clavatus*	Tricoplex 2
	CECT 2687	*Aspergillus flavus*	Tricoplex 2
	CECT 20802	*Aspergillus flavus*	Tricoplex 2
	CECT 20388	*Aspergillus foetidus var. acidus*	Tricoplex 2
	CECT 20389	*Aspergillus foetidus var. acidus*	Tricoplex 2
	CECT 2071	*Aspergillus fumigatus*	Tricoplex 2
	CECT 20827	*Aspergillus fumigatus*	Tricoplex 2
	CBS 117620	*Aspergillus minisclerotigenes*	Tricoplex 2
	CBS 117633	*Aspergillus minisclerotigenes*	Tricoplex 2
	CBS 115656	*Aspergillus neoniger*	Tricoplex 2
	CBS 115657	*Aspergillus neoniger*	Tricoplex 2
	CBS 129193	*Aspergillus nidulans*	Tricoplex 2
	CBS 126972	*Aspergillus nidulans*	Tricoplex 2
	CECT 2088	*Aspergillus niger*	Tricoplex 2
	CECT 20385	*Aspergillus niger*	Tricoplex 2
	CBS 260.88	*Aspergillus nomius*	Tricoplex 2
	CBS 123901	*Aspergillus nomius*	Tricoplex 2
	CECT 2093	*Aspergillus ochraceus*	Tricoplex 2
	CECT 2948	*Aspergillus ochraceus*	Tricoplex 2
	CECT 2094	*Aspergillus oryzae*	Tricoplex 2
	CECT 2095	*Aspergillus oryzae*	Tricoplex 2
	CECT 2680	*Aspergillus parasiticus*	Tricoplex 2
	CECT 2681	*Aspergillus parasiticus*	Tricoplex 2
	CBS 100929	*Aspergillus sojae*	Tricoplex 2
	CBS 100930	*Aspergillus sojae*	Tricoplex 2
	CECT 20399	*Aspergillus tamarii*	Tricoplex 2
	CBS 118098	*Aspergillus tamarii*	Tricoplex 2
	CECT 20365	*Aspergillus terreus*	Tricoplex 2
	CECT 20404	*Aspergillus terreus*	Tricoplex 2
	CECT 2575	*Aspergillus tubingensis*	Tricoplex 2
	CECT 20393	*Aspergillus tubingensis*	Tricoplex 2
	CBS 133.55	*Aspergillus ustus*	Tricoplex 2
	CBS 121617	*Aspergillus ustus*	Tricoplex 2
	CECT 2814	*Aspergillus versicolor*	Tricoplex 2
	CECT 2903	*Aspergillus versicolor*	Tricoplex 2
	CBS 112803	*Aspergillus westerdijkiae*	Tricoplex 2
	CBS 134398	*Aspergillus westerdijkiae*	Tricoplex 2
	CBS 105.40	*Chaetomium globosum*	Tricoplex 2

	CECT 2110	*Cladosporium cladosporioides*	Tricoplex 2
	CECT 20805	*Cladosporium cladosporioides*	Tricoplex 2
	CECT 2107	*Cladosporium cucumerinum*	Tricoplex 2
	CBS 177.54	*Cladosporium cucumerinum*	Tricoplex 2
	CECT 20904	*Cladosporium herbarum*	Tricoplex 2
	CBS 299.67	*Cladosporium macrocarpum*	Tricoplex 2
	CBS 121623	*Cladosporium macrocarpum*	Tricoplex 2
	CECT 20421	*Cladosporium oxysporum*	Tricoplex 2
	CBS 115324	*Cladosporium oxysporum*	Tricoplex 2
	CBS 122.47	*Cladosporium sphaerospermum*	Tricoplex 2
	CBS 117728	*Cladosporium sphaerospermum*	Tricoplex 2
	CBS 195.54	*Cladosporium variabile*	Tricoplex 2
	CBS 121635	*Cladosporium variabile*	Tricoplex 2
	CECT 2586	*Eurotium amstelodami*	Tricoplex 2
	CECT 20298	*Eurotium amstelodami*	Tricoplex 2
	CECT 20300	*Eurotium chevalieri*	Tricoplex 2
	CBS 121704	*Eurotium chevalieri*	Tricoplex 2
	CECT 2922	*Eurotium herbariorum=Eurotium pseudoglaucum= Aspergillus glaucus*	Tricoplex 2
	CBS 334.75	*Fusarium acuminatum*	Tricoplex 2
	CBS 102796	*Fusarium acuminatum*	Tricoplex 2
	CBS 239.94	*Fusarium avenaceum*	Tricoplex 2
	CECT 20493	*Fusarium culmorum*	Tricoplex 2
	CECT 20494	*Fusarium culmorum*	Tricoplex 2
	BİLGİ YOK	*Fusarium culmorum*	Tricoplex 2
	CBS 108944	*Fusarium dimerum var. dimerum*	Tricoplex 2
	CBS 110141	*Fusarium dimerum var. dimerum*	Tricoplex 2
	CECT 20925	*Fusarium equiseti*	Tricoplex 2
	CBS 185.31	*Fusarium equiseti*	Tricoplex 2
	CECT 20270	*Fusarium graminearum*	Tricoplex 2
	CECT 20924	*Fusarium graminearum*	Tricoplex 2
	CBS 123566	*Fusarium incarnatum*	Tricoplex 2
	CBS 132821	*Fusarium incarnatum*	Tricoplex 2
	CECT 20920	*Fusarium oxysporum*	Tricoplex 2
	CECT 20165	*Fusarium poae*	Tricoplex 2
	CECT 20569	*Fusarium proliferatum*	Tricoplex 2
	CECT 20546	*Fusarium proliferatum*	Tricoplex 2
	CBS 187.34	*Fusarium sambucinum*	Tricoplex 2
	CBS 146.95	*Fusarium sambucinum var. sambucinum*	Tricoplex 2

PCR reaksiyonların gerçekleştirilmesi için kullanılan LightCycler® 96 Real-Time PCR sistemi (Roche, ABD) tek bir reaksiyon deneyinde 96 hedef

çalışabilmesinden kaynaklı Tricoplex 2 Multiplex Real-Time PCR'ının özgüllüğü 3 deney başlığında test edilmiştir. İlk iki deney kapsamında 95 hedef ile 1 negatif kontrol için reaksiyon kurulmuştur. 3. deney kapsamında ise 40 hedef ve 1 negatif kontrol kullanılmıştır. Çizelge 23.'de verilen 95 hedef ile 1 negatif kontrol için 3 kez Real-Time PCR reaksiyonu kurulmuştur.

Çizelge 24. Tricoplex 2 kapsamında özgüllüğün belirlenmesi için hedef olmayan mikrofunguslar ile yapılan Real-Time PCR deney planı-2

11. Deney	**Referans Suş No (CECT & CBS Kodu)**	**Tür**	**Multiplex**
	CECT 20232	*Fusarium solani*	Tricoplex 2
	CBS 115323	*Fusarium solani*	Tricoplex 2
	CECT 20166	*Fusarium sporotrichioides*	Tricoplex 2
	CBS 115700	*Fusarium sporotrichioides var. sporotrichioides*	Tricoplex 2
	CBS 215.76	*Fusarium subglutinans*	Tricoplex 2
	CBS 119831	*Fusarium subglutinans*	Tricoplex 2
	CECT 20150	*Fusarium tricinctum*	Tricoplex 2
	CBS 253.50	*Fusarium tricinctum*	Tricoplex 2
	CECT 20926	*Fusarium verticillioides*	Tricoplex 2
	CBS 114579	*Fusarium verticillioides*	Tricoplex 2
	CBS 213.73	*Graphiopsis chlorocephala*	Tricoplex 2
	CBS 100405	*Graphiopsis chlorocephala*	Tricoplex 2
	CBS 285.64	*Microascus manginii*	Tricoplex 2
	CBS 254.69	*Microascus manginii*	Tricoplex 2
	CECT 20765	*Mucor circinelloides*	Tricoplex 2
	CBS 120584	*Mucor circinelloides f. circinelloides*	Tricoplex 2
	CECT 2653	*Mucor mucedo*	Tricoplex 2
	CBS 640.67	*Mucor mucedo*	Tricoplex 2
	CECT 20422	*Mucor plumbeus*	Tricoplex 2
	CECT 20552	*Mucor plumbeus*	Tricoplex 2
	CECT 2670	*Mucor racemosus*	Tricoplex 2
	CECT 20821	*Mucor racemosus*	Tricoplex 2
	CBS 544.65	*Neosartorya fischeri*	Tricoplex 2
	CBS 832.88	*Neosartorya fischeri*	Tricoplex 2
	CECT 2983	*Paecilomyces variotii*	Tricoplex 2
	CECT 20360	*Paecilomyces variotii*	Tricoplex 2
	CBS 109575	*Penicillium aethiopicum*	Tricoplex 2
	CBS 109602	*Penicillium aethiopicum*	Tricoplex 2
	CBS 291.48	*Penicillium atramentosum*	Tricoplex 2

	CBS 243.73	*Penicillium atramentosum*	Tricoplex 2
	CECT 20226	*Penicillium aurantiogriseum*	Tricoplex 2
	CBS 253.55	*Penicillium brasilianum*	Tricoplex 2
	CBS 334.74	*Penicillium brasilianum*	Tricoplex 2
	CECT 2316	*Penicillium brevicompactum*	Tricoplex 2
	CECT 20227	*Penicillium brevicompactum*	Tricoplex 2
	CECT 2267	*Penicillium camemberti*	Tricoplex 2
	CECT 20271	*Penicillium camemberti*	Tricoplex 2
	CBS 466.95	*Penicillium carneum*	Tricoplex 2
	CBS 112297	*Penicillium carneum*	Tricoplex 2
	CECT 2668	*Penicillium chrysogenum*	Tricoplex 2
	CECT 20273	*Penicillium chrysogenum*	Tricoplex 2
	CECT 20438	*Penicillium citreonigrum*	Tricoplex 2
	CECT 20426	*Penicillium citreonigrum*	Tricoplex 2
	CECT 20794	*Penicillium citrinum*	Tricoplex 2
	CECT 20822	*Penicillium citrinum*	Tricoplex 2
	CECT 20767	*Penicillium commune*	Tricoplex 2
	CBS 216.30	*Penicillium commune*	Tricoplex 2
	CECT 2270	*Penicillium corylophilum*	Tricoplex 2
	CECT 2273	*Penicillium corylophilum*	Tricoplex 2
	CBS 110074	*Penicillium crustosum*	Tricoplex 2
	CBS 110075	*Penicillium crustosum*	Tricoplex 2
	CBS 114.74	*Penicillium cyclopium*	Tricoplex 2
	CBS 101136	*Penicillium cyclopium*	Tricoplex 2
	CECT 2954	*Penicillium digitatum*	Tricoplex 2
	CECT 20795	*Penicillium digitatum*	Tricoplex 2
	CBS 474.84	*Penicillium discolor*	Tricoplex 2
	CBS 222.92	*Penicillium discolor*	Tricoplex 2
	CBS 347.97	*Penicillium echinulatum*	Tricoplex 2
	CBS 112289	*Penicillium echinulatum*	Tricoplex 2
	CECT 2278	*Penicillium expansum*	Tricoplex 2
	CECT 2280	*Penicillium expansum*	Tricoplex 2
	CBS 292.97	*Penicillium freii*	Tricoplex 2
	CBS 112022	*Penicillium freii*	Tricoplex 2
	CECT 2914	*Penicillium funiculosum*	Tricoplex 2
	CECT 20553	*Penicillium glabrum*	Tricoplex 2
	CECT 20826	*Penicillium glabrum*	Tricoplex 2
	CECT 2605	*Penicillium griseofulvum*	Tricoplex 2
	CECT 2919	*Penicillium griseofulvum*	Tricoplex 2
	CBS 135.41	*Penicillium hirsutum*	Tricoplex 2
	CBS 110099	*Penicillium hirsutum*	Tricoplex 2
	CECT 2762	*Penicillium islandicum*	Tricoplex 2
	CECT 20332	*Penicillium italicum*	Tricoplex 2

	CECT 2294	*Penicillium italicum*	Tricoplex 2
	CBS 110149	*Penicillium melanoconidium*	Tricoplex 2
	CBS 115506	*Penicillium melanoconidium*	Tricoplex 2
	CBS 257.94	*Penicillium nalgiovense*	Tricoplex 2
	CBS 109608	*Penicillium nalgiovense*	Tricoplex 2
	CECT 20766	*Penicillium nordicum*	Tricoplex 2
	CBS 606.68	*Penicillium nordicum*	Tricoplex 2
	CBS 219.30	*Penicillium oxalicum*	Tricoplex 2
	CBS 838.96	*Penicillium oxalicum*	Tricoplex 2
	CBS 107.11	*Penicillium palitans*	Tricoplex 2
	CBS 112205	*Penicillium palitans*	Tricoplex 2
	CBS 101032	*Penicillium paneum*	Tricoplex 2
	CBS 114483	*Penicillium paneum*	Tricoplex 2
	CECT 20933	*Penicillium polonicum*	Tricoplex 2
	CECT 2918	*Penicillium polonicum*	Tricoplex 2
	CECT 20441	*Penicillium purpurogenum*	Tricoplex 2
	CECT 20436	*Penicillium purpurogenum*	Tricoplex 2
	CECT 2905	*Penicillium roqueforti*	Tricoplex 2
	CECT 20509	*Penicillium roqueforti*	Tricoplex 2
	CBS 343.59	*Penicillium sclerotigenum*	Tricoplex 2
	CBS 112566	*Penicillium sclerotigenum*	Tricoplex 2
	CECT 20818	*Penicillium solitum*	Tricoplex 2
	CBS 470.84	*Penicillium solitum*	Tricoplex 2

Çizelge 24.'de verilen 95 hedef ile 1 negatif kontrol için 3 kez Real-Time PCR reaksiyonu kurulmuştur.

Çizelge 25. Tricoplex 2 kapsamında özgüllüğün belirlenmesi için hedef olmayan mikrofunguslar ile yapılan Real-Time PCR deney planı-3

12. Deney	**Referans Suş No (CECT & CBS Kodu)**	**Tür**	**Multiplex**
	CECT 2906	*Penicillium verrucosum*	Tricoplex 2
	CBS 190.72	*Penicillium verrucosum*	Tricoplex 2
	CECT 2320	*Penicillium viridicatum*	Tricoplex 2
	CBS 101034	*Penicillium viridicatum*	Tricoplex 2
	CBS 536.65	*Petromyces alliaceus*	Tricoplex 2
	CBS 511.69	*Petromyces alliaceus*	Tricoplex 2
	CECT 20262	*Phoma glomerata*	Tricoplex 2
	CECT 2774	*Rhizopus oryzae*	Tricoplex 2
	CECT 2672	*Rhizopus oryzae*	Tricoplex 2

	CECT 2344	*Rhizopus stolonifer*	Tricoplex 2
	CBS 263.28	*Rhizopus stolonifer var. stolonifer*	Tricoplex 2
	CECT 2984	*Scopulariopsis brevicaulis*	Tricoplex 2
	CECT 2985	*Scopulariopsis brevicaulis*	Tricoplex 2
	CBS 119.43	*Scopulariopsis flava*	Tricoplex 2
	CBS 207.61	*Scopulariopsis flava*	Tricoplex 2
	CBS 668.74	*Scopulariopsis fusca*	Tricoplex 2
	CBS 102829	*Scopulariopsis fusca*	Tricoplex 2
	CBS 114313	*Stachybotrys chartarum*	Tricoplex 2
	CBS 119366	*Stachybotrys chartarum*	Tricoplex 2
	CBS 235.94	*Talaromyces funiculosus*	Tricoplex 2
	CBS 117284	*Talaromyces islandicus*	Tricoplex 2
	CBS 250.56	*Talaromyces piceus*	Tricoplex 2
	CBS 350.61	*Talaromyces piceus*	Tricoplex 2
	CBS 100488	*Talaromyces radicus*	Tricoplex 2
	CBS 100489	*Talaromyces radicus*	Tricoplex 2
	CBS 101144	*Talaromyces ruber*	Tricoplex 2
	CBS 132700	*Talaromyces ruber*	Tricoplex 2
	CBS 371.48	*Talaromyces rugulosus*	Tricoplex 2
	CBS 111.64	*Talaromyces rugulosus*	Tricoplex 2
	CBS 193.69	*Talaromyces verruculosus*	Tricoplex 2
	CBS 624.72	*Talaromyces verruculosus*	Tricoplex 2
	CECT 2928	*Trichoderma harzianum*	Tricoplex 2
	CECT 2413	*Trichoderma harzianum*	Tricoplex 2
	CECT 2412	*Trichoderma longibrachiatum*	Tricoplex 2
	CECT 723	*Trichoderma longibrachiatum*	Tricoplex 2
	CECT 2460	*Trichoderma virens*	Tricoplex 2
	CECT 2410	*Trichothecium roseum*	Tricoplex 2
	CECT 20223	*Trichothecium roseum*	Tricoplex 2
	CECT 20820	*Wallemia sebi*	Tricoplex 2
	CBS 120010	*Wallemia sebi*	Tricoplex 2

Çizelge 25.'de verilen 40 hedef ile 1 negatif kontrol için 3 kez Real-Time PCR reaksiyonu kurulmuştur.

Çizelge 26. Tricoplex 1 kapsamında özgüllüğün belirlenmesine katkı sağlayan ekarte ettirici bakteri türleri ile yapılan Real-Time PCR deney planı

13. Deney	**SUŞ**	**Tür**	**Multiplex**
	BİLGİ YOK	*Acinetobacter baumannii*	Tricoplex 1
	BİLGİ YOK	*Bacteroides fragilis*	Tricoplex 1
	BİLGİ YOK	*Campylobacter jejuni*	Tricoplex 1
	BİLGİ YOK	*Clostridium perfringens*	Tricoplex 1

	BİLGİ YOK	*Enterobacter aerogenes*	Tricoplex 1
	BİLGİ YOK	*Enterococcus faecalis*	Tricoplex 1
	BİLGİ YOK	*Enterococcus faecium*	Tricoplex 1
	BİLGİ YOK	*Escherichia coli*	Tricoplex 1
	BİLGİ YOK	*Haemophilus influenzae*	Tricoplex 1
	BİLGİ YOK	*Klebsiella pneumonia*	Tricoplex 1
	BİLGİ YOK	*Listeria monocytogenes*	Tricoplex 1
	BİLGİ YOK	*Neisseria meningitidis*	Tricoplex 1
	BİLGİ YOK	*Proteus mirabilis*	Tricoplex 1
	BİLGİ YOK	*Pseudomonas aeruginosa*	Tricoplex 1
	BİLGİ YOK	*Salmonella enterica ssp. Enterica*	Tricoplex 1
	BİLGİ YOK	*Serratia marcescens*	Tricoplex 1
	BİLGİ YOK	*Staphylococcus aureus*	Tricoplex 1
	BİLGİ YOK	*Streptococcus agalactiae*	Tricoplex 1
	BİLGİ YOK	*Streptococcus dysgalactiae subspecies equisimilis*	Tricoplex 1
	BİLGİ YOK	*Streptococcus pneumoniae*	Tricoplex 1
	BİLGİ YOK	*Streptococcus pyogenes*	Tricoplex 1

Çizelge 26.'da verilen *Acinetobacter baumannii*, *Bacteroides fragilis*, *Campylobacter jejuni*, *Clostridium perfringens*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumonia*, *Listeria monocytogenes*, *Neisseria meningitidis*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica ssp. Enterica*, *Serratia marcescens*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae subspecies equisimilis*, *Streptococcus pneumoniae* ve *Streptococcus pyogenes* bakteri türleri özgüllük testlerinde 1 negatif kontrol ile birlikte Tricoplex 1 Multiplex Real-Time PCR reaksiyonlarında kullanılmıştır.

Çizelge 27. Tricoplex 2 kapsamında özgüllüğün belirlenmesine katkı sağlayan ekarte ettirici bakteri türleri ile yapılan Real-Time PCR deney planı

14. Deney	**SUŞ**	**Tür**	**Multiplex**
	BİLGİ YOK	*Acinetobacter baumannii*	Tricoplex 2
	BİLGİ YOK	*Bacteroides fragilis*	Tricoplex 2
	BİLGİ YOK	*Campylobacter jejuni*	Tricoplex 2
	BİLGİ YOK	*Clostridium perfringens*	Tricoplex 2
	BİLGİ YOK	*Enterobacter aerogenes*	Tricoplex 2
	BİLGİ YOK	*Enterococcus faecalis*	Tricoplex 2
	BİLGİ YOK	*Enterococcus faecium*	Tricoplex 2
	BİLGİ YOK	*Escherichia coli*	Tricoplex 2

	BİLGİ YOK	*Haemophilus influenzae*	Tricoplex 2
	BİLGİ YOK	*Klebsiella pneumonia*	Tricoplex 2
	BİLGİ YOK	*Listeria monocytogenes*	Tricoplex 2
	BİLGİ YOK	*Neisseria meningitidis*	Tricoplex 2
	BİLGİ YOK	*Proteus mirabilis*	Tricoplex 2
	BİLGİ YOK	*Pseudomonas aeruginosa*	Tricoplex 2
	BİLGİ YOK	*Salmonella enterica ssp. Enterica*	Tricoplex 2
	BİLGİ YOK	*Serratia marcescens*	Tricoplex 2
	BİLGİ YOK	*Staphylococcus aureus*	Tricoplex 2
	BİLGİ YOK	*Streptococcus agalactiae*	Tricoplex 2
	BİLGİ YOK	*Streptococcus dysgalactiae subspecies equisimilis*	Tricoplex 2
	BİLGİ YOK	*Streptococcus pneumoniae*	Tricoplex 2
	BİLGİ YOK	*Streptococcus pyogenes*	Tricoplex 2

Çizelge 27.'de verilen *Acinetobacter baumannii*, *Bacteroides fragilis*, *Campylobacter jejuni*, *Clostridium perfringens*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumonia*, *Listeria monocytogenes*, *Neisseria meningitidis*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica ssp. Enterica*, *Serratia marcescens*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae subspecies equisimilis*, *Streptococcus pneumoniae* ve *Streptococcus pyogenes* bakteri türleri özgüllük testlerinde 1 negatif kontrol ile birlikte Tricoplex 2 Multiplex Real-Time PCR reaksiyonlarında kullanılmıştır.

Geliştirilen kitin tespit limitinin (analitik duyarlılık) belirlenmesi açısından hedef suşlara 10^0-10^6 kopya mikrofungus/ml olacak biçimde seri dilüsyonlar yapılmış ve tasarlanan multiplex reaksiyonlara eklenmiştir. Negatif dilüsyondan hemen bir önce gelen pozitif sonuç tespit limiti olarak belirlenmiştir.

Çizelge 28. Tricoplex 1 ve Tricoplex 2 Multiplex Real-Time PCR reaksiyonlarının tespit limitlerinin belirlenmesi için oluşturulan PCR reaksiyon planı

Tricoplex 1 + *Trichophyton rubrum* 10^0	Tricoplex 1 + *Trichophyton tonsurans* 10^0	Tricoplex 1 + *Trichophyton verrucosum* 10^0
Tricoplex 1 + *Trichophyton rubrum* 10^1	Tricoplex 1 + *Trichophyton tonsurans* 10^1	Tricoplex 1 + *Trichophyton verrucosum* 10^1
Tricoplex 1 + *Trichophyton rubrum* 10^2	Tricoplex 1 + *Trichophyton tonsurans* 10^2	Tricoplex 1 + *Trichophyton verrucosum* 10^2
Tricoplex 1 + *Trichophyton rubrum* 10^3	Tricoplex 1 + *Trichophyton tonsurans* 10^3	Tricoplex 1 + *Trichophyton verrucosum* 10^3
Tricoplex 1 + *Trichophyton rubrum* 10^4	Tricoplex 1 + *Trichophyton tonsurans* 10^4	Tricoplex 1 + *Trichophyton verrucosum* 10^4

Tricoplex 1 + *Trichophyton rubrum* 10^5	Tricoplex 1 + *Trichophyton tonsurans* 10^5	Tricoplex 1 + *Trichophyton verrucosum* 10^5
Tricoplex 1 + *Trichophyton rubrum* 10^6	Tricoplex 1 + *Trichophyton tonsurans* 10^6	Tricoplex 1 + *Trichophyton verrucosum* 10^6
Tricoplex 2 + *Trichophyton violaceum* 10^0	Tricoplex 2 + *Trichophyton interdigitale* 10^0	Tricoplex 2 + *Trichophyton mentagrophytes* 10^0
Tricoplex 2 + *Trichophyton violaceum* 10^1	Tricoplex 2 + *Trichophyton interdigitale* 10^1	Tricoplex 2 + *Trichophyton mentagrophytes* 10^1
Tricoplex 2 + *Trichophyton violaceum* 10^2	Tricoplex 2 + *Trichophyton interdigitale* 10^2	Tricoplex 2 + *Trichophyton mentagrophytes* 10^2
Tricoplex 2 + *Trichophyton violaceum* 10^3	Tricoplex 2 + *Trichophyton interdigitale* 10^3	Tricoplex 2 + *Trichophyton mentagrophytes* 10^3
Tricoplex 2 + *Trichophyton violaceum* 10^4	Tricoplex 2 + *Trichophyton interdigitale* 10^4	Tricoplex 2 + *Trichophyton mentagrophytes* 10^4
Tricoplex 2 + *Trichophyton violaceum* 10^5	Tricoplex 2 + *Trichophyton interdigitale* 10^5	Tricoplex 2 + *Trichophyton mentagrophytes* 10^5
Tricoplex 2 + *Trichophyton violaceum* 10^6	Tricoplex 2 + *Trichophyton interdigitale* 10^6	Tricoplex 2 + *Trichophyton mentagrophytes* 10^6

3. 2. 9. Amplikonların Saflaştırılması

Elde edilen qPCR amplikonları, DNA dizi analizleri öncesinde primerler ve diğer qPCR bileşenleri Biospeedy® PCR ürün saflaştırma kiti kullanılarak temizlenmiştir. Kit protokolü kapsamında sırayla şu aşamalar uygulanmıştır;

1) PCR ürünleri mikrosantrifüj tüpüne alınmıştır.
2) Sonrasında üzerine 1. Aşamadaki toplam hacmin 3 katı hacimde bağlama tamponu eklenmiştir.
3) Devamında 10 saniye boyunca maksimum hız ile vortekslenmiştir.
4) İlk aşamadaki toplam hacmin seviyesi kadar 2-propanol solüsyonu eklenmiştir.
5) Devamında 10 saniye boyunca maksimum hız ile vortekslenmiştir.
6) DNA kolonu toplama tüpüne yerleştirilmiş ve hazırladığımız karışım DNA Kolonuna eklenmiştir.
7) 14.000 g'de 1 dakika santrifüjleme yapılmış ve toplama tüpündeki supernatant sıvı kısım atılmıştır.
8) DNA kolonuna 500 µl hacimde yıkama solüsyonu eklenmiş, 14.000 g'de santrifüjlenmiş ve toplama tüpündeki supernatant sıvı kısım atılmıştır.
9) İşlem devamında DNA kolonu 14.000 g'de 1 dakika boş olarak santrifüj edilmiş ve DNA kolonu yeni bir santrifüj tüpüne takılmıştır.
10) DNA kolonuna 50 µl hacimde elüsyon çözeltisi olarak MGW solüsyonu eklenmiş, 1 dakika süreyle oda sıcaklığında (15°C ile 25°C sıcaklık değerleri

arasında) inkübe edildikten sonra 14.000 g'de 1 dakika süreyle santrifüjlenmiş ve ilgili izolatlar kullanılıncaya kadar -20°C'de saklanmıştır.

3. 2. 10. Filogenetik Analizin Yapılması

Çalışma kapsamında saflaştırılan qPCR ürünleri Sanger dizileme yöntemi kullanılarak çift yönlü olarak dizilenmiştir. Elde edilen dizilere, DNA veri bankasında en çok benzerlik gösteren dizi bilgileri BLAST yazılımı (www.ncbi.nlm.nih.gov) kullanılarak belirlenmiştir. Bu şekilde hedef gen lokuslarının çoğaltılıp-çoğaltılmadığı bilgisi kontrol edilmiştir. Kümelenmeleri gösteren filogenetik ağaçlar, hem phenetic kapsamda yani yaşam formlarının üyeleri oldukları taksonlar arasındaki genel benzerliklere hem de cladistic kapsamda yani genetik olarak ortak bir ata soydan gelme durumları esas alınarak ve [Neighbour-Joining (filogenetik komşu katılım), maximum likelihood (filogenetik maksimum olasılık tahmini), maximum parsimony (filogenetik maksimum cimrilik), UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean=Aritmetik Ortalamalı Ağırlıklandırılmamış Çift Grup Yöntemi)] detayları dikkate alınarak Automatic Phylogenetic Tree Generator yazılımı (https://cran.r-project.org/web/packages/aptg/vignettes/aptg.html) kullanılarak elde edilmiştir.

BÖLÜM 4

SONUÇLAR

4. 1. Çalışmadaki Hedef Türlere Yapılan Multiplex Real-Time PCR Reaksiyonları Sonuçları

Çalışma kapsamında hedef olarak çalışılan *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton tonsurans* ile *Trichophyton verrucosum* dermatofit küf patojenlerini Tricoplex 1, *Trichophyton interdigitale*, *Trichophyon mentagrophytes* ile *Trichophyton violaceum* dermatofit küf patojenlerini Tricoplex 2 ismi verilen Multiplex Real-Time PCR reaksiyon kurguları olarak çalışılmıştır. Tasarlanan deneyler kapsamında elde edilen PCR reaksiyonları sonuçları Çizelge 29.'da gösterilmiştir.

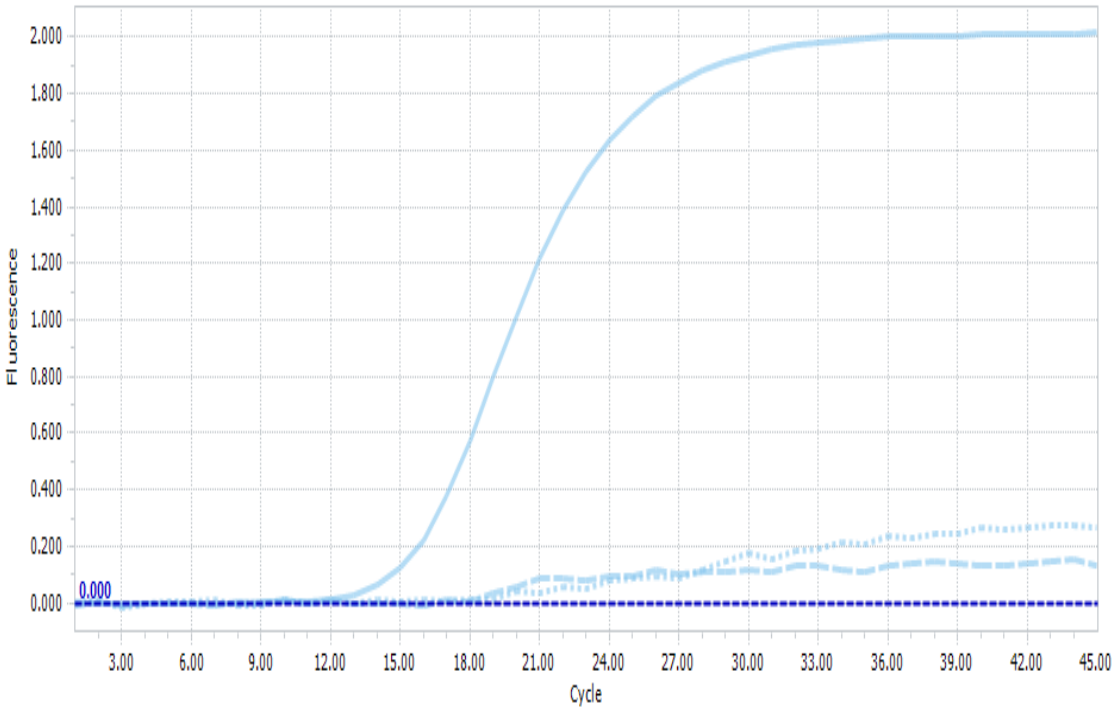
Çizelge 29. Tricoplex 1 ve Tricoplex 2 Multiplex Real-Time PCR reaksiyonları kapsamında çalışmadaki hedef *Trichophyton* türlerine yönelik uygulanan PCR sonuçları

Deney Sırası	Multiplex	Hedef Tür	Sonuç
1. Deney	Tricoplex 1	*Trichophyton rubrum*	+
	Tricoplex 2	*Trichophyton rubrum*	-
2. Deney	Tricoplex 1	*Trichophyton tonsurans*	+
	Tricoplex 2	*Trichophyton tonsurans*	-
3. Deney	Tricoplex 1	*Trichophyton verrucosum*	+
	Tricoplex 2	*Trichophyton verrucosum*	-
4. Deney	Tricoplex 1	*Trichophyton violaceum*	-
	Tricoplex 2	*Trichophyton violaceum*	+

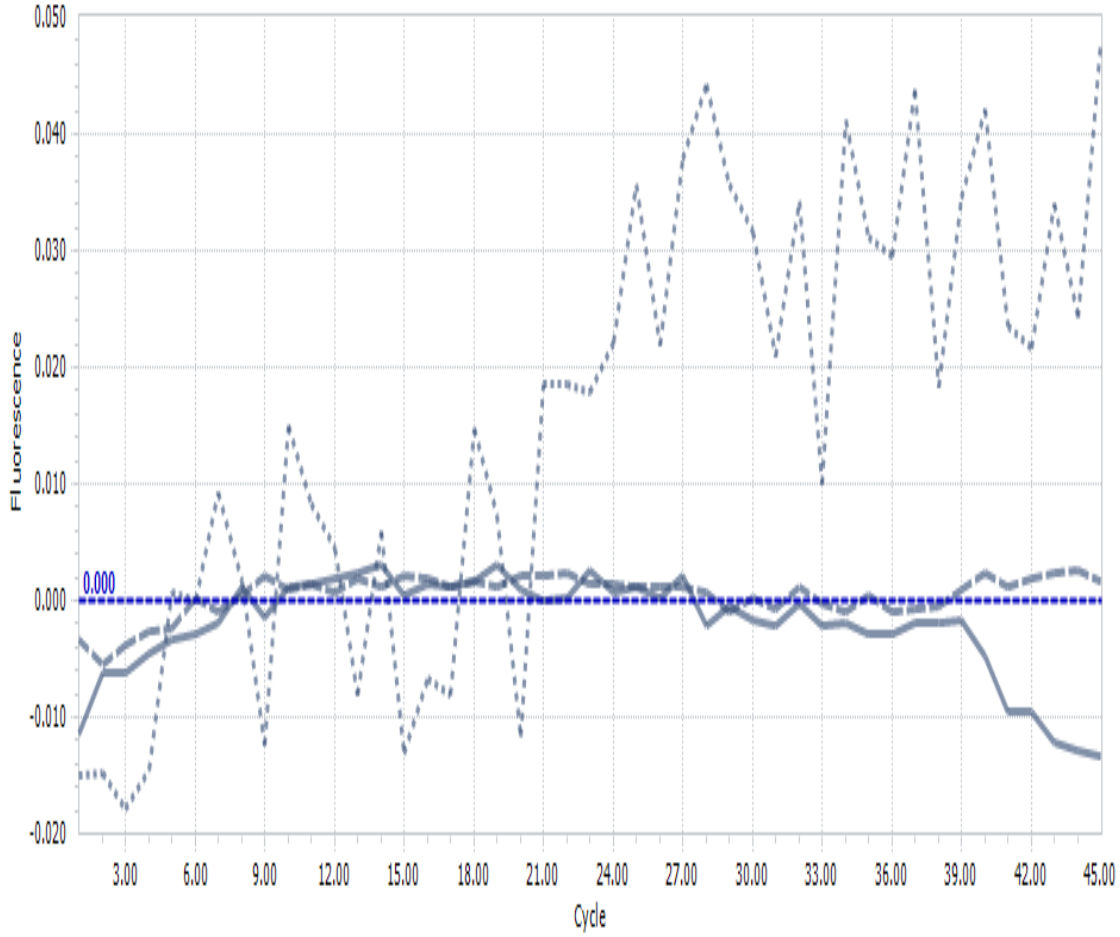
5. Deney	Tricoplex 1	*Trichophyton interdigitale*	-
	Tricoplex 2	*Trichophyton interdigitale*	+
6. Deney	Tricoplex 1	*Trichophyton mentagrophytes*	-
	Tricoplex 2	*Trichophyton mentagrophytes*	+

4. 1. 1. Multiplex Real-Time PCR Kapsamında 1. Deney Sonuçları

Bu deney kapsamında hazırlanan Tricoplex 1 ile Tricoplex 2 multiplex komplekslerine *Trichophyton rubrum* dermatofit patojenine ait genomik DNA molekülü eklenmiştir. Bu işlemlerin ardından Real-Time PCR reaksiyonları çalışılmıştır. Reaksiyonlarda PCR boyalarından FAM boyası ilgili hedef türe spesifik olan prob oligonükleotid dizisine atanmıştır ve bundan dolayı Tricoplex 1 kuyucuğunda FAM haricinde pozitif sigmoidal bir eğri tespit edilmemiştir (Şekil 4.1.1.1.). Tricoplex 2 kuyucuğu kapsamında *Trichophyton rubrum* dermatofit patojenini hedefleyen bir oligonükleotid dizisi seti olmadığından bu reaksiyona ait tüm eğriler negatif sonuçlar vermiştir (Şekil 4.1.1.2.). FAM PCR boyasında sigmoidal eğri, Cq=13,68 değerinde görülmüştür.



Şekil 4.1.1.1. Tricoplex 1 kapsamında *Trichophyton rubrum* dermatofit patojenine ait genomik DNA ile yapılan Multiplex Real-Time PCR sonucunun gösterilmesi.

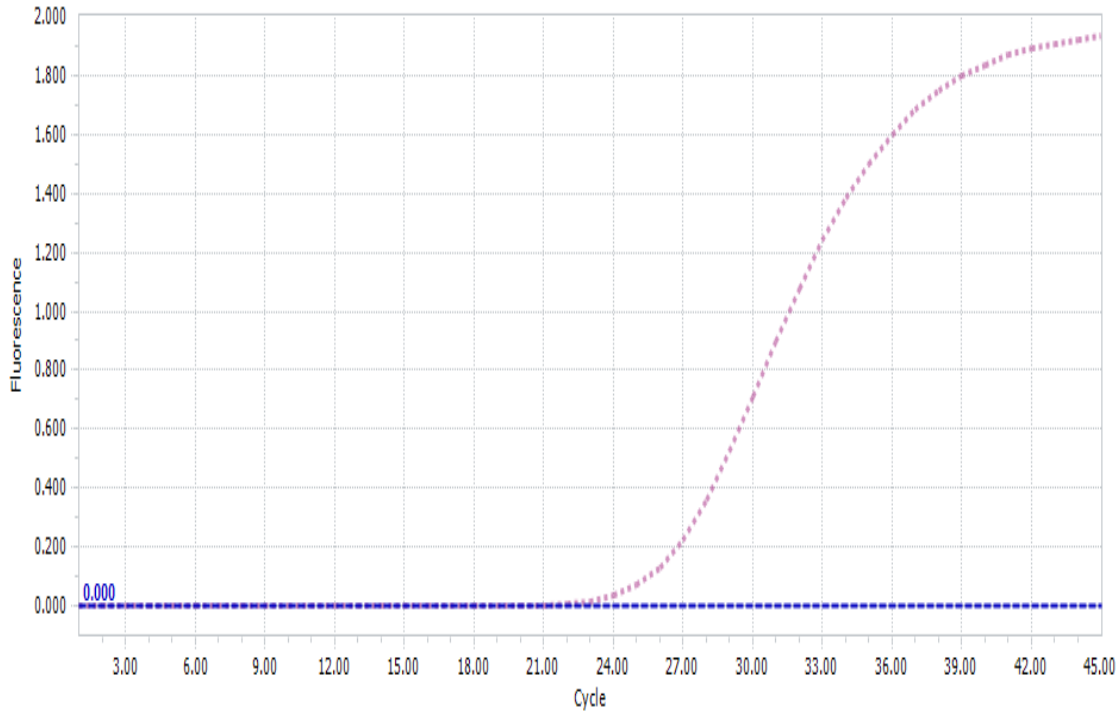


Şekil 4.1.1.2. Tricoplex 2 kapsamında *Trichophyton rubrum* dermatofit patojenine ait genomik DNA ile yapılan Multiplex Real-Time PCR sonucunun gösterilmesi.

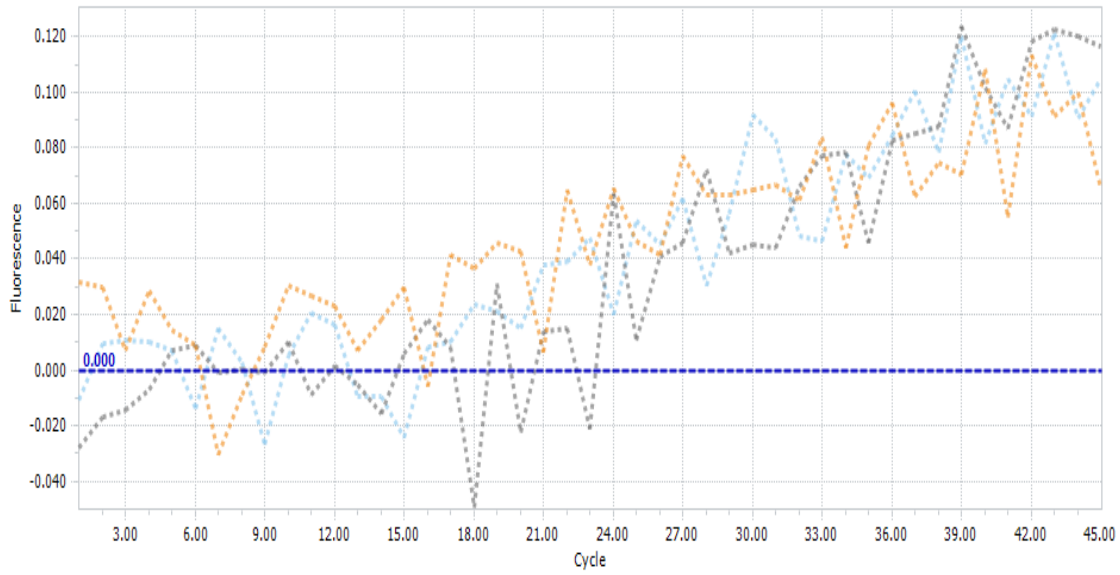
4. 1. 2. Multiplex Real-Time PCR Kapsamında 2. Deney Sonuçları

Bu deney kapsamında hazırlanan Tricoplex 1 ile Tricoplex 2 multiplex komplekslerine *Trichophyton tonsurans* dermatofit patojenine ait genomik DNA molekülü eklenmiştir. Bu işlemlerin ardından Real-Time PCR reaksiyonları çalışılmıştır. Reaksiyonlarda PCR boyalarından ROX boyası ilgili hedef türe spesifik olan prob oligonükleotid dizisine atanmıştır ve bundan dolayı Tricoplex 1 kuyucuğunda ROX haricinde pozitif sigmoidal bir eğri tespit edilmemiştir (Şekil 4.1.2.1.). Tricoplex 2 kuyucuğu kapsamında *Trichophyton tonsurans* dermatofit patojenini hedefleyen bir oligonükleotid dizisi seti olmadığından bu reaksiyona ait tüm eğriler negatif sonuçlar

vermiştir (Şekil 4.1.2.2.). ROX PCR boyasında sigmoidal eğri, Cq=24,50 değerinde görülmüştür.



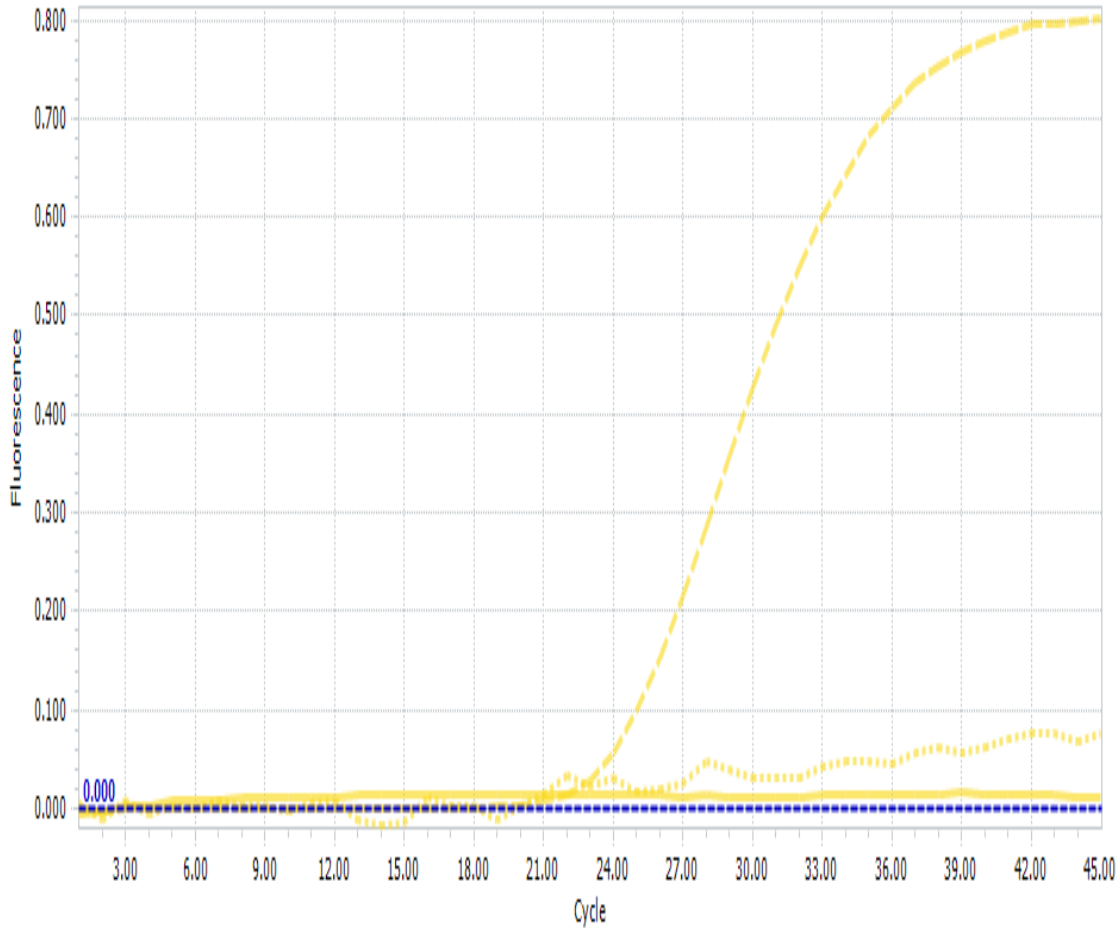
Şekil 4.1.2.1. Tricoplex 1 kapsamında *Trichophyton tonsurans* dermatofit patojenine ait genomik DNA ile yapılan Multiplex Real-Time PCR sonucunun gösterilmesi.



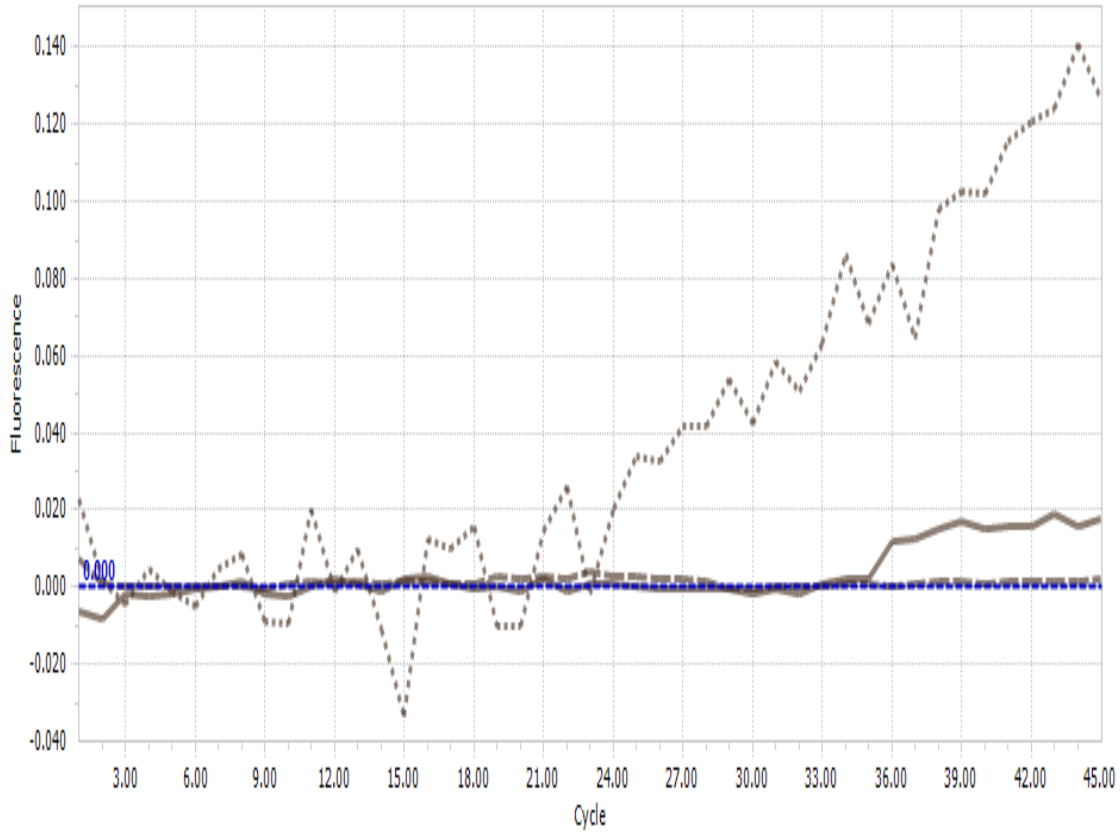
Şekil 4.1.2.2. Tricoplex 2 kapsamında *Trichophyton tonsurans* dermatofit patojenine ait genomik DNA ile yapılan Multiplex Real-Time PCR sonucunun gösterilmesi.

4. 1. 3. Multiplex Real-Time PCR Kapsamında 3. Deney Sonuçları

Bu deney kapsamında hazırlanan Tricoplex 1 ile Tricoplex 2 multiplex komplekslerine *Trichophyton verrucosum* dermatofit patojenine ait genomik DNA molekülü eklenmiştir. Bu işlemlerin ardından Real-Time PCR reaksiyonları çalışılmıştır. Reaksiyonlarda PCR boyalarından HEX boyası ilgili hedef türe spesifik olan prob oligonükleotid dizisine atanmıştır ve bundan dolayı Tricoplex 1 kuyucuğunda HEX haricinde pozitif sigmoidal bir eğri tespit edilmemiştir (Şekil 4.1.3.1.). Tricoplex 2 kuyucuğu kapsamında *Trichophyton verrucosum* dermatofit patojenini hedefleyen bir oligonükleotid dizisi seti olmadığından bu reaksiyona ait tüm eğriler negatif sonuçlar vermiştir (Şekil 4.1.3.2.). HEX PCR boyasında sigmoidal eğri, Cq=23,81 değerinde görülmüştür.



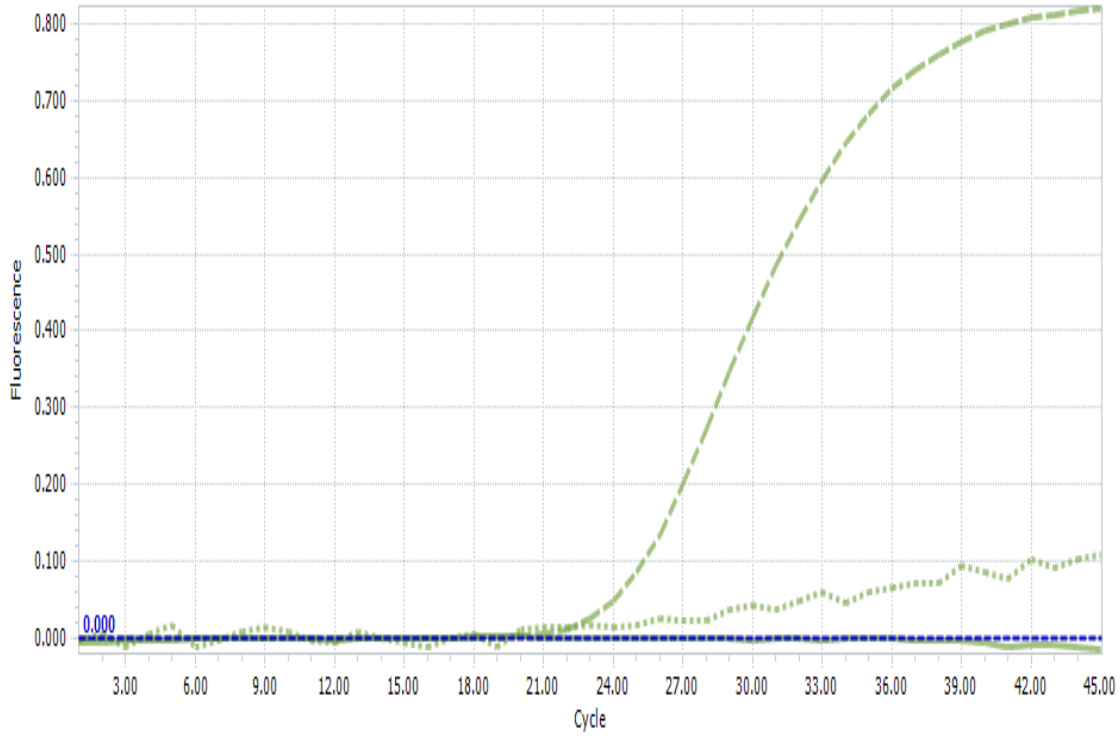
Şekil 4.1.3.1. Tricoplex 1 kapsamında *Trichophyton verrucosum* dermatofit patojenine ait genomik DNA ile yapılan Multiplex Real-Time PCR sonucunun gösterilmesi.



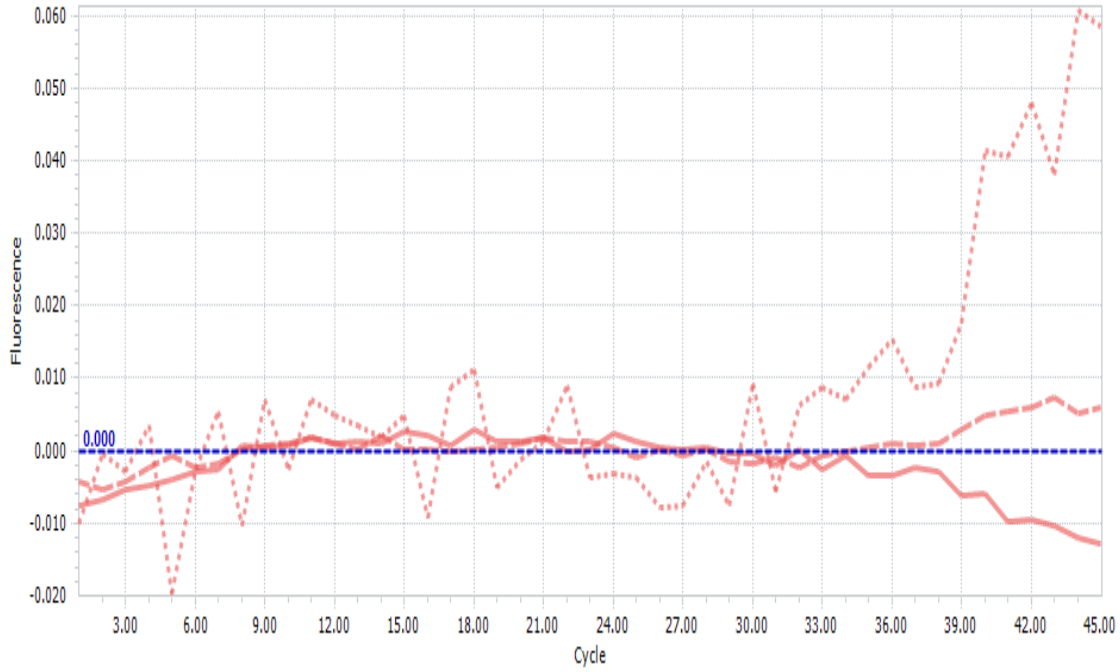
Şekil 4.1.3.2. Tricoplex 2 kapsamında *Trichophyton verrucosum* dermatofit patojenine ait genomik DNA ile yapılan Multiplex Real-Time PCR sonucunun gösterilmesi.

4. 1. 4. Multiplex Real-Time PCR Kapsamında 4. Deney Sonuçları

Bu deney kapsamında hazırlanan Tricoplex 1 ile Tricoplex 2 multiplex komplekslerine *Trichophyton violaceum* dermatofit patojenine ait genomik DNA molekülü eklenmiştir. Bu işlemlerin ardından Real-Time PCR reaksiyonları çalışılmıştır. Reaksiyonlarda PCR boyalarından HEX boyası ilgili hedef türe spesifik olan prob oligonükleotid dizisine atanmıştır ve bundan dolayı Tricoplex 2 kuyucuğunda HEX haricinde pozitif sigmoidal bir eğri tespit edilmemiştir (Şekil 4.1.4.1.). Tricoplex 1 kuyucuğu kapsamında *Trichophyton violaceum* dermatofit patojenini hedefleyen bir oligonükleotid dizisi seti olmadığından bu reaksiyona ait tüm eğriler negatif sonuçlar vermiştir (Şekil 4.1.4.2.). HEX PCR boyasında sigmoidal eğri, Cq=24,08 değerinde görülmüştür.



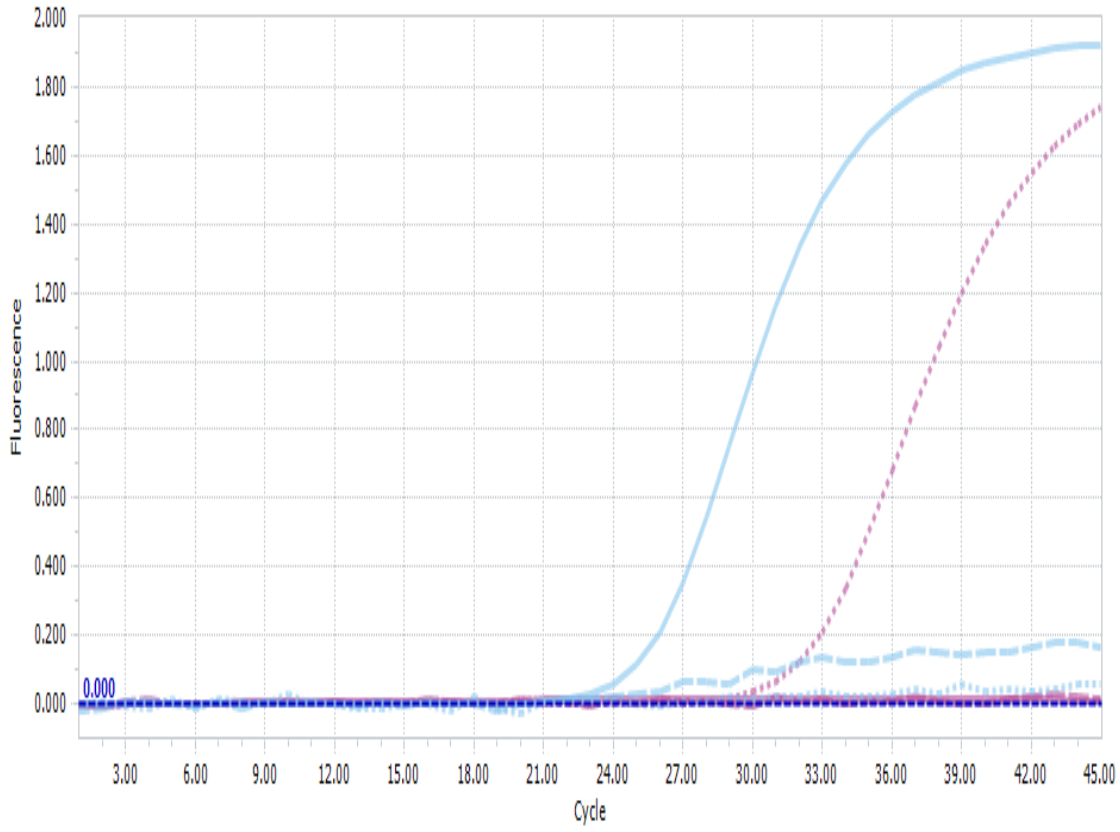
Şekil 4.1.4.1. Tricoplex 2 kapsamında *Trichophyton violaceum* dermatofit patojenine ait genomik DNA ile yapılan Multiplex Real-Time PCR sonucunun gösterilmesi.



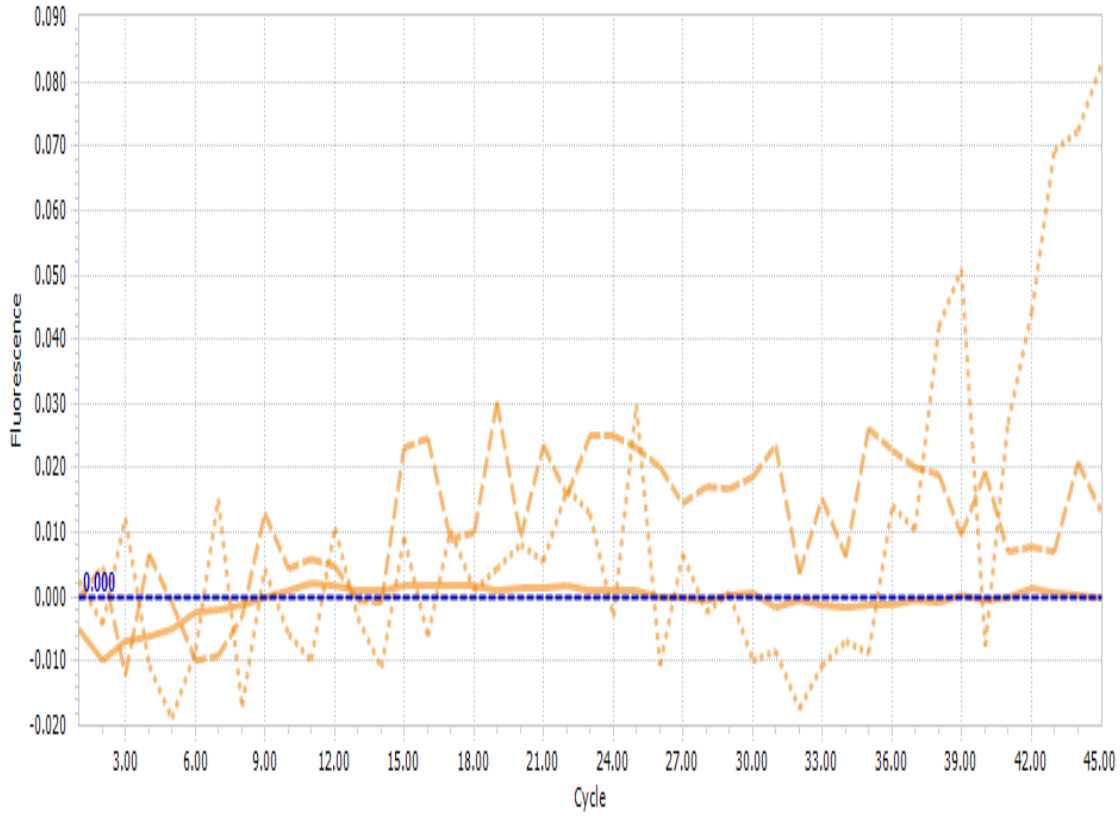
Şekil 4.1.4.2. Tricoplex 1 kapsamında *Trichophyton violaceum* dermatofit patojenine ait genomik DNA ile yapılan Multiplex Real-Time PCR sonucunun gösterilmesi.

4. 1. 5. Multiplex Real-Time PCR Kapsamında 5. Deney Sonuçları

Bu deney kapsamında hazırlanan Tricoplex 1 ile Tricoplex 2 multiplex komplekslerine *Trichophyton interdigitale* dermatofit patojenine ait genomik DNA molekülü eklenmiştir. Bu işlemlerin ardından Real-Time PCR reaksiyonları çalışılmıştır. *Trichophyton interdigitale* türüne spesifik olan prob oligonükleotid dizisine atanmış PCR boyası FAM olduğundan dolayı Tricoplex 2 kuyucuğunda FAM pozitif bir sigmoidal eğri oluşturmuş ve buna ek olarak bu deney kapsamında *Trichophyton mentagrophytes* türünü de oligonükleotid seti *Trichophyton interdigitale* türünü de tespit ettiği için ROX kanalında da pozitif bir sigmoidal eğri görülmüştür (Şekil 4.1.5.1.). Tricoplex 1 kuyucuğunda ise *Trichophyton interdigitale* dermatofit küf patojenini hedefleyen bir oligonükleotid serisi olmadığından tüm eğriler negatif sonuç vermiştir (Şekil 4.1.5.2.). FAM PCR boyasında sigmoidal eğri, Cq=23,76 değerinde iken ROX kanalının verdiği Cq değeri 30,61 olarak bulunmuştur.



Şekil 4.1.5.1. Tricoplex 2 kapsamında *Trichophyton interdigitale* dermatofit patojenine ait genomik DNA ile yapılan Multiplex Real-Time PCR sonucunun gösterilmesi.

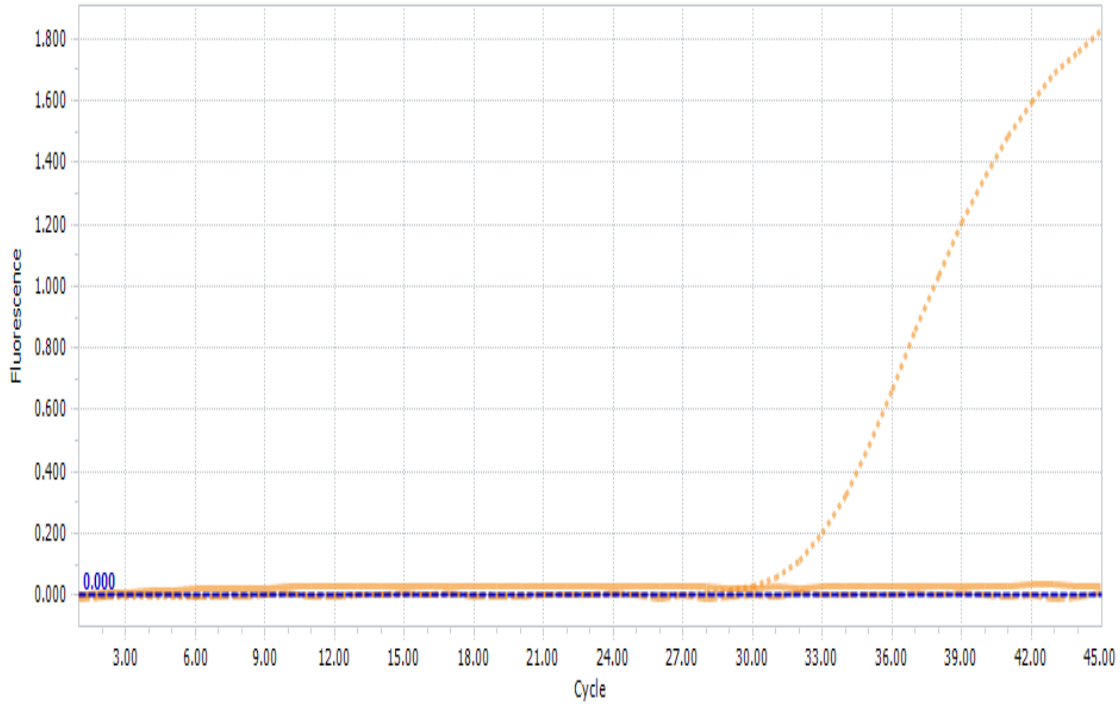


Şekil 4.1.5.2. Tricoplex 1 kapsamında *Trichophyton interdigitale* dermatofit patojenine ait genomik DNA ile yapılan Multiplex Real-Time PCR sonucunun gösterilmesi.

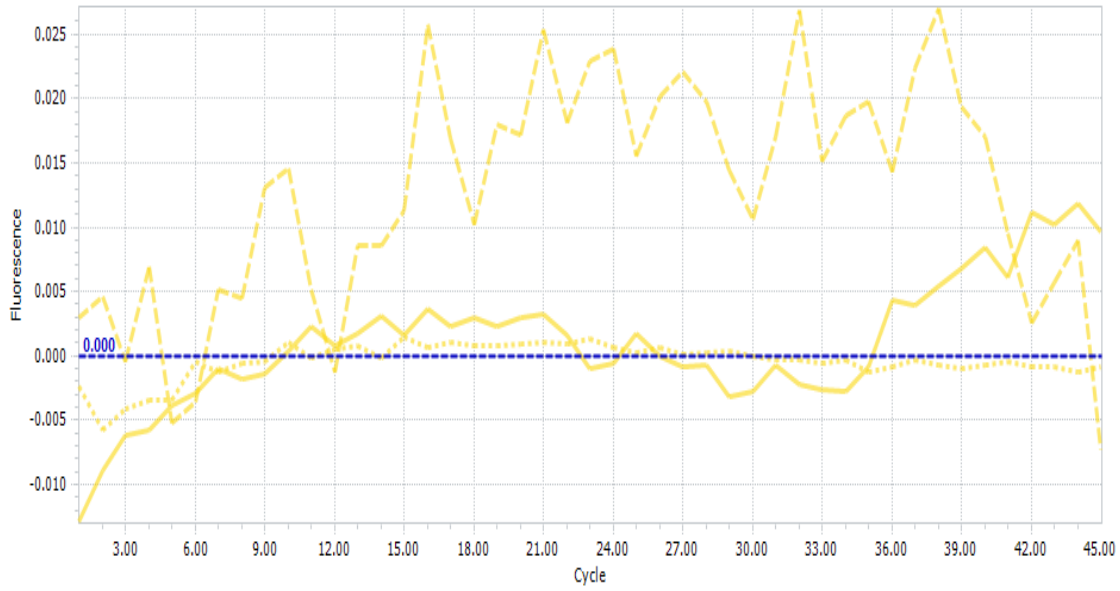
4. 1. 6. Multiplex Real-Time PCR Kapsamında 6. Deney Sonuçları

Bu deney kapsamında hazırlanan Tricoplex 1 ile Tricoplex 2 multiplex komplekslerine *Trichophyton mentagrophytes* dermatofit patojenine ait genomik DNA molekülü eklenmiştir. Bu işlemlerin ardından Real-Time PCR reaksiyonları çalışılmıştır. *Trichophyton mentagrophytes* türüne spesifik olan prob oligonükleotid dizisine atanmış PCR boyası ROX olduğundan dolayı Tricoplex 2 kuyucuğunda ROX pozitif bir sigmoidal eğri oluşturmuştur (Şekil 4.1.6.1.). Tricoplex 1 kuyucuğunda ise *Trichophyton mentagrophytes* dermatofit küf patojenini hedefleyen bir oligonükleotid serisi olmadığından tüm eğriler negatif sonuç vermiştir (Şekil 4.1.6.2.). Çalışılan örneğin Tricoplex 2 ile kurulan Multiplex Real-Time PCR reaksiyonu sonucunda FAM ile ROX kanalında pozitif sonuç kabul edebileceğimiz Cq değeri var ise *Trichophyton interdigitale* dermatofit küf patojeni olarak, sadece ROX kanalında pozitif sonuç kabul

edebileceğimiz Cq değeri var ise *Trichophyton mentagrophytes* dermatofit küf patojeni olarak yorumlanmıştır. ROX kanalının verdiği Cq değeri 30,74 olarak bulunmuştur.



Şekil 4.1.6.1. Tricoplex 2 kapsamında *Trichophyton mentagrophytes* dermatofit patojenine ait genomik DNA ile yapılan Multiplex Real-Time PCR sonucunun gösterilmesi.



Şekil 4.1.6.2. Tricoplex 1 kapsamında *Trichophyton mentagrophytes* dermatofit patojenine ait genomik DNA ile yapılan Multiplex Real-Time PCR sonucunun gösterilmesi.

4. 1. 7. Multiplex Real-Time PCR Kapsamında 7. Deney Sonuçları

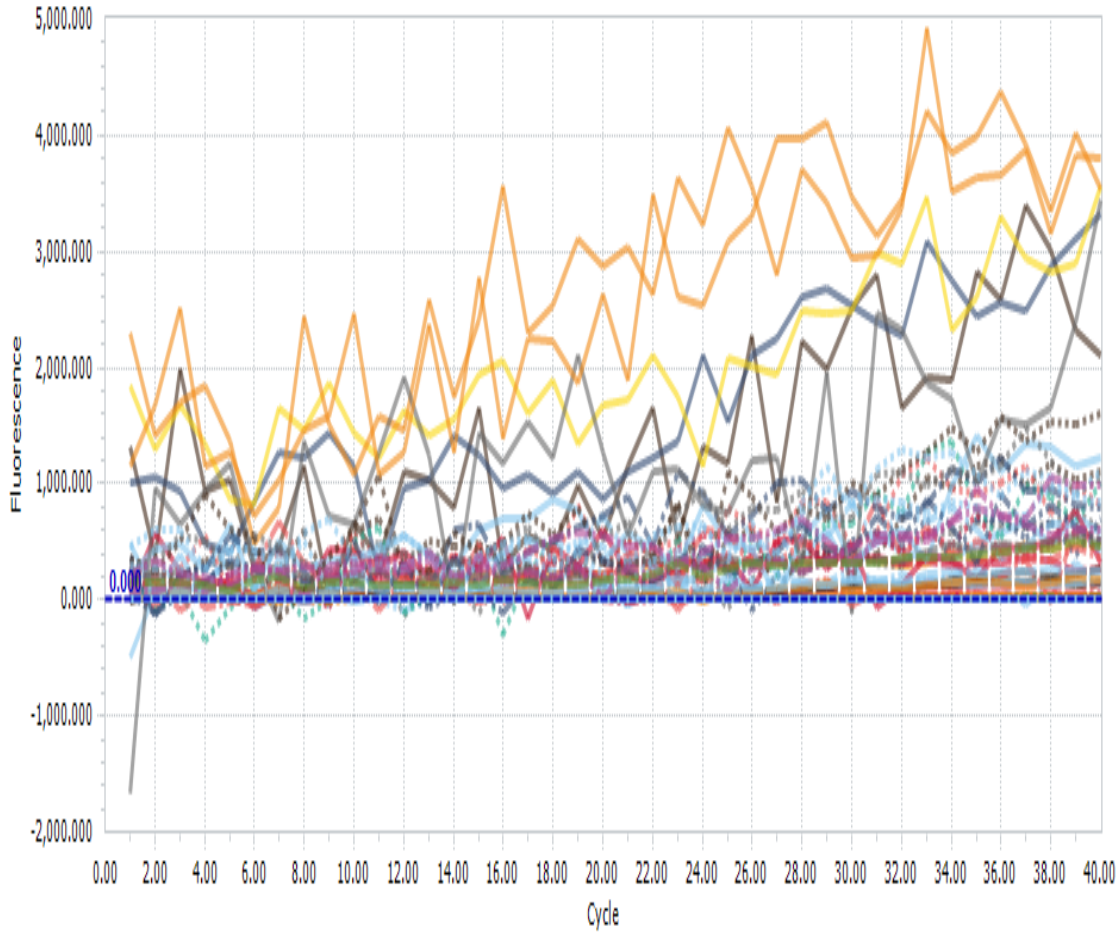
Bu deney kapsamında tasarlanan Tricoplex 1 multiplex primer dizilerinin özgüllükleri test edilmiştir. 96 kuyucuğu bulunan PCR plate platformuna 95 adet hedef olmayan veri tabanında mevcut olan referans fungal suş ile 1 adet negatif kontrol amaçlı olarak MGW solüsyonu katılımı gerçekleştirilmiştir. Multiplex Real-Time PCR reaksiyonu sonuçlarına göre Tricoplex 1 dahilinde olan ve *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton tonsurans* ile *Trichophyton verrucosum* dermatofit küf patojenlerini hedefleyen oligonükleotid dizilerinin Çizelge 30.'da belirtilmiş referans fungal suşlar ile çapraz reaksiyon vermediği belirlenmiştir (Şekil 4.1.7.1.).

Çizelge 30. Tricoplex 1 Multiplex Real-Time PCR reaksiyonları kapsamında özgüllük testleri için hedef olmayan referans fungal suşlar ile kurulan PCR sonuçları-1

7. Deney	**Referans Suş No (CECT & CBS Kodu)**	**Tür**	**Multiplex**	**Sonuç**
	CBS 116328	*Alternaria alternariae*	Tricoplex 1	-
	CBS 126989	*Alternaria alternariae*	Tricoplex 1	-
	CECT 20560	*Alternaria alternata*	Tricoplex 1	-
	CECT 20923	*Alternaria alternata*	Tricoplex 1	-
	CBS 747.68	*Alternaria atra*	Tricoplex 1	-
	CBS 101140	*Alternaria atra*	Tricoplex 1	-
	CBS 106.27	*Alternaria citri*	Tricoplex 1	-
	CBS 192.81	*Alternaria citri*	Tricoplex 1	-
	CBS 183.44	*Alternaria cucurbitae*	Tricoplex 1	-
	CBS 483.81	*Alternaria cucurbitae*	Tricoplex 1	-
	CBS 655.96	*Alternaria longipes*	Tricoplex 1	-
	CBS 917.96	*Alternaria longipes*	Tricoplex 1	-
	CBS 686.68	*Alternaria tenuissima*	Tricoplex 1	-
	CBS 880.95	*Alternaria tenuissima*	Tricoplex 1	-
	CBS 721.96	*Aspergillus aculeatus*	Tricoplex 1	-
	CBS 117783	*Aspergillus aculeatus*	Tricoplex 1	-
	CECT 2086	*Aspergillus carbonarius*	Tricoplex 1	-
	CECT 20384	*Aspergillus carbonarius*	Tricoplex 1	-
	CECT 2673	*Aspergillus clavatus*	Tricoplex 1	-
	CECT 2674	*Aspergillus clavatus*	Tricoplex 1	-
	CECT 2687	*Aspergillus flavus*	Tricoplex 1	-
	CECT 20802	*Aspergillus flavus*	Tricoplex 1	-
	CECT 20388	*Aspergillus foetidus var. acidus*	Tricoplex 1	-

	CECT 20389	*Aspergillus foetidus var. acidus*	Tricoplex 1	-
	CECT 2071	*Aspergillus fumigatus*	Tricoplex 1	-
	CECT 20827	*Aspergillus fumigatus*	Tricoplex 1	-
	CBS 117620	*Aspergillus minisclerotigenes*	Tricoplex 1	-
	CBS 117633	*Aspergillus minisclerotigenes*	Tricoplex 1	-
	CBS 115656	*Aspergillus neoniger*	Tricoplex 1	-
	CBS 115657	*Aspergillus neoniger*	Tricoplex 1	-
	CBS 129193	*Aspergillus nidulans*	Tricoplex 1	-
	CBS 126972	*Aspergillus nidulans*	Tricoplex 1	-
	CECT 2088	*Aspergillus niger*	Tricoplex 1	-
	CECT 20385	*Aspergillus niger*	Tricoplex 1	-
	CBS 260.88	*Aspergillus nomius*	Tricoplex 1	-
	CBS 123901	*Aspergillus nomius*	Tricoplex 1	-
	CECT 2093	*Aspergillus ochraceus*	Tricoplex 1	-
	CECT 2948	*Aspergillus ochraceus*	Tricoplex 1	-
	CECT 2094	*Aspergillus oryzae*	Tricoplex 1	-
	CECT 2095	*Aspergillus oryzae*	Tricoplex 1	-
	CECT 2680	*Aspergillus parasiticus*	Tricoplex 1	-
	CECT 2681	*Aspergillus parasiticus*	Tricoplex 1	-
	CBS 100929	*Aspergillus sojae*	Tricoplex 1	-
	CBS 100930	*Aspergillus sojae*	Tricoplex 1	-
	CECT 20399	*Aspergillus tamarii*	Tricoplex 1	-
	CBS 118098	*Aspergillus tamarii*	Tricoplex 1	-
	CECT 20365	*Aspergillus terreus*	Tricoplex 1	-
	CECT 20404	*Aspergillus terreus*	Tricoplex 1	-
	CECT 2575	*Aspergillus tubingensis*	Tricoplex 1	-
	CECT 20393	*Aspergillus tubingensis*	Tricoplex 1	-
	CBS 133.55	*Aspergillus ustus*	Tricoplex 1	-
	CBS 121617	*Aspergillus ustus*	Tricoplex 1	-
	CECT 2814	*Aspergillus versicolor*	Tricoplex 1	-
	CECT 2903	*Aspergillus versicolor*	Tricoplex 1	-
	CBS 112803	*Aspergillus westerdijkiae*	Tricoplex 1	-
	CBS 134398	*Aspergillus westerdijkiae*	Tricoplex 1	-
	CBS 105.40	*Chaetomium globosum*	Tricoplex 1	-
	CECT 2110	*Cladosporium cladosporioides*	Tricoplex 1	-
	CECT 20805	*Cladosporium cladosporioides*	Tricoplex 1	-
	CECT 2107	*Cladosporium cucumerinum*	Tricoplex 1	-
	CBS 177.54	*Cladosporium cucumerinum*	Tricoplex 1	-
	CECT 20904	*Cladosporium herbarum*	Tricoplex 1	-
	CBS 299.67	*Cladosporium macrocarpum*	Tricoplex 1	-
	CBS 121623	*Cladosporium macrocarpum*	Tricoplex 1	-
	CECT 20421	*Cladosporium oxysporum*	Tricoplex 1	-
	CBS 115324	*Cladosporium oxysporum*	Tricoplex 1	-

	CBS 122.47	*Cladosporium sphaerospermum*	Tricoplex 1	-
	CBS 117728	*Cladosporium sphaerospermum*	Tricoplex 1	-
	CBS 195.54	*Cladosporium variabile*	Tricoplex 1	-
	CBS 121635	*Cladosporium variabile*	Tricoplex 1	-
	CECT 2586	*Eurotium amstelodami*	Tricoplex 1	-
	CECT 20298	*Eurotium amstelodami*	Tricoplex 1	-
	CECT 20300	*Eurotium chevalieri*	Tricoplex 1	-
	CBS 121704	*Eurotium chevalieri*	Tricoplex 1	-
	CECT 2922	*Eurotium herbariorum=Eurotium pseudoglaucum=Aspergillus glaucus*	Tricoplex 1	-
	CBS 334.75	*Fusarium acuminatum*	Tricoplex 1	-
	CBS 102796	*Fusarium acuminatum*	Tricoplex 1	-
	CBS 239.94	*Fusarium avenaceum*	Tricoplex 1	-
	CECT 20493	*Fusarium culmorum*	Tricoplex 1	-
	CECT 20494	*Fusarium culmorum*	Tricoplex 1	-
	BİLGİ YOK	*Fusarium culmorum*	Tricoplex 1	-
	CBS 108944	*Fusarium dimerum var. dimerum*	Tricoplex 1	-
	CBS 110141	*Fusarium dimerum var. dimerum*	Tricoplex 1	-
	CECT 20925	*Fusarium equiseti*	Tricoplex 1	-
	CBS 185.31	*Fusarium equiseti*	Tricoplex 1	-
	CECT 20270	*Fusarium graminearum*	Tricoplex 1	-
	CECT 20924	*Fusarium graminearum*	Tricoplex 1	-
	CBS 123566	*Fusarium incarnatum*	Tricoplex 1	-
	CBS 132821	*Fusarium incarnatum*	Tricoplex 1	-
	CECT 20920	*Fusarium oxysporum*	Tricoplex 1	-
	CECT 20165	*Fusarium poae*	Tricoplex 1	-
	CECT 20569	*Fusarium proliferatum*	Tricoplex 1	-
	CECT 20546	*Fusarium proliferatum*	Tricoplex 1	-
	CBS 187.34	*Fusarium sambucinum*	Tricoplex 1	-
	CBS 146.95	*Fusarium sambucinum var. sambucinum*	Tricoplex 1	-



Şekil 4.1.7.1. Tricoplex 1 Multiplex Real-Time PCR reaksiyonları kapsamında Çizelge 30.'da verilen referans fungal suşlar ile kurulan PCR sonuçlarının gösterilmesi.

4. 1. 8. Multiplex Real-Time PCR Kapsamında 8. Deney Sonuçları

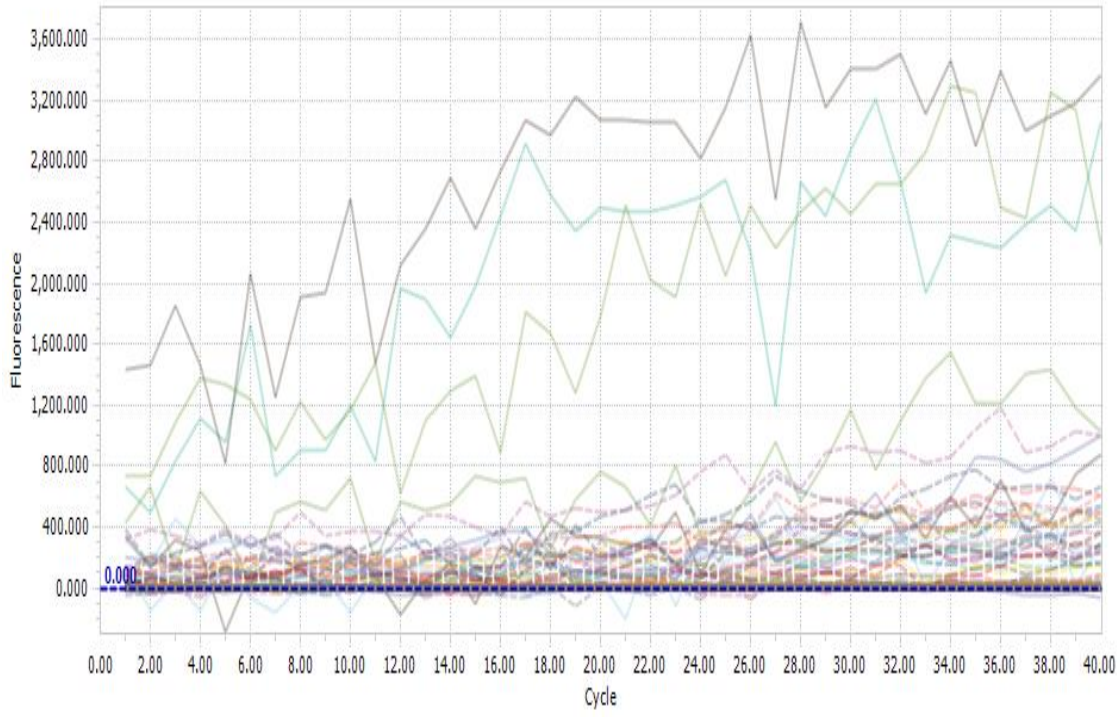
Bu deney kapsamında tasarlanan Tricoplex 1 multiplex primer dizilerinin özgüllükleri test edilmiştir. 96 kuyucuğu bulunan PCR plate platformuna 95 adet hedef olmayan veri tabanında mevcut olan referans fungal suş ile 1 adet negatif kontrol amaçlı olarak MGW solüsyonu katılımı gerçekleştirilmiştir. Multiplex Real-Time PCR reaksiyonu sonuçlarına göre Tricoplex 1 dahilinde olan ve *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton tonsurans* ile *Trichophyton verrucosum* dermatofit küf patojenlerini hedefleyen oligonükleotid dizilerinin Çizelge 31.'de belirtilmiş referans fungal suşlar ile çapraz reaksiyon vermediği belirlenmiştir (Şekil 4.1.8.1.).

Çizelge 31. Tricoplex 1 Multiplex Real-Time PCR reaksiyonları kapsamında özgüllük testleri için hedef olmayan referans fungal suşlar ile kurulan PCR sonuçları-2

8. Deney	**Referans Suş No (CECT & CBS Kodu)**	**Tür**	**Multiplex**	**Sonuç**
	CECT 20232	*Fusarium solani*	Tricoplex 1	-
	CBS 115323	*Fusarium solani*	Tricoplex 1	-
	CECT 20166	*Fusarium sporotrichioides*	Tricoplex 1	-
	CBS 115700	*Fusarium sporotrichioides var. sporotrichioides*	Tricoplex 1	-
	CBS 215.76	*Fusarium subglutinans*	Tricoplex 1	-
	CBS 119831	*Fusarium subglutinans*	Tricoplex 1	-
	CECT 20150	*Fusarium tricinctum*	Tricoplex 1	-
	CBS 253.50	*Fusarium tricinctum*	Tricoplex 1	-
	CECT 20926	*Fusarium verticillioides*	Tricoplex 1	-
	CBS 114579	*Fusarium verticillioides*	Tricoplex 1	-
	CBS 213.73	*Graphiopsis chlorocephala*	Tricoplex 1	-
	CBS 100405	*Graphiopsis chlorocephala*	Tricoplex 1	-
	CBS 285.64	*Microascus manginii*	Tricoplex 1	-
	CBS 254.69	*Microascus manginii*	Tricoplex 1	-
	CECT 20765	*Mucor circinelloides*	Tricoplex 1	-
	CBS 120584	*Mucor circinelloides f. circinelloides*	Tricoplex 1	-
	CECT 2653	*Mucor mucedo*	Tricoplex 1	-
	CBS 640.67	*Mucor mucedo*	Tricoplex 1	-
	CECT 20422	*Mucor plumbeus*	Tricoplex 1	-
	CECT 20552	*Mucor plumbeus*	Tricoplex 1	-
	CECT 2670	*Mucor racemosus*	Tricoplex 1	-
	CECT 20821	*Mucor racemosus*	Tricoplex 1	-
	CBS 544.65	*Neosartorya fischeri*	Tricoplex 1	-
	CBS 832.88	*Neosartorya fischeri*	Tricoplex 1	-
	CECT 2983	*Paecilomyces variotii*	Tricoplex 1	-
	CECT 20360	*Paecilomyces variotii*	Tricoplex 1	-
	CBS 109575	*Penicillium aethiopicum*	Tricoplex 1	-
	CBS 109602	*Penicillium aethiopicum*	Tricoplex 1	-
	CBS 291.48	*Penicillium atramentosum*	Tricoplex 1	-
	CBS 243.73	*Penicillium atramentosum*	Tricoplex 1	-
	CECT 20226	*Penicillium aurantiogriseum*	Tricoplex 1	-
	CBS 253.55	*Penicillium brasilianum*	Tricoplex 1	-
	CBS 334.74	*Penicillium brasilianum*	Tricoplex 1	-
	CECT 2316	*Penicillium brevicompactum*	Tricoplex 1	-
	CECT 20227	*Penicillium brevicompactum*	Tricoplex 1	-
	CECT 2267	*Penicillium camemberti*	Tricoplex 1	-

	CECT 20271	*Penicillium camemberti*	Tricoplex 1	-
	CBS 466.95	*Penicillium carneum*	Tricoplex 1	-
	CBS 112297	*Penicillium carneum*	Tricoplex 1	-
	CECT 2668	*Penicillium chrysogenum*	Tricoplex 1	-
	CECT 20273	*Penicillium chrysogenum*	Tricoplex 1	-
	CECT 20438	*Penicillium citreonigrum*	Tricoplex 1	-
	CECT 20426	*Penicillium citreonigrum*	Tricoplex 1	-
	CECT 20794	*Penicillium citrinum*	Tricoplex 1	-
	CECT 20822	*Penicillium citrinum*	Tricoplex 1	-
	CECT 20767	*Penicillium commune*	Tricoplex 1	-
	CBS 216.30	*Penicillium commune*	Tricoplex 1	-
	CECT 2270	*Penicillium corylophilum*	Tricoplex 1	-
	CECT 2273	*Penicillium corylophilum*	Tricoplex 1	-
	CBS 110074	*Penicillium crustosum*	Tricoplex 1	-
	CBS 110075	*Penicillium crustosum*	Tricoplex 1	-
	CBS 114.74	*Penicillium cyclopium*	Tricoplex 1	-
	CBS 101136	*Penicillium cyclopium*	Tricoplex 1	-
	CECT 2954	*Penicillium digitatum*	Tricoplex 1	-
	CECT 20795	*Penicillium digitatum*	Tricoplex 1	-
	CBS 474.84	*Penicillium discolor*	Tricoplex 1	-
	CBS 222.92	*Penicillium discolor*	Tricoplex 1	-
	CBS 347.97	*Penicillium echinulatum*	Tricoplex 1	-
	CBS 112289	*Penicillium echinulatum*	Tricoplex 1	-
	CECT 2278	*Penicillium expansum*	Tricoplex 1	-
	CECT 2280	*Penicillium expansum*	Tricoplex 1	-
	CBS 292.97	*Penicillium freii*	Tricoplex 1	-
	CBS 112022	*Penicillium freii*	Tricoplex 1	-
	CECT 2914	*Penicillium funiculosum*	Tricoplex 1	-
	CECT 20553	*Penicillium glabrum*	Tricoplex 1	-
	CECT 20826	*Penicillium glabrum*	Tricoplex 1	-
	CECT 2605	*Penicillium griseofulvum*	Tricoplex 1	-
	CECT 2919	*Penicillium griseofulvum*	Tricoplex 1	-
	CBS 135.41	*Penicillium hirsutum*	Tricoplex 1	-
	CBS 110099	*Penicillium hirsutum*	Tricoplex 1	-
	CECT 2762	*Penicillium islandicum*	Tricoplex 1	-
	CECT 20332	*Penicillium italicum*	Tricoplex 1	-
	CECT 2294	*Penicillium italicum*	Tricoplex 1	-
	CBS 110149	*Penicillium melanoconidium*	Tricoplex 1	-
	CBS 115506	*Penicillium melanoconidium*	Tricoplex 1	-
	CBS 257.94	*Penicillium nalgiovense*	Tricoplex 1	-
	CBS 109608	*Penicillium nalgiovense*	Tricoplex 1	-
	CECT 20766	*Penicillium nordicum*	Tricoplex 1	-
	CBS 606.68	*Penicillium nordicum*	Tricoplex 1	-

	CBS 219.30	*Penicillium oxalicum*	Tricoplex 1	-
	CBS 838.96	*Penicillium oxalicum*	Tricoplex 1	-
	CBS 107.11	*Penicillium palitans*	Tricoplex 1	-
	CBS 112205	*Penicillium palitans*	Tricoplex 1	-
	CBS 101032	*Penicillium paneum*	Tricoplex 1	-
	CBS 114483	*Penicillium paneum*	Tricoplex 1	-
	CECT 20933	*Penicillium polonicum*	Tricoplex 1	-
	CECT 2918	*Penicillium polonicum*	Tricoplex 1	-
	CECT 20441	*Penicillium purpurogenum*	Tricoplex 1	-
	CECT 20436	*Penicillium purpurogenum*	Tricoplex 1	-
	CECT 2905	*Penicillium roqueforti*	Tricoplex 1	-
	CECT 20509	*Penicillium roqueforti*	Tricoplex 1	-
	CBS 343.59	*Penicillium sclerotigenum*	Tricoplex 1	-
	CBS 112566	*Penicillium sclerotigenum*	Tricoplex 1	-
	CECT 20818	*Penicillium solitum*	Tricoplex 1	-
	CBS 470.84	*Penicillium solitum*	Tricoplex 1	-



Şekil 4.1.8.1. Tricoplex 1 Multiplex Real-Time PCR reaksiyonları kapsamında Çizelge 31.'de verilen referans fungal suşlar ile kurulan PCR sonuçlarının gösterilmesi.

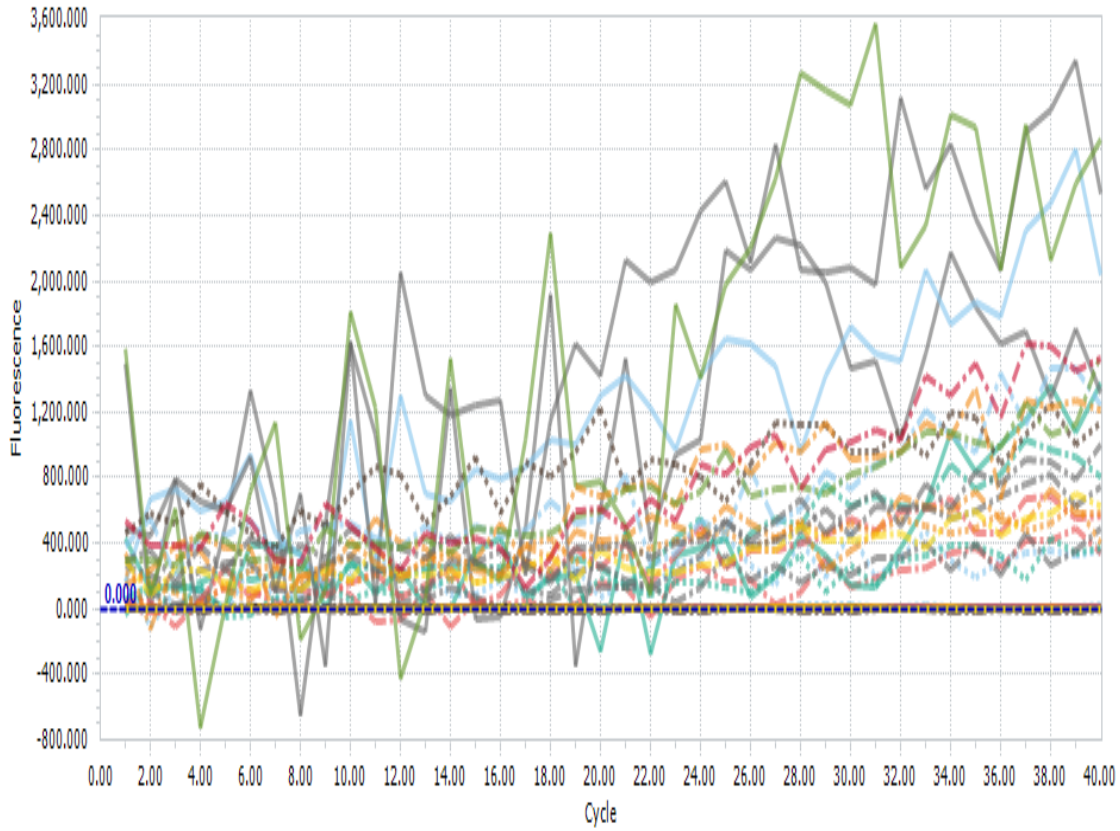
4. 1. 9. Multiplex Real-Time PCR Kapsamında 9. Deney Sonuçları

Bu deney kapsamında tasarlanan Tricoplex 1 multiplex primer dizilerinin özgüllükleri test edilmiştir. 96 kuyucuğu bulunan PCR plate platformuna 40 adet hedef olmayan veri tabanında mevcut olan referans fungal suş ile 1 adet negatif kontrol amaçlı olarak MGW solüsyonu katılımı gerçekleştirilmiştir. Multiplex Real-Time PCR reaksiyonu sonuçlarına göre Tricoplex 1 dahilinde olan ve *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton tonsurans* ile *Trichophyton verrucosum* dermatofit küf patojenlerini hedefleyen oligonükleotid dizilerinin Çizelge 32.'de belirtilmiş referans fungal suşlar ile çapraz reaksiyon vermediği belirlenmiştir (Şekil 4.1.9.1.).

Çizelge 32. Tricoplex 1 Multiplex Real-Time PCR reaksiyonları kapsamında özgüllük testleri için hedef olmayan referans fungal suşlar ile kurulan PCR sonuçları-3

9. Deney	**Referans Suş No (CECT & CBS Kodu)**	**Tür**	**Multiplex**	**Sonuç**
	CECT 2906	*Penicillium verrucosum*	Tricoplex 1	-
	CBS 190.72	*Penicillium verrucosum*	Tricoplex 1	-
	CECT 2320	*Penicillium viridicatum*	Tricoplex 1	-
	CBS 101034	*Penicillium viridicatum*	Tricoplex 1	-
	CBS 536.65	*Petromyces alliaceus*	Tricoplex 1	-
	CBS 511.69	*Petromyces alliaceus*	Tricoplex 1	-
	CECT 20262	*Phoma glomerata*	Tricoplex 1	-
	CECT 2774	*Rhizopus oryzae*	Tricoplex 1	-
	CECT 2672	*Rhizopus oryzae*	Tricoplex 1	-
	CECT 2344	*Rhizopus stolonifer*	Tricoplex 1	-
	CBS 263.28	*Rhizopus stolonifer var. stolonifer*	Tricoplex 1	-
	CECT 2984	*Scopulariopsis brevicaulis*	Tricoplex 1	-
	CECT 2985	*Scopulariopsis brevicaulis*	Tricoplex 1	-
	CBS 119.43	*Scopulariopsis flava*	Tricoplex 1	-
	CBS 207.61	*Scopulariopsis flava*	Tricoplex 1	-
	CBS 668.74	*Scopulariopsis fusca*	Tricoplex 1	-
	CBS 102829	*Scopulariopsis fusca*	Tricoplex 1	-
	CBS 114313	*Stachybotrys chartarum*	Tricoplex 1	-
	CBS 119366	*Stachybotrys chartarum*	Tricoplex 1	-
	CBS 235.94	*Talaromyces funiculosus*	Tricoplex 1	-
	CBS 117284	*Talaromyces islandicus*	Tricoplex 1	-
	CBS 250.56	*Talaromyces piceus*	Tricoplex 1	-
	CBS 350.61	*Talaromyces piceus*	Tricoplex 1	-

	CBS 100488	*Talaromyces radicus*	Tricoplex 1	-
	CBS 100489	*Talaromyces radicus*	Tricoplex 1	-
	CBS 101144	*Talaromyces ruber*	Tricoplex 1	-
	CBS 132700	*Talaromyces ruber*	Tricoplex 1	-
	CBS 371.48	*Talaromyces rugulosus*	Tricoplex 1	-
	CBS 111.64	*Talaromyces rugulosus*	Tricoplex 1	-
	CBS 193.69	*Talaromyces verruculosus*	Tricoplex 1	-
	CBS 624.72	*Talaromyces verruculosus*	Tricoplex 1	-
	CECT 2928	*Trichoderma harzianum*	Tricoplex 1	-
	CECT 2413	*Trichoderma harzianum*	Tricoplex 1	-
	CECT 2412	*Trichoderma longibrachiatum*	Tricoplex 1	-
	CECT 723	*Trichoderma longibrachiatum*	Tricoplex 1	-
	CECT 2460	*Trichoderma virens*	Tricoplex 1	-
	CECT 2410	*Trichothecium roseum*	Tricoplex 1	-
	CECT 20223	*Trichothecium roseum*	Tricoplex 1	-
	CECT 20820	*Wallemia sebi*	Tricoplex 1	-
	CBS 120010	*Wallemia sebi*	Tricoplex 1	-



Şekil 4.1.9.1. Tricoplex 1 Multiplex Real-Time PCR reaksiyonları kapsamında Çizelge 32.'de verilen referans fungal suşlar ile kurulan PCR sonuçlarının gösterilmesi.

4. 1. 10. Multiplex Real-Time PCR Kapsamında 10. Deney Sonuçları

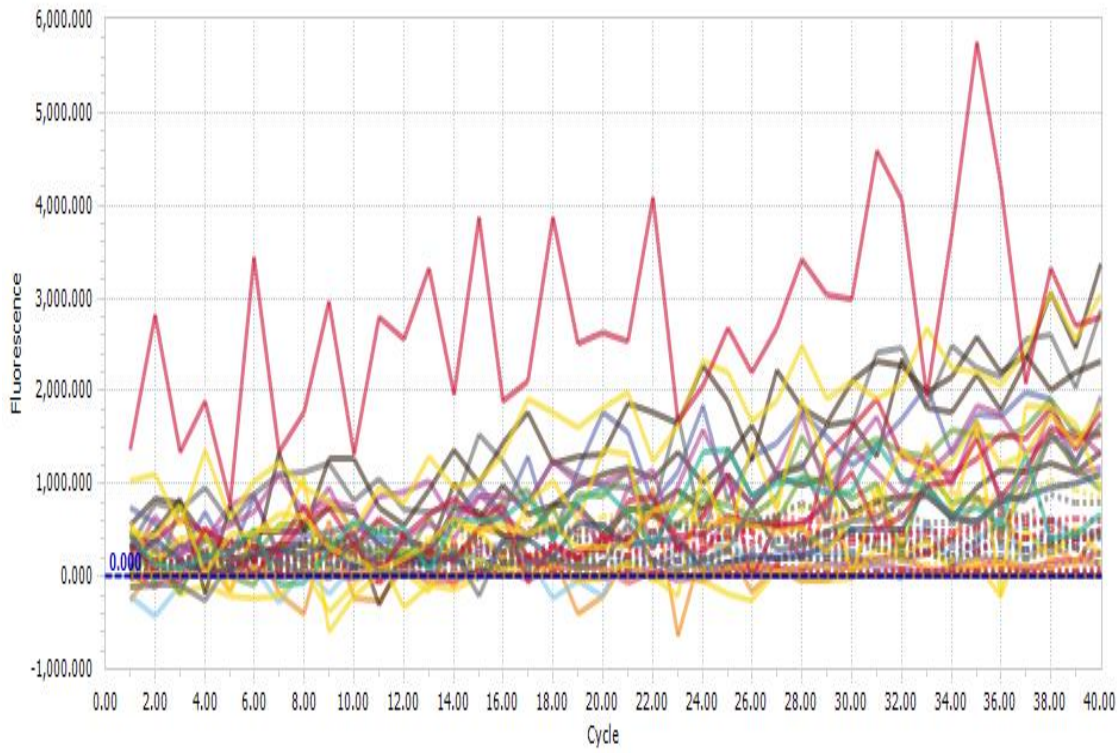
Bu deney kapsamında tasarlanan Tricoplex 2 multiplex primer dizilerinin özgüllükleri test edilmiştir. 96 kuyucuğu bulunan PCR plate platformuna 95 adet hedef olmayan veri tabanında mevcut olan referans fungal suş ile 1 adet negatif kontrol amaçlı olarak MGW solüsyonu katılımı gerçekleştirilmiştir. Multiplex Real-Time PCR reaksiyonu sonuçlarına göre Tricoplex 2 dahilinde olan ve *Trichophyton interdigitale*, *Trichophyton mentagrophytes* ile *Trichophyton violaceum* dermatofit küf patojenlerini hedefleyen oligonükleotid dizilerinin Çizelge 33.'de belirtilmiş referans fungal suşlar ile çapraz reaksiyon vermediği belirlenmiştir (Şekil 4.1.10.1.).

Çizelge 33. Tricoplex 2 Multiplex Real-Time PCR reaksiyonları kapsamında özgüllük testleri için hedef olmayan referans fungal suşlar ile kurulan PCR sonuçları-1

10. Deney	**Referans Suş No (CECT & CBS Kodu)**	**Tür**	**Multiplex**	**Sonuç**
	CBS 116328	*Alternaria alternariae*	Tricoplex 2	-
	CBS 126989	*Alternaria alternariae*	Tricoplex 2	-
	CECT 20560	*Alternaria alternata*	Tricoplex 2	-
	CECT 20923	*Alternaria alternata*	Tricoplex 2	-
	CBS 747.68	*Alternaria atra*	Tricoplex 2	-
	CBS 101140	*Alternaria atra*	Tricoplex 2	-
	CBS 106.27	*Alternaria citri*	Tricoplex 2	-
	CBS 192.81	*Alternaria citri*	Tricoplex 2	-
	CBS 183.44	*Alternaria cucurbitae*	Tricoplex 2	-
	CBS 483.81	*Alternaria cucurbitae*	Tricoplex 2	-
	CBS 655.96	*Alternaria longipes*	Tricoplex 2	-
	CBS 917.96	*Alternaria longipes*	Tricoplex 2	-
	CBS 686.68	*Alternaria tenuissima*	Tricoplex 2	-
	CBS 880.95	*Alternaria tenuissima*	Tricoplex 2	-
	CBS 721.96	*Aspergillus aculeatus*	Tricoplex 2	-
	CBS 117783	*Aspergillus aculeatus*	Tricoplex 2	-
	CECT 2086	*Aspergillus carbonarius*	Tricoplex 2	-
	CECT 20384	*Aspergillus carbonarius*	Tricoplex 2	-
	CECT 2673	*Aspergillus clavatus*	Tricoplex 2	-
	CECT 2674	*Aspergillus clavatus*	Tricoplex 2	-
	CECT 2687	*Aspergillus flavus*	Tricoplex 2	-
	CECT 20802	*Aspergillus flavus*	Tricoplex 2	-
	CECT 20388	*Aspergillus foetidus var. acidus*	Tricoplex 2	-

	CECT 20389	*Aspergillus foetidus var. acidus*	Tricoplex 2	-
	CECT 2071	*Aspergillus fumigatus*	Tricoplex 2	-
	CECT 20827	*Aspergillus fumigatus*	Tricoplex 2	-
	CBS 117620	*Aspergillus minisclerotigenes*	Tricoplex 2	-
	CBS 117633	*Aspergillus minisclerotigenes*	Tricoplex 2	-
	CBS 115656	*Aspergillus neoniger*	Tricoplex 2	-
	CBS 115657	*Aspergillus neoniger*	Tricoplex 2	-
	CBS 129193	*Aspergillus nidulans*	Tricoplex 2	-
	CBS 126972	*Aspergillus nidulans*	Tricoplex 2	-
	CECT 2088	*Aspergillus niger*	Tricoplex 2	-
	CECT 20385	*Aspergillus niger*	Tricoplex 2	-
	CBS 260.88	*Aspergillus nomius*	Tricoplex 2	-
	CBS 123901	*Aspergillus nomius*	Tricoplex 2	-
	CECT 2093	*Aspergillus ochraceus*	Tricoplex 2	-
	CECT 2948	*Aspergillus ochraceus*	Tricoplex 2	-
	CECT 2094	*Aspergillus oryzae*	Tricoplex 2	-
	CECT 2095	*Aspergillus oryzae*	Tricoplex 2	-
	CECT 2680	*Aspergillus parasiticus*	Tricoplex 2	-
	CECT 2681	*Aspergillus parasiticus*	Tricoplex 2	-
	CBS 100929	*Aspergillus sojae*	Tricoplex 2	-
	CBS 100930	*Aspergillus sojae*	Tricoplex 2	-
	CECT 20399	*Aspergillus tamarii*	Tricoplex 2	-
	CBS 118098	*Aspergillus tamarii*	Tricoplex 2	-
	CECT 20365	*Aspergillus terreus*	Tricoplex 2	-
	CECT 20404	*Aspergillus terreus*	Tricoplex 2	-
	CECT 2575	*Aspergillus tubingensis*	Tricoplex 2	-
	CECT 20393	*Aspergillus tubingensis*	Tricoplex 2	-
	CBS 133.55	*Aspergillus ustus*	Tricoplex 2	-
	CBS 121617	*Aspergillus ustus*	Tricoplex 2	-
	CECT 2814	*Aspergillus versicolor*	Tricoplex 2	-
	CECT 2903	*Aspergillus versicolor*	Tricoplex 2	-
	CBS 112803	*Aspergillus westerdijkiae*	Tricoplex 2	-
	CBS 134398	*Aspergillus westerdijkiae*	Tricoplex 2	-
	CBS 105.40	*Chaetomium globosum*	Tricoplex 2	-
	CECT 2110	*Cladosporium cladosporioides*	Tricoplex 2	-
	CECT 20805	*Cladosporium cladosporioides*	Tricoplex 2	-
	CECT 2107	*Cladosporium cucumerinum*	Tricoplex 2	-
	CBS 177.54	*Cladosporium cucumerinum*	Tricoplex 2	-
	CECT 20904	*Cladosporium herbarum*	Tricoplex 2	-
	CBS 299.67	*Cladosporium macrocarpum*	Tricoplex 2	-
	CBS 121623	*Cladosporium macrocarpum*	Tricoplex 2	-
	CECT 20421	*Cladosporium oxysporum*	Tricoplex 2	-
	CBS 115324	*Cladosporium oxysporum*	Tricoplex 2	-

	CBS 122.47	*Cladosporium sphaerospermum*	Tricoplex 2	-
	CBS 117728	*Cladosporium sphaerospermum*	Tricoplex 2	-
	CBS 195.54	*Cladosporium variabile*	Tricoplex 2	-
	CBS 121635	*Cladosporium variabile*	Tricoplex 2	-
	CECT 2586	*Eurotium amstelodami*	Tricoplex 2	-
	CECT 20298	*Eurotium amstelodami*	Tricoplex 2	-
	CECT 20300	*Eurotium chevalieri*	Tricoplex 2	-
	CBS 121704	*Eurotium chevalieri*	Tricoplex 2	-
	CECT 2922	*Eurotium herbariorum= Eurotium pseudoglaucum= Aspergillus glaucus*	Tricoplex 2	-
	CBS 334.75	*Fusarium acuminatum*	Tricoplex 2	-
	CBS 102796	*Fusarium acuminatum*	Tricoplex 2	-
	CBS 239.94	*Fusarium avenaceum*	Tricoplex 2	-
	CECT 20493	*Fusarium culmorum*	Tricoplex 2	-
	CECT 20494	*Fusarium culmorum*	Tricoplex 2	-
	BİLGİ YOK	*Fusarium culmorum*	Tricoplex 2	-
	CBS 108944	*Fusarium dimerum var. dimerum*	Tricoplex 2	-
	CBS 110141	*Fusarium dimerum var. dimerum*	Tricoplex 2	-
	CECT 20925	*Fusarium equiseti*	Tricoplex 2	-
	CBS 185.31	*Fusarium equiseti*	Tricoplex 2	-
	CECT 20270	*Fusarium graminearum*	Tricoplex 2	-
	CECT 20924	*Fusarium graminearum*	Tricoplex 2	-
	CBS 123566	*Fusarium incarnatum*	Tricoplex 2	-
	CBS 132821	*Fusarium incarnatum*	Tricoplex 2	-
	CECT 20920	*Fusarium oxysporum*	Tricoplex 2	-
	CECT 20165	*Fusarium poae*	Tricoplex 2	-
	CECT 20569	*Fusarium proliferatum*	Tricoplex 2	-
	CECT 20546	*Fusarium proliferatum*	Tricoplex 2	-
	CBS 187.34	*Fusarium sambucinum*	Tricoplex 2	-
	CBS 146.95	*Fusarium sambucinum var. sambucinum*	Tricoplex 2	-



Şekil 4.1.10.1. Tricoplex 2 Multiplex Real-Time PCR reaksiyonları kapsamında Çizelge 33.'de verilen referans fungal suşlar ile kurulan PCR sonuçlarının gösterilmesi.

4. 1. 11. Multiplex Real-Time PCR Kapsamında 11. Deney Sonuçları

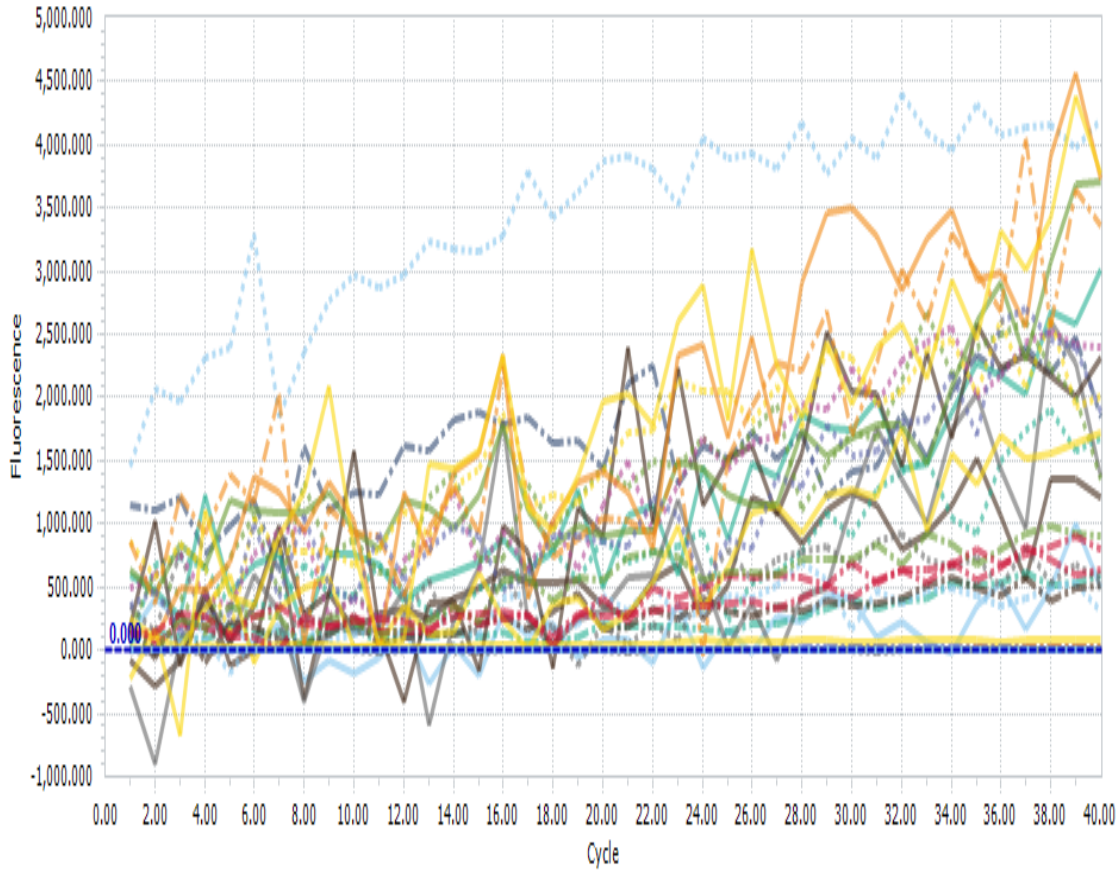
Bu deney kapsamında tasarlanan Tricoplex 2 multiplex primer dizilerinin özgüllükleri test edilmiştir. 96 kuyucuğu bulunan PCR plate platformuna 95 adet hedef olmayan veri tabanında mevcut olan referans fungal suş ile 1 adet negatif kontrol amaçlı olarak MGW solüsyonu katılımı gerçekleştirilmiştir. Multiplex Real-Time PCR reaksiyonu sonuçlarına göre Tricoplex 2 dahilinde olan ve *Trichophyton interdigitale*, *Trichophyton mentagrophytes* ile *Trichophyton violaceum* dermatofit küf patojenlerini hedefleyen oligonükleotid dizilerinin Çizelge 34.'de belirtilmiş referans fungal suşlar ile çapraz reaksiyon vermediği belirlenmiştir (Şekil 4.1.11.1.).

Çizelge 34. Tricoplex 2 Multiplex Real-Time PCR reaksiyonları kapsamında özgüllük testleri için hedef olmayan referans fungal suşlar ile kurulan PCR sonuçları-2

11. Deney	**Referans Suş No (CECT & CBS Kodu)**	**Tür**	**Multiplex**	**Sonuç**
	CECT 20232	*Fusarium solani*	Tricoplex 2	-
	CBS 115323	*Fusarium solani*	Tricoplex 2	-
	CECT 20166	*Fusarium sporotrichioides*	Tricoplex 2	-
	CBS 115700	*Fusarium sporotrichioides var. sporotrichioides*	Tricoplex 2	-
	CBS 215.76	*Fusarium subglutinans*	Tricoplex 2	-
	CBS 119831	*Fusarium subglutinans*	Tricoplex 2	-
	CECT 20150	*Fusarium tricinctum*	Tricoplex 2	-
	CBS 253.50	*Fusarium tricinctum*	Tricoplex 2	-
	CECT 20926	*Fusarium verticillioides*	Tricoplex 2	-
	CBS 114579	*Fusarium verticillioides*	Tricoplex 2	-
	CBS 213.73	*Graphiopsis chlorocephala*	Tricoplex 2	-
	CBS 100405	*Graphiopsis chlorocephala*	Tricoplex 2	-
	CBS 285.64	*Microascus manginii*	Tricoplex 2	-
	CBS 254.69	*Microascus manginii*	Tricoplex 2	-
	CECT 20765	*Mucor circinelloides*	Tricoplex 2	-
	CBS 120584	*Mucor circinelloides f. circinelloides*	Tricoplex 2	-
	CECT 2653	*Mucor mucedo*	Tricoplex 2	-
	CBS 640.67	*Mucor mucedo*	Tricoplex 2	-
	CECT 20422	*Mucor plumbeus*	Tricoplex 2	-
	CECT 20552	*Mucor plumbeus*	Tricoplex 2	-
	CECT 2670	*Mucor racemosus*	Tricoplex 2	-
	CECT 20821	*Mucor racemosus*	Tricoplex 2	-
	CBS 544.65	*Neosartorya fischeri*	Tricoplex 2	-
	CBS 832.88	*Neosartorya fischeri*	Tricoplex 2	-
	CECT 2983	*Paecilomyces variotii*	Tricoplex 2	-
	CECT 20360	*Paecilomyces variotii*	Tricoplex 2	-
	CBS 109575	*Penicillium aethiopicum*	Tricoplex 2	-
	CBS 109602	*Penicillium aethiopicum*	Tricoplex 2	-
	CBS 291.48	*Penicillium atramentosum*	Tricoplex 2	-
	CBS 243.73	*Penicillium atramentosum*	Tricoplex 2	-
	CECT 20226	*Penicillium aurantiogriseum*	Tricoplex 2	-
	CBS 253.55	*Penicillium brasilianum*	Tricoplex 2	-
	CBS 334.74	*Penicillium brasilianum*	Tricoplex 2	-
	CECT 2316	*Penicillium brevicompactum*	Tricoplex 2	-
	CECT 20227	*Penicillium brevicompactum*	Tricoplex 2	-
	CECT 2267	*Penicillium camemberti*	Tricoplex 2	-

	CECT 20271	*Penicillium camemberti*	Tricoplex 2	-
	CBS 466.95	*Penicillium carneum*	Tricoplex 2	-
	CBS 112297	*Penicillium carneum*	Tricoplex 2	-
	CECT 2668	*Penicillium chrysogenum*	Tricoplex 2	-
	CECT 20273	*Penicillium chrysogenum*	Tricoplex 2	-
	CECT 20438	*Penicillium citreonigrum*	Tricoplex 2	-
	CECT 20426	*Penicillium citreonigrum*	Tricoplex 2	-
	CECT 20794	*Penicillium citrinum*	Tricoplex 2	-
	CECT 20822	*Penicillium citrinum*	Tricoplex 2	-
	CECT 20767	*Penicillium commune*	Tricoplex 2	-
	CBS 216.30	*Penicillium commune*	Tricoplex 2	-
	CECT 2270	*Penicillium corylophilum*	Tricoplex 2	-
	CECT 2273	*Penicillium corylophilum*	Tricoplex 2	-
	CBS 110074	*Penicillium crustosum*	Tricoplex 2	-
	CBS 110075	*Penicillium crustosum*	Tricoplex 2	-
	CBS 114.74	*Penicillium cyclopium*	Tricoplex 2	-
	CBS 101136	*Penicillium cyclopium*	Tricoplex 2	-
	CECT 2954	*Penicillium digitatum*	Tricoplex 2	-
	CECT 20795	*Penicillium digitatum*	Tricoplex 2	-
	CBS 474.84	*Penicillium discolor*	Tricoplex 2	-
	CBS 222.92	*Penicillium discolor*	Tricoplex 2	-
	CBS 347.97	*Penicillium echinulatum*	Tricoplex 2	-
	CBS 112289	*Penicillium echinulatum*	Tricoplex 2	-
	CECT 2278	*Penicillium expansum*	Tricoplex 2	-
	CECT 2280	*Penicillium expansum*	Tricoplex 2	-
	CBS 292.97	*Penicillium freii*	Tricoplex 2	-
	CBS 112022	*Penicillium freii*	Tricoplex 2	-
	CECT 2914	*Penicillium funiculosum*	Tricoplex 2	-
	CECT 20553	*Penicillium glabrum*	Tricoplex 2	-
	CECT 20826	*Penicillium glabrum*	Tricoplex 2	-
	CECT 2605	*Penicillium griseofulvum*	Tricoplex 2	-
	CECT 2919	*Penicillium griseofulvum*	Tricoplex 2	-
	CBS 135.41	*Penicillium hirsutum*	Tricoplex 2	-
	CBS 110099	*Penicillium hirsutum*	Tricoplex 2	-
	CECT 2762	*Penicillium islandicum*	Tricoplex 2	-
	CECT 20332	*Penicillium italicum*	Tricoplex 2	-
	CECT 2294	*Penicillium italicum*	Tricoplex 2	-
	CBS 110149	*Penicillium melanoconidium*	Tricoplex 2	-
	CBS 115506	*Penicillium melanoconidium*	Tricoplex 2	-
	CBS 257.94	*Penicillium nalgiovense*	Tricoplex 2	-
	CBS 109608	*Penicillium nalgiovense*	Tricoplex 2	-
	CECT 20766	*Penicillium nordicum*	Tricoplex 2	-
	CBS 606.68	*Penicillium nordicum*	Tricoplex 2	-

	CBS 219.30	*Penicillium oxalicum*	Tricoplex 2	-
	CBS 838.96	*Penicillium oxalicum*	Tricoplex 2	-
	CBS 107.11	*Penicillium palitans*	Tricoplex 2	-
	CBS 112205	*Penicillium palitans*	Tricoplex 2	-
	CBS 101032	*Penicillium paneum*	Tricoplex 2	-
	CBS 114483	*Penicillium paneum*	Tricoplex 2	-
	CECT 20933	*Penicillium polonicum*	Tricoplex 2	-
	CECT 2918	*Penicillium polonicum*	Tricoplex 2	-
	CECT 20441	*Penicillium purpurogenum*	Tricoplex 2	-
	CECT 20436	*Penicillium purpurogenum*	Tricoplex 2	-
	CECT 2905	*Penicillium roqueforti*	Tricoplex 2	-
	CECT 20509	*Penicillium roqueforti*	Tricoplex 2	-
	CBS 343.59	*Penicillium sclerotigenum*	Tricoplex 2	-
	CBS 112566	*Penicillium sclerotigenum*	Tricoplex 2	-
	CECT 20818	*Penicillium solitum*	Tricoplex 2	-
	CBS 470.84	*Penicillium solitum*	Tricoplex 2	-



Şekil 4.1.11.1. Tricoplex 2 Multiplex Real-Time PCR reaksiyonları kapsamında Çizelge 34.'de verilen referans fungal suşlar ile kurulan PCR sonuçlarının gösterilmesi.

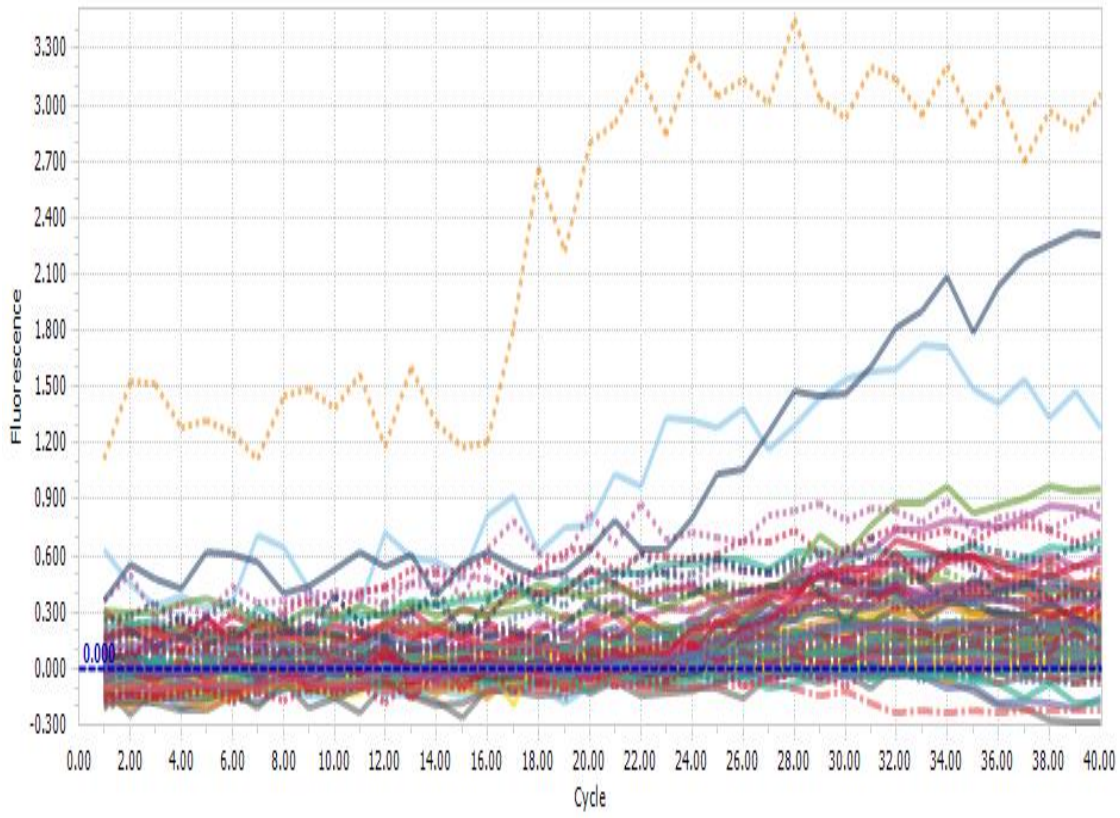
4. 1. 12. Multiplex Real-Time PCR Kapsamında 12. Deney Sonuçları

Bu deney kapsamında tasarlanan Tricoplex 2 multiplex primer dizilerinin özgüllükleri test edilmiştir. 96 kuyucuğu bulunan PCR plate platformuna 40 adet hedef olmayan veri tabanında mevcut olan referans fungal suş ile 1 adet negatif kontrol amaçlı olarak MGW solüsyonu katılımı gerçekleştirilmiştir. Multiplex Real-Time PCR reaksiyonu sonuçlarına göre Tricoplex 2 dahilinde olan ve *Trichophyton interdigitale*, *Trichophyton mentagrophytes* ile *Trichophyton violaceum* dermatofit küf patojenlerini hedefleyen oligonükleotid dizilerinin Çizelge 35.'de belirtilmiş referans fungal suşlar ile çapraz reaksiyon vermediği belirlenmiştir (Şekil 4.1.12.1.).

Çizelge 35. Tricoplex 2 Multiplex Real-Time PCR reaksiyonları kapsamında özgüllük testleri için hedef olmayan referans fungal suşlar ile kurulan PCR sonuçları-3

12. Deney	**Referans Suş No (CECT & CBS Kodu)**	**Tür**	**Multiplex**	**Sonuç**
	CECT 2906	*Penicillium verrucosum*	Tricoplex 2	-
	CBS 190.72	*Penicillium verrucosum*	Tricoplex 2	-
	CECT 2320	*Penicillium viridicatum*	Tricoplex 2	-
	CBS 101034	*Penicillium viridicatum*	Tricoplex 2	-
	CBS 536.65	*Petromyces alliaceus*	Tricoplex 2	-
	CBS 511.69	*Petromyces alliaceus*	Tricoplex 2	-
	CECT 20262	*Phoma glomerata*	Tricoplex 2	-
	CECT 2774	*Rhizopus oryzae*	Tricoplex 2	-
	CECT 2672	*Rhizopus oryzae*	Tricoplex 2	-
	CECT 2344	*Rhizopus stolonifer*	Tricoplex 2	-
	CBS 263.28	*Rhizopus stolonifer var. stolonifer*	Tricoplex 2	-
	CECT 2984	*Scopulariopsis brevicaulis*	Tricoplex 2	-
	CECT 2985	*Scopulariopsis brevicaulis*	Tricoplex 2	-
	CBS 119.43	*Scopulariopsis flava*	Tricoplex 2	-
	CBS 207.61	*Scopulariopsis flava*	Tricoplex 2	-
	CBS 668.74	*Scopulariopsis fusca*	Tricoplex 2	-
	CBS 102829	*Scopulariopsis fusca*	Tricoplex 2	-
	CBS 114313	*Stachybotrys chartarum*	Tricoplex 2	-
	CBS 119366	*Stachybotrys chartarum*	Tricoplex 2	-
	CBS 235.94	*Talaromyces funiculosus*	Tricoplex 2	-
	CBS 117284	*Talaromyces islandicus*	Tricoplex 2	-
	CBS 250.56	*Talaromyces piceus*	Tricoplex 2	-
	CBS 350.61	*Talaromyces piceus*	Tricoplex 2	-

	CBS 100488	*Talaromyces radicus*	Tricoplex 2	-
	CBS 100489	*Talaromyces radicus*	Tricoplex 2	-
	CBS 101144	*Talaromyces ruber*	Tricoplex 2	-
	CBS 132700	*Talaromyces ruber*	Tricoplex 2	-
	CBS 371.48	*Talaromyces rugulosus*	Tricoplex 2	-
	CBS 111.64	*Talaromyces rugulosus*	Tricoplex 2	-
	CBS 193.69	*Talaromyces verruculosus*	Tricoplex 2	-
	CBS 624.72	*Talaromyces verruculosus*	Tricoplex 2	-
	CECT 2928	*Trichoderma harzianum*	Tricoplex 2	-
	CECT 2413	*Trichoderma harzianum*	Tricoplex 2	-
	CECT 2412	*Trichoderma longibrachiatum*	Tricoplex 2	-
	CECT 723	*Trichoderma longibrachiatum*	Tricoplex 2	-
	CECT 2460	*Trichoderma virens*	Tricoplex 2	-
	CECT 2410	*Trichothecium roseum*	Tricoplex 2	-
	CECT 20223	*Trichothecium roseum*	Tricoplex 2	-
	CECT 20820	*Wallemia sebi*	Tricoplex 2	-
	CBS 120010	*Wallemia sebi*	Tricoplex 2	-



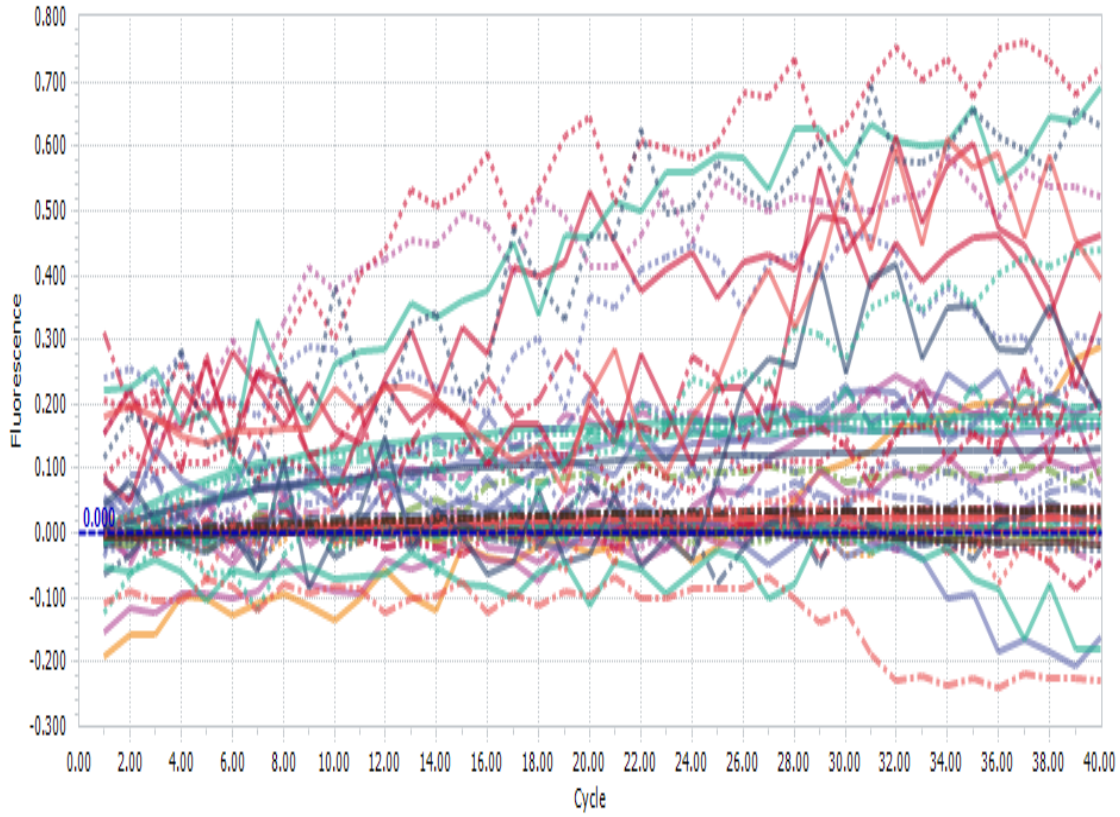
Şekil 4.1.12.1. Tricoplex 2 Multiplex Real-Time PCR reaksiyonları kapsamında Çizelge 35.'de verilen referans fungal suşlar ile kurulan PCR sonuçlarının gösterilmesi.

4. 1. 13. Multiplex Real-Time PCR Kapsamında 13. Deney Sonuçları

Bu deney kapsamında tasarlanan Tricoplex 1 multiplex primer dizilerinin özgüllükleri test edilmiştir. 96 kuyucuğu bulunan PCR plate platformuna 21 adet hedef olmayan veri tabanında mevcut olan referans bakteriyel suş ile 1 adet negatif kontrol amaçlı olarak MGW solüsyonu katılımı gerçekleştirilmiştir. Multiplex Real-Time PCR reaksiyonu sonuçlarına göre Tricoplex 1 dahilinde olan ve *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton tonsurans* ile *Trichophyton verrucosum* dermatofit küf patojenlerini hedefleyen oligonükleotid dizilerinin Çizelge 36.'da belirtilmiş referans bakteriyel suşlar ile çapraz reaksiyon vermediği belirlenmiştir (Şekil 4.1.13.1.).

Çizelge 36. Tricoplex 1 Multiplex Real-Time PCR reaksiyonları kapsamında özgüllük testleri için hedef olmayan referans bakteriyel suşlar ile kurulan PCR sonuçları

13. Deney	**SUŞ**	**Tür**	**Multiplex**	**Sonuç**
	BİLGİ YOK	*Acinetobacter baumannii*	Tricoplex 1	-
	BİLGİ YOK	*Bacteroides fragilis*	Tricoplex 1	-
	BİLGİ YOK	*Campylobacter jejuni*	Tricoplex 1	-
	BİLGİ YOK	*Clostridium perfringens*	Tricoplex 1	-
	BİLGİ YOK	*Enterobacter aerogenes*	Tricoplex 1	-
	BİLGİ YOK	*Enterococcus faecalis*	Tricoplex 1	-
	BİLGİ YOK	*Enterococcus faecium*	Tricoplex 1	-
	BİLGİ YOK	*Escherichia coli*	Tricoplex 1	-
	BİLGİ YOK	*Haemophilus influenzae*	Tricoplex 1	-
	BİLGİ YOK	*Klebsiella pneumoniae*	Tricoplex 1	-
	BİLGİ YOK	*Listeria monocytogenes*	Tricoplex 1	-
	BİLGİ YOK	*Neisseria meningitidis*	Tricoplex 1	-
	BİLGİ YOK	*Proteus mirabilis*	Tricoplex 1	-
	BİLGİ YOK	*Pseudomonas aeruginosa*	Tricoplex 1	-
	BİLGİ YOK	*Salmonella enterica ssp. Enterica*	Tricoplex 1	-
	BİLGİ YOK	*Serratia marcescens*	Tricoplex 1	-
	BİLGİ YOK	*Staphylococcus aureus*	Tricoplex 1	-
	BİLGİ YOK	*Streptococcus agalactiae*	Tricoplex 1	-
	BİLGİ YOK	*Streptococcus dysgalactiae subspecies equisimilis*	Tricoplex 1	-
	BİLGİ YOK	*Streptococcus pneumoniae*	Tricoplex 1	-
	BİLGİ YOK	*Streptococcus pyogenes*	Tricoplex 1	-



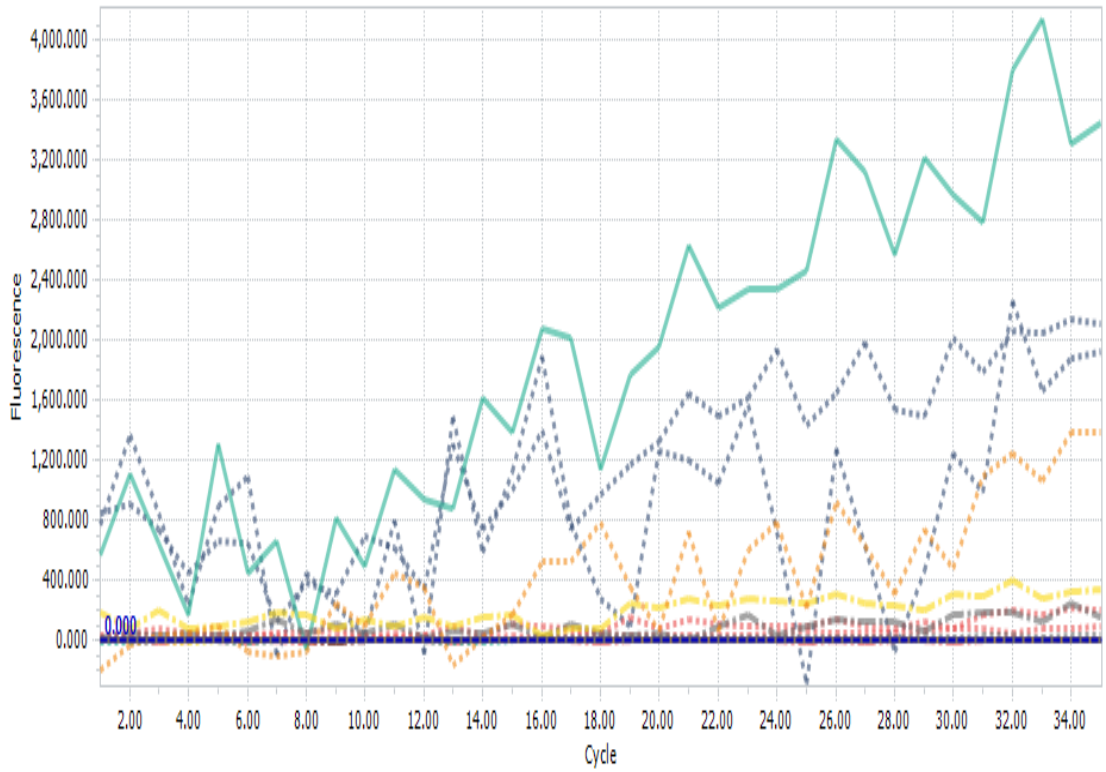
Şekil 4.1.13.1. Tricoplex 1 Multiplex Real-Time PCR reaksiyonları kapsamında Çizelge 36.'da verilen referans bakteriyel suşlar ile kurulan PCR sonuçlarının gösterilmesi.

4. 1. 14. Multiplex Real-Time PCR Kapsamında 14. Deney Sonuçları

Bu deney kapsamında tasarlanan Tricoplex 2 multiplex primer dizilerinin özgüllükleri test edilmiştir. 96 kuyucuğu bulunan PCR plate platformuna 21 adet hedef olmayan veri tabanında mevcut olan referans bakteriyel suş ile 1 adet negatif kontrol amaçlı olarak MGW solüsyonu katılımı gerçekleştirilmiştir. Multiplex Real-Time PCR reaksiyonu sonuçlarına göre Tricoplex 2 dahilinde olan ve *Trichophyton interdigitale*, *Trichophyton mentagrophytes* ile *Trichophyton violaceum* dermatofit küf patojenlerini hedefleyen oligonükleotid dizilerinin Çizelge 37.'de belirtilmiş referans bakteriyel suşlar ile çapraz reaksiyon vermediği belirlenmiştir (Şekil 4.1.14.1.).

Çizelge 37. Tricoplex 2 Multiplex Real-Time PCR reaksiyonları kapsamında özgüllük testleri için hedef olmayan referans bakteriyel suşlar ile kurulan PCR sonuçları

14. Deney	**SUŞ**	**Tür**	**Multiplex**	**Sonuç**
	BİLGİ YOK	*Acinetobacter baumannii*	Tricoplex 2	-
	BİLGİ YOK	*Bacteroides fragilis*	Tricoplex 2	-
	BİLGİ YOK	*Campylobacter jejuni*	Tricoplex 2	-
	BİLGİ YOK	*Clostridium perfringens*	Tricoplex 2	-
	BİLGİ YOK	*Enterobacter aerogenes*	Tricoplex 2	-
	BİLGİ YOK	*Enterococcus faecalis*	Tricoplex 2	-
	BİLGİ YOK	*Enterococcus faecium*	Tricoplex 2	-
	BİLGİ YOK	*Escherichia coli*	Tricoplex 2	-
	BİLGİ YOK	*Haemophilus influenzae*	Tricoplex 2	-
	BİLGİ YOK	*Klebsiella pneumoniae*	Tricoplex 2	-
	BİLGİ YOK	*Listeria monocytogenes*	Tricoplex 2	-
	BİLGİ YOK	*Neisseria meningitidis*	Tricoplex 2	-
	BİLGİ YOK	*Proteus mirabilis*	Tricoplex 2	-
	BİLGİ YOK	*Pseudomonas aeruginosa*	Tricoplex 2	-
	BİLGİ YOK	*Salmonella enterica ssp. Enterica*	Tricoplex 2	-
	BİLGİ YOK	*Serratia marcescens*	Tricoplex 2	-
	BİLGİ YOK	*Staphylococcus aureus*	Tricoplex 2	-
	BİLGİ YOK	*Streptococcus agalactiae*	Tricoplex 2	-
	BİLGİ YOK	*Streptococcus dysgalactiae subspecies equisimilis*	Tricoplex 2	-
	BİLGİ YOK	*Streptococcus pneumoniae*	Tricoplex 2	-
	BİLGİ YOK	*Streptococcus pyogenes*	Tricoplex 2	-



Şekil 4.1.14.1. Tricoplex 2 Multiplex Real-Time PCR reaksiyonları kapsamında Çizelge 37.'de verilen referans bakteriyel suşlar ile kurulan PCR sonuçlarının gösterilmesi.

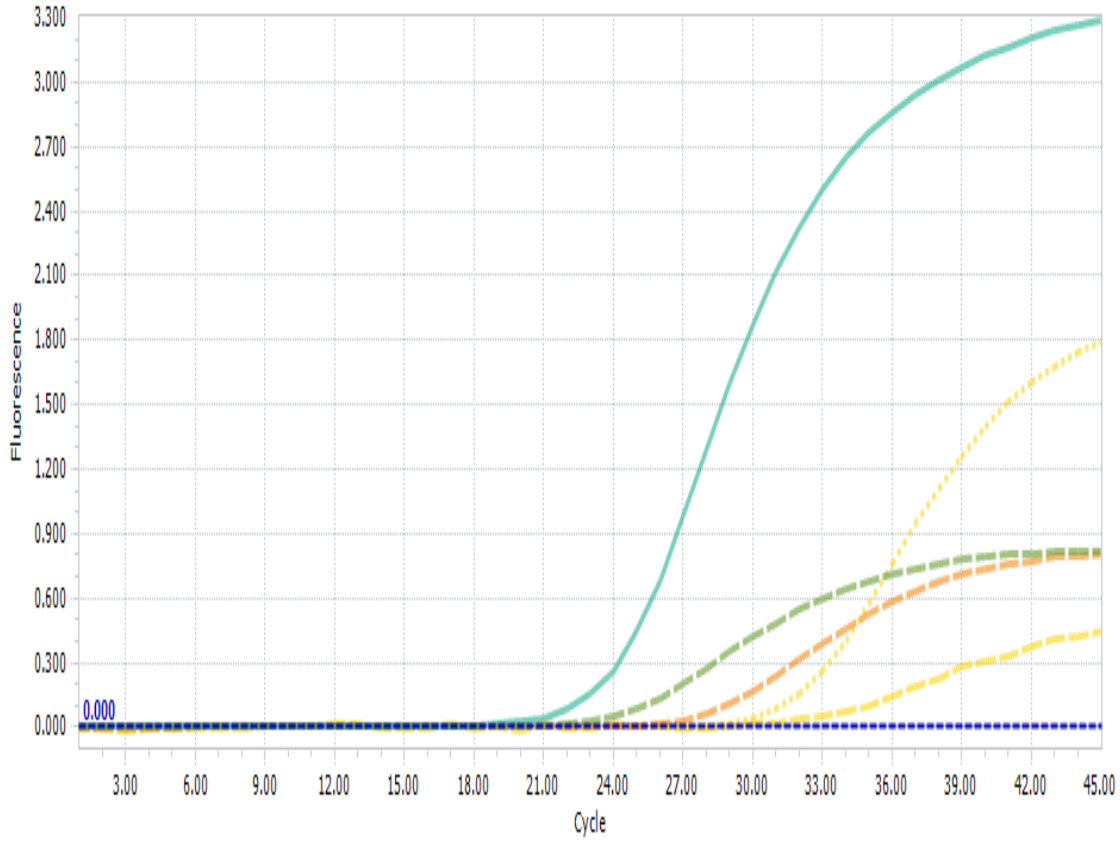
4. 2. Analitik Duyarlılık

Tasarlanıp geliştirilen sarflar ve ilgili yöntemin analitik duyarlılığı kapsamları, standart suşların seyreltmeleri ile oluşturulan 10^0-10^6 hacimsel kopya mikrofungus/ml normları kullanılarak belirlenmiştir.

Çizelge 38. Seri seyreltmelerin Tricoplex 1 Multiplex Real-Time PCR sonuçları

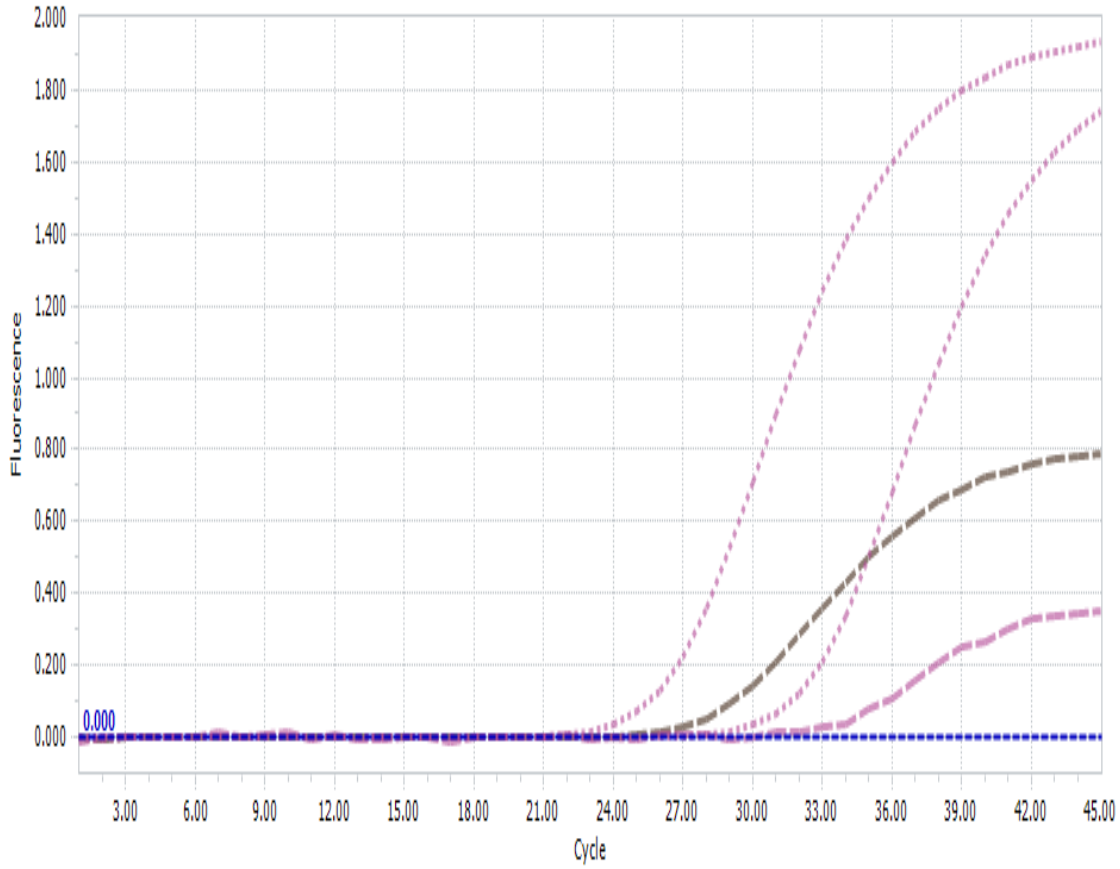
Multiplex ve Tür	Hacim	Cq
Tricoplex 1 + *Trichophyton rubrum*	10^0	-
Tricoplex 1 + *Trichophyton rubrum*	10^1	-
Tricoplex 1 + *Trichophyton rubrum*	10^2	33,12
Tricoplex 1 + *Trichophyton rubrum*	10^3	30,25
Tricoplex 1 + *Trichophyton rubrum*	10^4	27,68
Tricoplex 1 + *Trichophyton rubrum*	10^5	24,08
Tricoplex 1 + *Trichophyton rubrum*	10^6	21,18
Tricoplex 1 + *Trichophyton tonsurans*	10^0	-
Tricoplex 1 + *Trichophyton tonsurans*	10^1	-
Tricoplex 1 + *Trichophyton tonsurans*	10^2	-

Tricoplex 1 + *Trichophyton tonsurans*	10^3	34,16
Tricoplex 1 + *Trichophyton tonsurans*	10^4	30,61
Tricoplex 1 + *Trichophyton tonsurans*	10^5	27,91
Tricoplex 1 + *Trichophyton tonsurans*	10^6	24,50
Tricoplex 1 + *Trichophyton verrucosum*	10^0	-
Tricoplex 1 + *Trichophyton verrucosum*	10^1	-
Tricoplex 1 + *Trichophyton verrucosum*	10^2	33,78
Tricoplex 1 + *Trichophyton verrucosum*	10^3	30,76
Tricoplex 1 + *Trichophyton verrucosum*	10^4	27,64
Tricoplex 1 + *Trichophyton verrucosum*	10^5	24,81
Tricoplex 1 + *Trichophyton verrucosum*	10^6	21,89



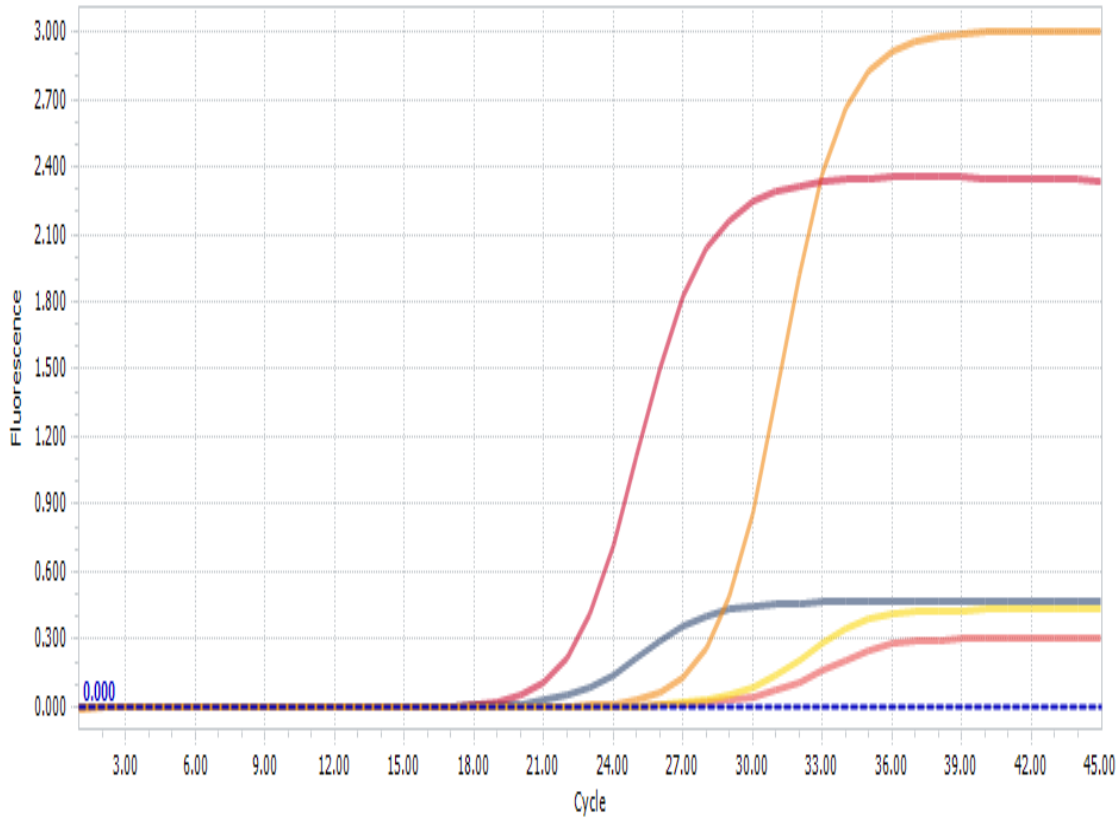
Şekil 4.2.1. *Trichophyton rubrum* dermatofit küf patojenine ait seri seyreltmelere uygulanan Multiplex-Real Time PCR sonuçlarının gösterilmesi.

Çizelge 38. ile Şekil 4.2.1.'den de anlaşılacağı üzere oluşturulan seri seyreltmelere yapılan Multiplex Real Time PCR reaksiyon sonucunda *Trichophyton rubrum* hedef türüne ait tespit limiti (LOD) değeri 10^1-10^2 kopya/ml arasında bulunmuştur.



Şekil 4.2.2. *Trichophyton tonsurans* dermatofit küf patojenine ait seri seyreltmelere uygulanan Multiplex-Real Time PCR sonuçlarının gösterilmesi.

Çizelge 38. ile Şekil 4.2.2.'den de anlaşılacağı üzere oluşturulan seri seyreltmelere yapılan Multiplex Real Time PCR reaksiyon sonucunda *Trichophyton tonsurans* hedef türüne ait tespit limiti (LOD) değeri 10^2-10^3 kopya/ml arasında bulunmuştur.



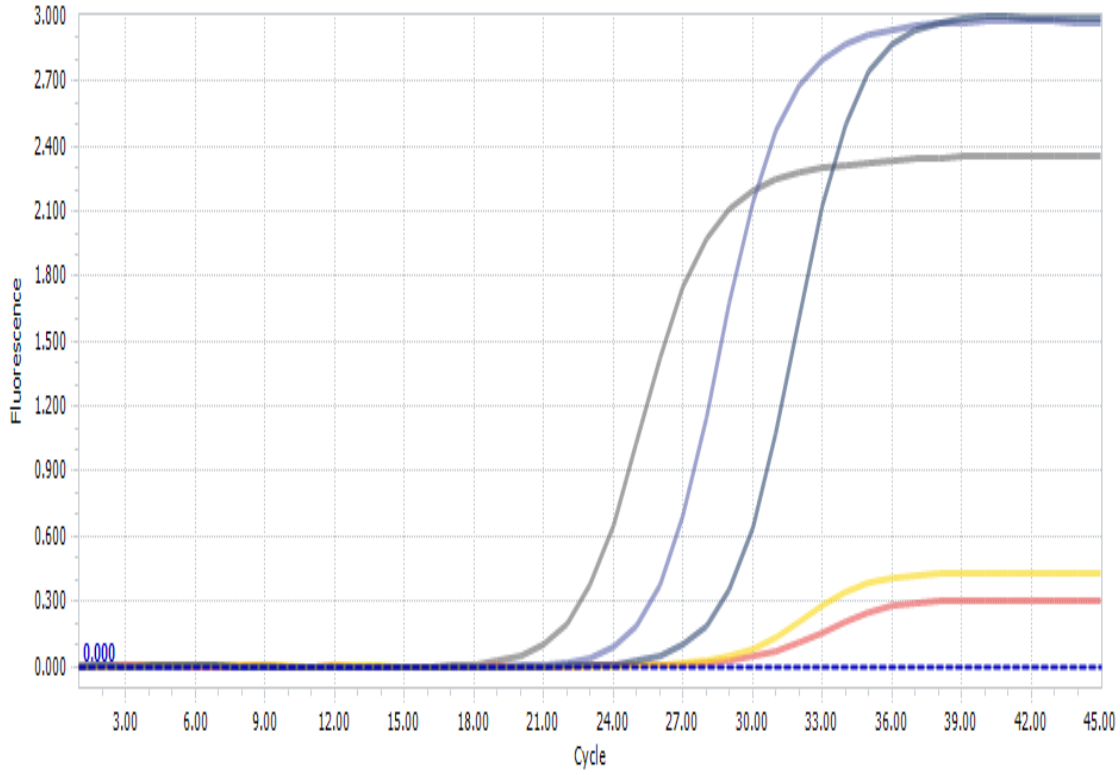
Şekil 4.2.3. *Trichophyton verrucosum* dermatofit küf patojenine ait seri seyreltmelere uygulanan Multiplex-Real Time PCR sonuçlarının gösterilmesi.

Çizelge 38. ile Şekil 4.2.3.'den de anlaşılacağı üzere oluşturulan seri seyreltmelere yapılan Multiplex Real Time PCR reaksiyon sonucunda *Trichophyton verrucosum* hedef türüne ait tespit limiti (LOD) değeri 10^1-10^2 kopya/ml arasında bulunmuştur.

Çizelge 39. Seri seyreltmelerin Tricoplex 2 Multiplex Real-Time PCR sonuçları

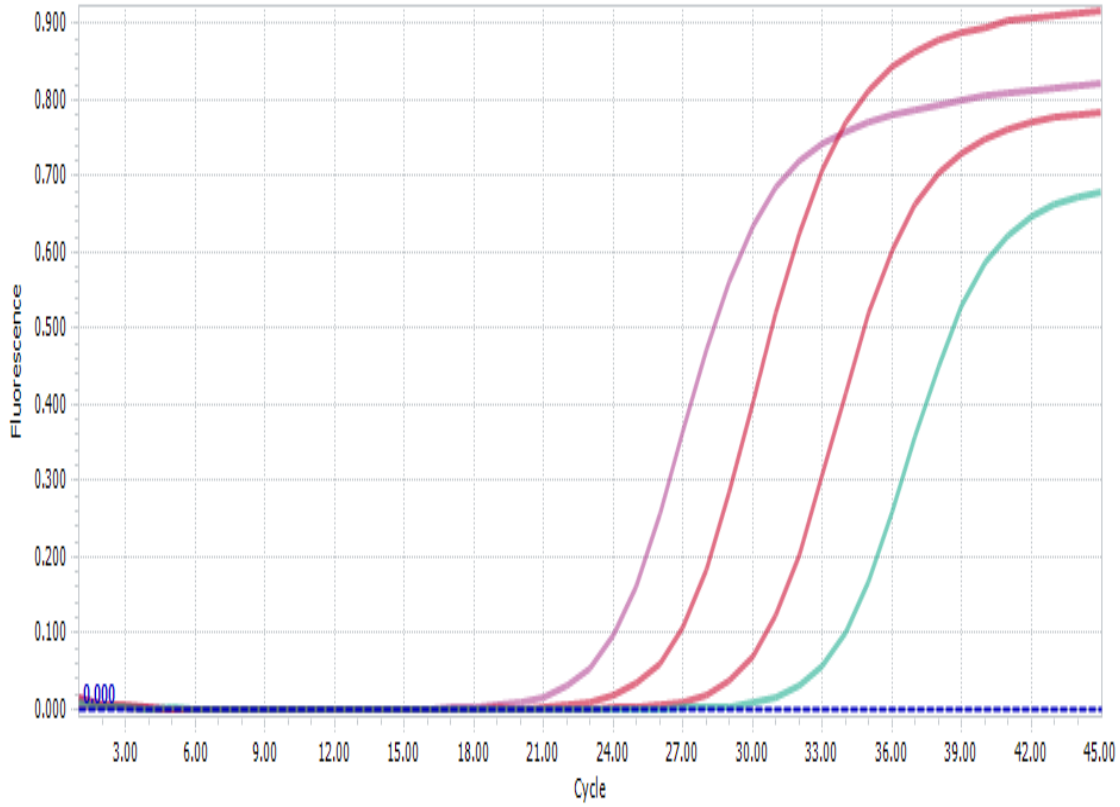
Multiplex ve Tür	Hacim	Cq
Tricoplex 2 + *Trichophyton interdigitale*	10^0	-
Tricoplex 2 + *Trichophyton interdigitale*	10^1	-
Tricoplex 2 + *Trichophyton interdigitale*	10^2	22,04
Tricoplex 2 + *Trichophyton interdigitale*	10^3	25,13
Tricoplex 2 + *Trichophyton interdigitale*	10^4	28,13
Tricoplex 2 + *Trichophyton interdigitale*	10^5	25,13
Tricoplex 2 + *Trichophyton interdigitale*	10^6	22,04
Tricoplex 2 + *Trichophyton mentagrophytes*	10^0	-
Tricoplex 2 + *Trichophyton mentagrophytes*	10^1	-
Tricoplex 2 + *Trichophyton mentagrophytes*	10^2	-

Tricoplex 2 + *Trichophyton mentagrophytes*	10^3	32,81
Tricoplex 2 + *Trichophyton mentagrophytes*	10^4	29,48
Tricoplex 2 + *Trichophyton mentagrophytes*	10^5	25,65
Tricoplex 2 + *Trichophyton mentagrophytes*	10^6	22,86
Tricoplex 2 + *Trichophyton violaceum*	10^0	-
Tricoplex 2 + *Trichophyton violaceum*	10^1	-
Tricoplex 2 + *Trichophyton violaceum*	10^2	33,78
Tricoplex 2 + *Trichophyton violaceum*	10^3	31,92
Tricoplex 2 + *Trichophyton violaceum*	10^4	28,92
Tricoplex 2 + *Trichophyton violaceum*	10^5	25,90
Tricoplex 2 + *Trichophyton violaceum*	10^6	22,89



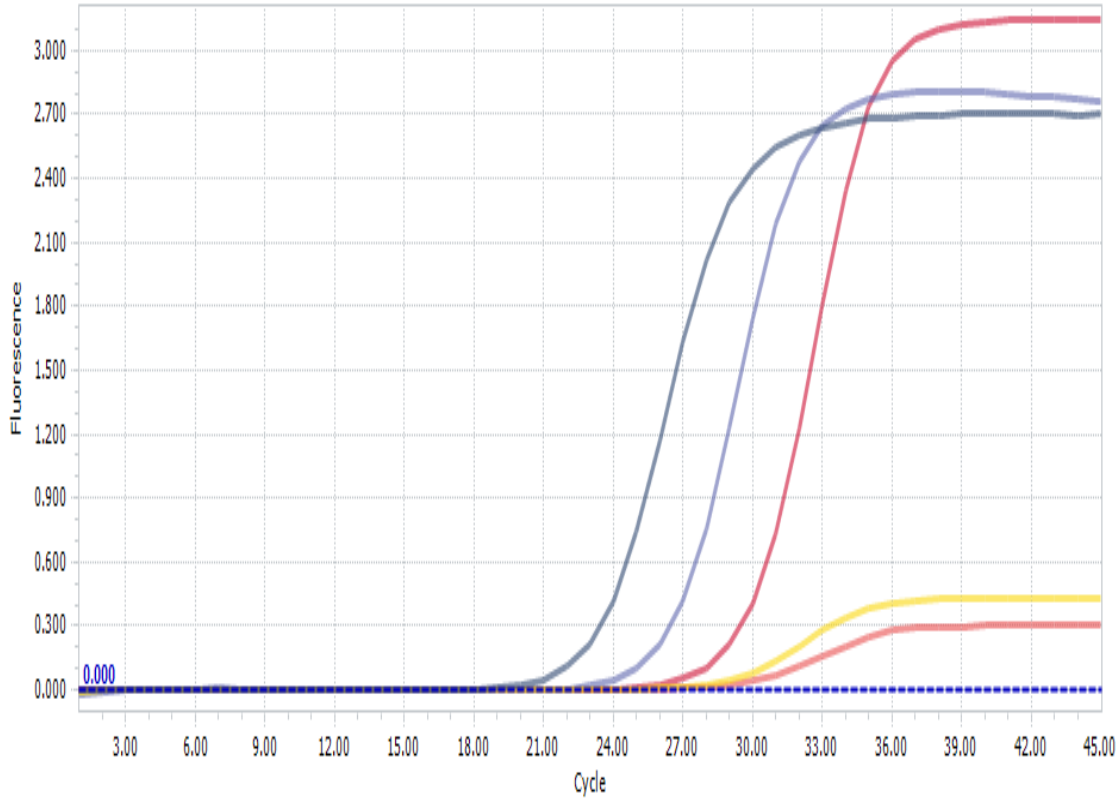
Şekil 4.2.4. *Trichophyton interdigitale* dermatofit küf patojenine ait seri seyreltmelere uygulanan Multiplex-Real Time PCR sonuçlarının gösterilmesi.

Çizelge 39. ile Şekil 4.2.4.'den de anlaşılacağı üzere oluşturulan seri seyreltmelere yapılan Multiplex Real Time PCR reaksiyon sonucunda *Trichophyton interdigitale* hedef türüne ait tespit limiti (LOD) değeri 10^1-10^2 kopya/ml arasında bulunmuştur.



Şekil 4.2.5. *Trichophyton mentagrophytes* dermatofit küf patojenine ait seri seyreltmelere uygulanan Multiplex-Real Time PCR sonuçlarının gösterilmesi.

Çizelge 39. ile Şekil 4.2.5.'den de anlaşılacağı üzere oluşturulan seri seyreltmelere yapılan Multiplex Real Time PCR reaksiyon sonucunda *Trichophyton mentagrophytes* hedef türüne ait tespit limiti (LOD) değeri 10^2-10^3 kopya/ml arasında bulunmuştur.



Şekil 4.2.6. *Trichophyton violaceum* dermatofit küf patojenine ait seri seyreltmelere uygulanan Multiplex-Real Time PCR sonuçlarının gösterilmesi.

Çizelge 39. ile Şekil 4.2.6.'dan da anlaşılacağı üzere oluşturulan seri seyreltmelere yapılan Multiplex Real Time PCR reaksiyon sonucunda *Trichophyton violaceum* hedef türüne ait tespit limiti (LOD) değeri 10^1-10^2 kopya/ml arasında bulunmuştur.

4. 3. Sanger Dizileme Tekniği ile Amplikonların Dizilenmesi

Saflaştırılan qPCR ürünleri Sanger dizileme tekniği kullanılarak çift yönlü olarak dizilenmiştir. Aşağıda çalışmada hedef olan dermatofit küf patojenlerinin her biri için tasarlanan primer ve prob oligonükleotid dizi setlerinin bağlanıp-çoğalttığı genetik bölgelerin Sanger DNA dizileme tekniği ile yapılan analiz sonuçları gösterilmektedir.

4. 3. 1. Sanger DNA Dizileme Tekniği ile *Trichophyton interdigitale* Türü için Tasarlanan Primer-Prob Setinin Çoğalttığı Genetik Bölgenin Gösterilmesi

GGGCTTTGACAGGTGGTGTATATAGCGTGGTCATGTCTGGCCACTC
GGTCAGGTTGTTATTTTTTGTCCTTCTGCGTTTTGTGCGTTGGGGGTGGGGGG
CGACGGCGGCCTGCGGCCGCCGCCTCGGGGGGGGCCCCTTCGGGGCCGGAA
AATTTTTGAATTTTGGGCGCCGGAAAAGTGATTTTGAAGGCGTAGTTGGGG
GTCAAAACAGGAGTCCGACAGC

4. 3. 2. Sanger DNA Dizileme Tekniği ile *Trichophyton mentagrophytes* Türü için Tasarlanan Primer-Prob Setinin Çoğalttığı Genetik Bölgenin Gösterilmesi

CGCCCCATTCTTGTCTACATTACTCGGTTGCCTGCCGGGGCCGCGCT
CTCCCAGGAGAGCCGTTCTTCGAGCCTCTCTTTAGTGGCTAAAC

4. 3. 3. Sanger DNA Dizileme Tekniği ile *Trichophyton rubrum* Türü için Tasarlanan Primer-Prob Setinin Çoğalttığı Genetik Bölgenin Gösterilmesi

TTCCTAGGCGAATGGGCACGGAATTCAGCGCCCTCAGGACCGGCCG
CCCTGGCCCCAATCTTTA

4. 3. 4. Sanger DNA Dizileme Tekniği ile *Trichophyton tonsurans* Türü için Tasarlanan Primer-Prob Setinin Çoğalttığı Genetik Bölgenin Gösterilmesi

CGTAGGTGAACCTGCGGAACCTACATTAACGCGCAGGCCGGAGGC
CGGCCCCCCAGGATAGGGCCAAACGTCCGTCAGGGGTGAGCAGATGTGCGC
CGGCCGTACCGCCCCATTCTTGTCTACCTTACTCGGTTGCCTCGGCGGGCCG
CGCTCTCCCTCCTCTGCCGTTCGGCGAGCCTCTCTTTATAGCGGCTCAACGCT
G

4. 3. 5. Sanger DNA Dizileme Tekniği ile *Trichophyton verrucosum* Türü için Tasarlanan Primer-Prob Setinin Çoğalttığı Genetik Bölgenin Gösterilmesi

GATCAGCGTTCCATCAGGGGTGTGCAGATGTGCGCCGGCCTTACGC
CCCATTCTTGTCTACCTTACTCGGTTGCCTCGGCGGGCCGCGCTCTCCCCGG
AGAGTCGTCCGGCGAGCCTCTTCGGGGGCTTTTCGACCATCGCGCCCGCCGG
AGGACAGACATCAAAAAATCTTGAAGAGCTGTCAGTCTGAGCGTTAGCAAG
CAAAATCAGAATAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCGGCATC

4. 3. 6. Sanger DNA Dizileme Tekniği ile *Trichophyton violaceum* Türü için Tasarlanan Primer-Prob Setinin Çoğalttığı Genetik Bölgenin Gösterilmesi

GCCCCCATTCTTGTCTACCTCACCCATGCGTATGCACGGGCCGCGCT
CCCCCTGCCAGGGAGAGCCGTCCGGCGGGCCCCTTCTGGGGGCCTCGAGCC
GGACCGCGCCCGCCGGAGGACAGACACCAAGGAAAATTCTCTGAAGGGCT
GTCAGTCTGAGCGTTTAGCAAGCACAATCAGTTAAAAACTTTCAACAACGG
ATCTGAGTAGCCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAAT
GTGAATTGCAGAATTCCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCC
TCTGGCATTCCGGGGGGCATGCCTGTTCGAGCGTCATTTCAAC

Çalışma kapsamında olan her bir dermatofit fungal tür için elde edilen genetik sekans dizi bilgileri Chromas Software Package Version 1.45 (http://www.technelysium.com/au/chromas.html) programında analiz edilmiştir. Elde edilen genetik sekanslar NCBI DNA veri tabanında (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) bilinen fungal türler ile karşılaştırılmıştır. Bu kapsamda en çok benzeyen türler, türler ile benzerlik oranları ve elde edilen sekans accession numaraları Çizelge 40.'da gösterilmiştir.

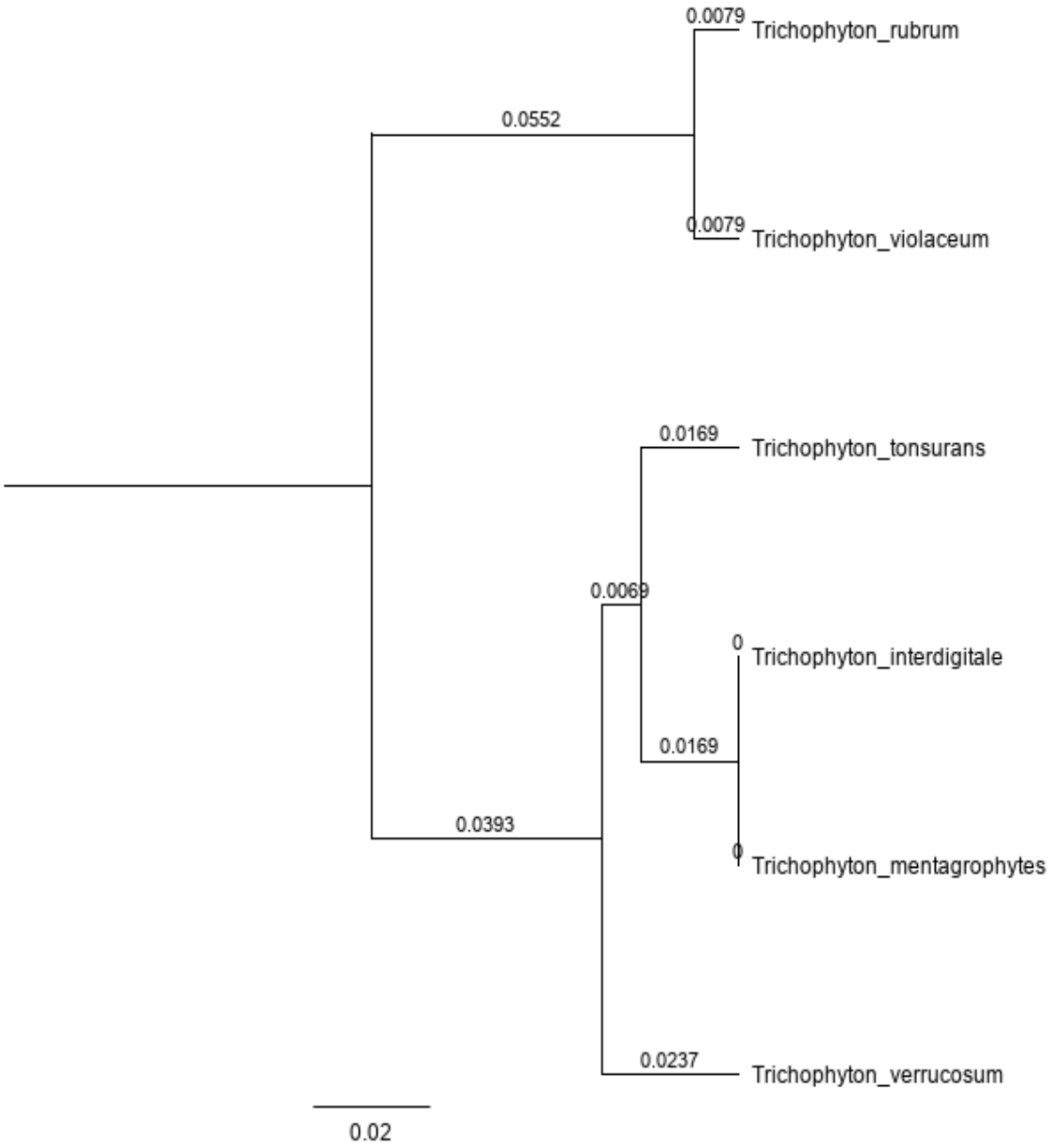
Çizelge 40. Tasarlanan primer setlerinin çoğalttığı genetik bölgelerin NCBI veri tabanındaki BLAST analizi sonuçları

Örnek	**Gen Adı**	**Genus/Tür Adı**	**Benzerlik**	**Sekans ID**
Trichophyton interdigitale	NTS	*Trichophyton interdigitale*	223/223(100%)	AB488682.1
Trichophyton mentagrophytes	ITS-1	*Fungal sp. isolate mentaghrophaytes*	87/92(95%)	MT040688.1
Trichophyton rubrum	ITS-2	*Trichophyton rubrum isolate Subcutaneous abscesses*	61/64(95%)	MT071503.1
Trichophyton tonsurans	ITS-1	*Trichophyton tonsurans isolate Z77422*	192/202(95%)	MN966493.1
Trichophyton verrucosum	ITS-1	*Trichophyton verrucosum isolate LT9*	241/249(97%)	MK632199.1
Trichophyton violaceum	ITS-1	*Trichophyton violaceum strain T_violaceum_0018*	334/348(96%)	MN808790.1

4. 4. Filogenetik Analizin Yapılması

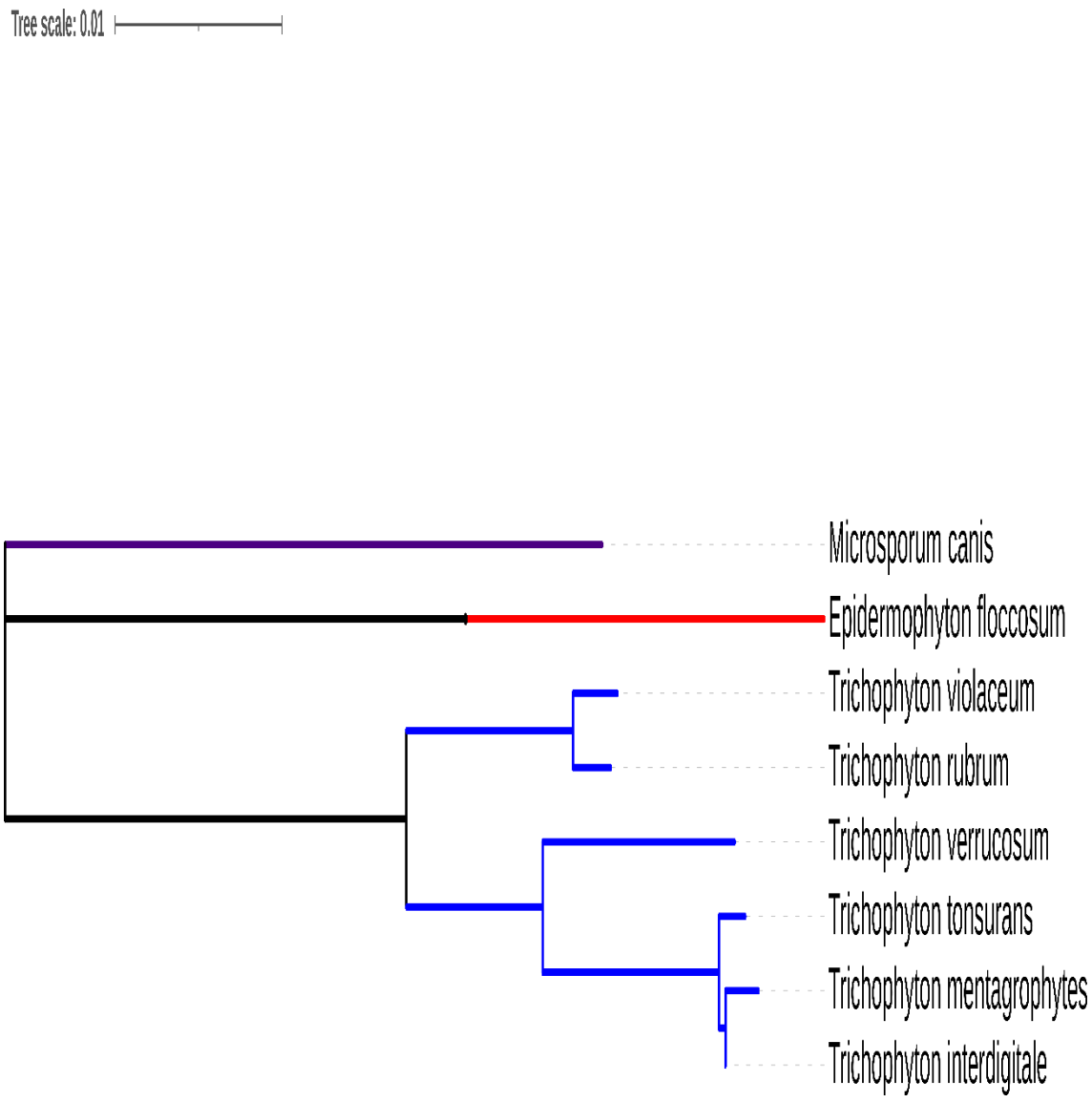
Çalışma kapsamında genetik bağlamda kümelenmeleri belirten filogenetik ağaçlar hem phenetic kapsamda yani yaşam formlarının üyeleri oldukları taksonlar arasındaki genel benzerliklere hem de cladistic kapsamda yani genetik olarak ortak bir ata soydan gelme durumları esas alınarak ve [Neighbour-Joining (filogenetik komşu

katılım), maximum likelihood (filogenetik maksimum olasılık tahmini), maximum parsimony (filogenetik maksimum cimrilik), UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean=Aritmetik Ortalamalı Ağırlıklandırılmamış Çift Grup Yöntemi)] detayları dikkate alınarak Automatic Phylogenetic Tree Generator yazılımı (https://cran.r-project.org/web/packages/aptg/vignettes/aptg.html) kullanılarak elde edilmiştir (Şekil 4.4.1.).



Şekil 4.4.1. Sadece hedef türler kapsamında ITS-18S r RNA genetik bölgelerine yönelik yapılan DNA dizi analizi neticesinde UPGMA yöntemi ile çizilen filogenetik ağacın gösterilmesi.

Çalışma kapsamında *Epidermophyton* ile *Microsproum* dermatofit genuslarına mensup olan *Epidermophyton floccosum* ile *Microsporum canis* gibi dış türler eklenmiş ve MEGA 7 ile iTOL (https://itol.embl.de) programları kullanılarak filogenetik ağaç çizimi yapılmıştır (Şekil 4.4.2.).



Şekil 4.4.2. Hedef türler ile diğer dermatofit türler kapsamında ITS-18S r RNA genetik bölgelerine yönelik yapılan DNA dizi analizi neticesinde UPGMA yöntemi ile çizilen filogenetik ağacın gösterilmesi.

BÖLÜM 5

5. TARTIŞMA

İran'da yapılan bir çalışmada *Trichophyton interdigitale* ile *Trichophyton rubrum* türlerine yönelik Beta-Tubulin, EF1-α, ITS ve Kalmodulin barkod gen bölgeleri ile PCR reaksiyonları kurulmuş ve bu 2 türün ayrımı için primer seçimleri yapılmıştır. Çalışma kapsamında spesifik primerlerin seçimi EF1-α gen bölgesine yönelik seçilmiş, 2 tür arasında 78 baz çiftlik fark kullanılarak ilgili türlerin gelen klinik örneklerdeki ayrımları yapılmıştır (Fasihizade vd., 2019).

Hindistan'da yapılan bir çalışmada deri kazıntı örnekleri hem geleneksel kültür yöntemi hem de PCR-ELISA yöntemi ile çalışılmış, moleküler araştırmalar neticesinde ITS ve TEF-1α barkod genlerine yönelik %93,21 oranında *Trichophyton mentagrophytes* ile % 6,79 oranında da *Trichophyton rubrum* türlerinde pozitif sonuçlar elde edilmiştir (Nenoff vd., 2019).

Japonya'da yapılan bir çalışmada tırnak örnekleri özel problar ve primerler kullanılarak Real-Time PCR işlemleri yapılmış, ITS-1 gen bölgesi hedeflenerek yapılan çalışma sonucunda klinik örneklerde %77 oranında *Trichophyton rubrum,* %15 oranında *Trichophyton interdigitale* ve %1,6 oranında *Candida albicans* türleri tespit edilmiştir (Shimoyama, Satoh, Makimura & Sei, 2019).

İran'da yapılan bir çalışmada dermatofitoz şüpheli hastalardan alınan klinik örnekler ITS rDNA gen bölgesine yönelik yapılan PCR işlemlerinde evrensel ITS-1 ile ITS-4 fungal primerler kullanılmış ve %20 oranında *Trichophyton mentagrophytes,*

%10 oranında *Trichophyton tonsurans*, %6,7 oranında *Trichophyton rubrum*, %6,7 oranında *Trichophyton interdigitale*, %3,3 oranında *Arthroderma otae* ve %3,3 oranında *Arthroderma vanbreuseghemii* türleri izole edilmiştir (Arammehr, Dehghan, Chadeganipour, Katoueezadeh & Shadzi, 2020).

İran'da yapılan bir çalışmada dermatofitoz şüpheli insanlardan alınan deri, saç ve tırnak örnekleri ITS hedefli olarak PCR reaksiyonlarında çalışılmış ve %46,8 oranında *Trichophyton mentagrophytes*/*Trichophyton interdigitale* tür kompleksi, %15,2 oranında *Epidermophyton floccosum*, %10,1 oranında *Trichophyton rubrum*, %10,1 oranında *Microsporum canis*, %6,3 oranında *Trichophyton violaceum*, %5,1 oranında *Trichophyton tonsurans* ve %1,3 oranında *Trichophyton verrucosum* türleri tespit edilmiştir (Ebrahimi vd., 2019).

Uganda'da yapılan bir çalışmada dermatofitoz şüpheli hastalardan alınan saç parçası ve saçlı deri kazıntı örnekleri yönelik PCR-ELISA çalışmaları *Trichophyton interdigitale, Trichophyton rubrum, Trichophyton violaceum* ile *Microsporum canis* türleri için yapılmış, spesifik hibridizasyon probları ile Topoizomeraz II gen bölgesi hedefli çalışılmıştır. %88,9 oranında *Trichophyton violaceum*, %8,9 oranında *Trichophyton rubrum* ile %2,2 oranında *Trichophyton interdigitale* dermatofit fungal patojen türleri tespit edilmiştir (Wiegand vd., 2017).

Türkiye'de yapılan bir çalışmada dermatofitoz ön tanılı hastalardan alınan saç, saçlı deri, deri ve tırnak kazıntı örnekleri moleküler tanılama amacı ile PCR reaksiyonlarında çalışılmış ve %73,2 oranında *Trichophyton rubrum*, %17,8 oranında *Trichophyton interdigitale*, %1,8 oranında *Trichophyton violaceum*, %3,6 oranında *Microsporum canis*, %1,8 oranında *Paecilomyces lilacinus* ve %1,8 oranında *Aspergillus fumigatus* türleri tespit edilmiştir (Bıyık, Gräser, Susever, Özarmağan & Yeğenoğlu, 2013).

Japonya'da yapılan bir çalışmada *Trichophyton interdigitale* türünün 64 adet klinik izolatı TRuMDR2 geni ile ITS gen bölgelerine yönelik qPCR reaksiyonları çalışılmış ve rDNA alt biriminin kopya sayıları genom başına 24-116 arasında değişmiştir (Iwanaga, Anzawa & Mochizuki, 2020).

Japonya'da yapılan bir çalışmada dermatofitler için ortak bir primer seti olan dPsD1 primer seti kullanılarak PCR ile amplifiye edilmiş ve daha sonra dermatofitlerin

DNA Topoizomeraz II genlerine spesifik olan dPsD2, PsT ve PsME primer setleri kullanılarak iç içe PCR yapılmış, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton violaceum*, *Microsporum canis*, *Microsporum gypseum* ve *Epidermophyton floccosum* türleri tespit edilmiştir (Kanbe vd., 2003).

Yapılan bir çalışmada 7 türe (*Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton soudanense*, *Trichophyton tonsurans*, *Epidermophyton floccosum*, *Microsporum canis* ve *Microsporum gypseum*) ait 42 klinik izolat ITS-1, ITS-2 ve 5.8 S rRNA gen bölgelerine yönelik hizalanmış, sekans analizleri yapılmış ve *Trichophyton* türleri arasındaki genetik varyasyonlara rağmen başarılı sonuçlar elde edilmiştir (Kong vd., 2008).

Trichophyton interdigitale türüne yönelik çalışmamız kapsamında NTS gen bölgesine spesifik olan forward primer, reverse primer ve prob oligonükleotid dizilerinin tasarımları sadece ilgili türe özgün olarak gerçekleştirilmiş (Çizelge 8.) ve hiçbir bakteriyel ya da fungal suşlar ile çapraz reaksiyon vermediği *in silico* kapsamda ıspatlanmış ve referans bakteriyel ve fungal suşlar ile kurulan PCR reaksiyonlarında alınan negatif sonuçlar ile de spesifite desteklenmiştir.

Trichophyton mentagrophytes türüne yönelik çalışmamız kapsamında ITS-1 gen bölgesine spesifik olan forward primer, reverse primer ve prob oligonükleotid dizilerinin tasarımları sadece ilgili türe özgün olarak gerçekleştirilmiş (Çizelge 9.) ve hiçbir bakteriyel ya da fungal suşlar ile çapraz reaksiyon vermediği *in silico* kapsamda ıspatlanmış ve referans bakteriyel ve fungal suşlar ile kurulan PCR reaksiyonlarında alınan negatif sonuçlar ile de spesifite desteklenmiştir.

Trichophyton rubrum türüne yönelik çalışmamız kapsamında ITS-2 gen bölgesine spesifik olan forward primer, reverse primer ve prob oligonükleotid dizilerinin tasarımları sadece ilgili türe özgün olarak gerçekleştirilmiş (Çizelge 10.) ve hiçbir bakteriyel ya da fungal suşlar ile çapraz reaksiyon vermediği *in silico* kapsamda ıspatlanmış ve referans bakteriyel ve fungal suşlar ile kurulan PCR reaksiyonlarında alınan negatif sonuçlar ile de spesifite desteklenmiştir.

Trichophyton tonsurans türüne yönelik çalışmamız kapsamında ITS-1 gen bölgesine spesifik olan forward primer, reverse primer ve prob oligonükleotid dizilerinin tasarımları sadece ilgili türe özgün olarak gerçekleştirilmiş (Çizelge 11.) ve

hiçbir bakteriyel ya da fungal suşlar ile çapraz reaksiyon vermediği *in silico* kapsamda ıspatlanmış ve referans bakteriyel ve fungal suşlar ile kurulan PCR reaksiyonlarında alınan negatif sonuçlar ile de spesifite desteklenmiştir.

Trichophyton verrucosum türüne yönelik çalışmamız kapsamında ITS-1 gen bölgesine spesifik olan forward primer, reverse primer ve prob oligonükleotid dizilerinin tasarımları sadece ilgili türe özgün olarak gerçekleştirilmiş (Çizelge 12.) ve hiçbir bakteriyel ya da fungal suşlar ile çapraz reaksiyon vermediği *in silico* kapsamda ıspatlanmış ve referans bakteriyel ve fungal suşlar ile kurulan PCR reaksiyonlarında alınan negatif sonuçlar ile de spesifite desteklenmiştir.

Trichophyton violaceum türüne yönelik çalışmamız kapsamında ITS-1 gen bölgesine spesifik olan forward primer, reverse primer ve prob oligonükleotid dizilerinin tasarımları sadece ilgili türe özgün olarak gerçekleştirilmiş (Çizelge 13.) ve hiçbir bakteriyel ya da fungal suşlar ile çapraz reaksiyon vermediği *in silico* kapsamda ıspatlanmış ve referans bakteriyel ve fungal suşlar ile kurulan PCR reaksiyonlarında aldığımız negatif sonuçlar ile de spesifite desteklenmiştir.

5. 1. Multiplex Real-Time PCR Reaksiyonları

Çalışmamızda hedef dermatofit küf patojenlerine yönelik tasarlanan, spesifite testlerinden tam özgüllük sonucu alınan forward primer, reverse primer ve prob oligonükleotid sekans dizilerinin; isimleri, problara bağlı özel boya moleküllerinin isimleri ile ürün boyutları gösterilmiştir (Çizelge 14.).

PCR reaksiyonlarının tamamında daha önce belirtilen reaksiyon ortam ve içerikleri hazırlanmış ve literatüre uygun olarak PCR cihazında ısıl döngü programı uygulanmıştır. Multiplex Real-Time PCR kitleri Tricoplex 1 ve Tricoplex 2 şeklinde iki temel başlık altında planlanmıştır.

Tricoplex 1 multiplex kiti kapsamında *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton tonsurans* ve *Trichophyton verrucosum* hedef türleri ve kullanılan PCR boyaları belirtilmiştir (Çizelge 15.). Tricoplex 2 multiplex kiti kapsamında ise *Trichophyton interdigitale*, *Trichophyton mentagrophytes* ve *Trichophyton violaceum* hedef türleri ve kullanılan PCR boyaları belirtilmiştir (Çizelge 16.).

5. 2. Analitik Duyarlılık-Özgüllük-Amplikonların Saflaştırılması

Tasarımları gerçekleştirilen hedef türlere ait primer ve prob oligonükleotid setlerinin özgüllüğünün belirlenebilmesi için Tricoplex 1 ve Tricoplex 2 multiplex reakiyonları kendi içerisinde 3'er kez hedef olan ve olmayan türler ile gerçekleştirilmiştir (Çizelge 19.). PCR reaksiyonlarında yaşanabilecek en olumsuz durumlardan biri olan deneysel anlamda çalışılan ya da incelenen tür dışında yabancı bir DNA molekülünün kontamine olmasıdır. Bu olumsuzluğu giderebilmek için hedef türlerin DNA molekülleri farklı deneyler planlanarak yapılmış ve çalışılmıştır.

Tricoplex 1 kapsamındaki hedef türlerin özgüllüğünün saptanabilmesi için referans hedef olmayan fungal suşlar ile PCR reaksiyonları planlanmıştır. İlgili hedef olmayan referans fungal suşlar belirtilmiştir (Çizelge 20., Çizelge 21., Çizelge 22.).

Tricoplex 2 kapsamındaki hedef türlerin özgüllüğünün saptanabilmesi için referans hedef olmayan fungal suşlar ile PCR reaksiyonları planlanmıştır. İlgili hedef olmayan referans fungal suşlar belirtilmiştir (Çizelge 23., Çizelge 24., Çizelge 25.).

Tricoplex 1 ve Tricoplex 2 kapsamındaki hedef türlerin özgüllüğünün saptanabilmesi için referans hedef olmayan bakteriyel suşlar ile PCR reaksiyonları planlanmıştır. İlgili hedef olmayan referans bakteriyel suşlar belirtilmiştir (Çizelge 26., Çizelge 27.).

Geliştirilen kitlerin analitik duyarlılıklarının belirlenebilmesi açısından hedefteki tüm türler için 10^0-10^6 kopya mikrofungus/ml olacak şekilde seri dilüsyonlar yapılmış ve multiplex reaksiyonlara eklenmiştir. Negatif sonuçtan bir önceki pozitif alınan sonuç tespit limiti olarak kabul edilmiştir (Çizelge 28.).

Çalışmamız kapsamında elde edilen spesifik qPCR amplikonları, daha önce belirtilen protokole uygun olarak sonuçlara olumsuz etki edecek diğer komponentlerden Biospeedy® PCR ürün saflaştırma kiti kullanılarak temizlenmiştir.

5. 3. Amplikonların Dizilenmesi ve Filogenetik Analiz

Sanger dizileme metodu kullanılarak çalışmamız kapsamındaki, saflaştırma işlemleri gerçekleştirilen, qPCR ürünlerinin çift yönlü olarak genetik anlamda dizilemesi yapılmıştır. Elde edilen diziler daha önce bahsedildiği gibi uygun veri

tabanlarında en çok benzerlik gösterdiği diziler ile karşılaştırılmış ve hedef gen lokuslarının çoğaltılıp-çoğaltılmadığı belirlenmiştir.

Genetik bağlamda kümelenmeleri belirten filogenetik ağaçlar phenetic ve cladistic yöntemler çerçevesinde gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.4.1.).

Dermatofitozlara yönelik yapılan benzer bir çalışmada saç ve tırnaklar başta olmak üzere dermatolojik bağlamda enfekte dokular üzerinde çalışmalar yapılmış ve *Trichophyton interdigitale* başta olmak üzere az sayıda *Trichophyton mentagrophytes, Trichophyton rubrum, Trichophyton tonsurans* ile *Trichophyton violaceum* türleri ITS-1 ile ITS-4 gen bölgelerine yönelik primer setleri ile çalışmışlardır (Singh vd., 2018).

Deri, saç ve tırnak gibi klinik örnekler ile yapılan bir çalışmada standart referans suşlar kullanılarak ITS-1 gen bölgelerine yönelik çalışmalar yapılmıştır. *Microsporum canis* ile *Trichophyton verrucosum* türlerine spesifik problar ile çalışmışlardır (Bergmans vd., 2008).

Saçlı deri, kılsız deri ve tırnak gibi klinik örnekler üzerinde hızlı ve doğru tanılama için gerçekleştirilen bir çalışmada standart suşlar ve alınan klinik örneklere yönelik kurulan PCR reaksiyonları kapsamında *Microsporum canis, Trichophyton mentagrophytes, Trichophyton rubrum* ile *Trichophyton tonsurans* türleri ITS-1 ile ITS-2 gen bölgelerine yönelik primerler ve problar kullanmışlardır (Yüksel & İlkit, 2012).

Dermatolojik klinik örneklerin çalışıldığı bir çalışmada ITS gen bölgesini hedef primer ve prob oligonükleotid dizileri tasarlanmış ve standart suşlar ile de birlikte spesifite testlerinden başarılı sonuçlar almışlardır ve *Microsporum audouinii, Microsporum canis, Trichophyton interdigitale, Trichophyton rubrum, Trichophyton tonsurans, Trichophyton verrucosum* ile *Trichophyton violaceum* türlerini klinik örneklerde tespit etmişlerdir (Wisselink vd., 2011).

Dermatofitoz şikayetleri olan hastalardan alınan deri ve tırnak klinik materyalleri üzerine yapılan bir çalışmada DNA Topoizomeraz II gen bölgesini hedef alan primer ve prob setleri tasarlanmış, standart suşlar ve alınan klinik örneklere yönelik kurulan PCR reaksiyonları kapsamında *Epidermophyton floccosum, Microsporum canis, Trichophyton interdigitale, Trichophyton rubrum* ile *Trichophyton violaceum* dermatofit türlerini tespit etmişlerdir (Beifuss vd., 2009).

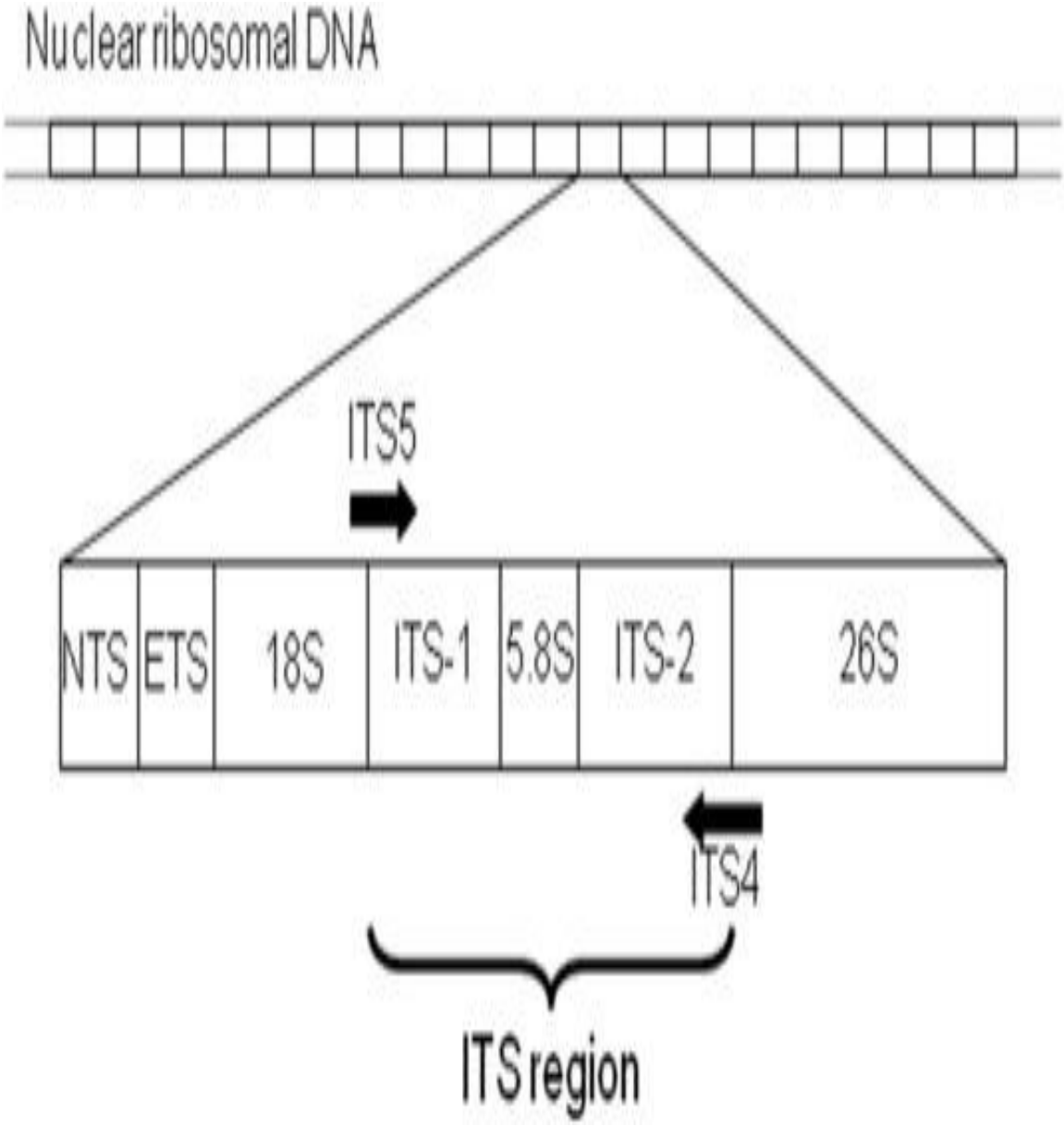
Yapılan bir çalışmada NTS gen bölgesini hedefleyen PCR çalışmaları yapılmış ve *Trichophyton mentagrophytes* var. *interdigitale* dermatofit patojenine karşı önemli başarılar elde etmişlerdir (Jackson vd., 2006).

Dermatolojik kapsamda keratinofilik dermatofit patojenlere yönelik yapılan bir çalışmada, ITS-2 gen bölgesini hedef alan primer ve prob setleri tasarlanmış, standart suşlar ve alınan klinik örneklere yönelik kurulan PCR reaksiyonları çerçevesinde *Trichophyton rubrum* türünün tespit edilmesini %100 bir başarı ile sağlamışlardır (Kobylak vd., 2015).

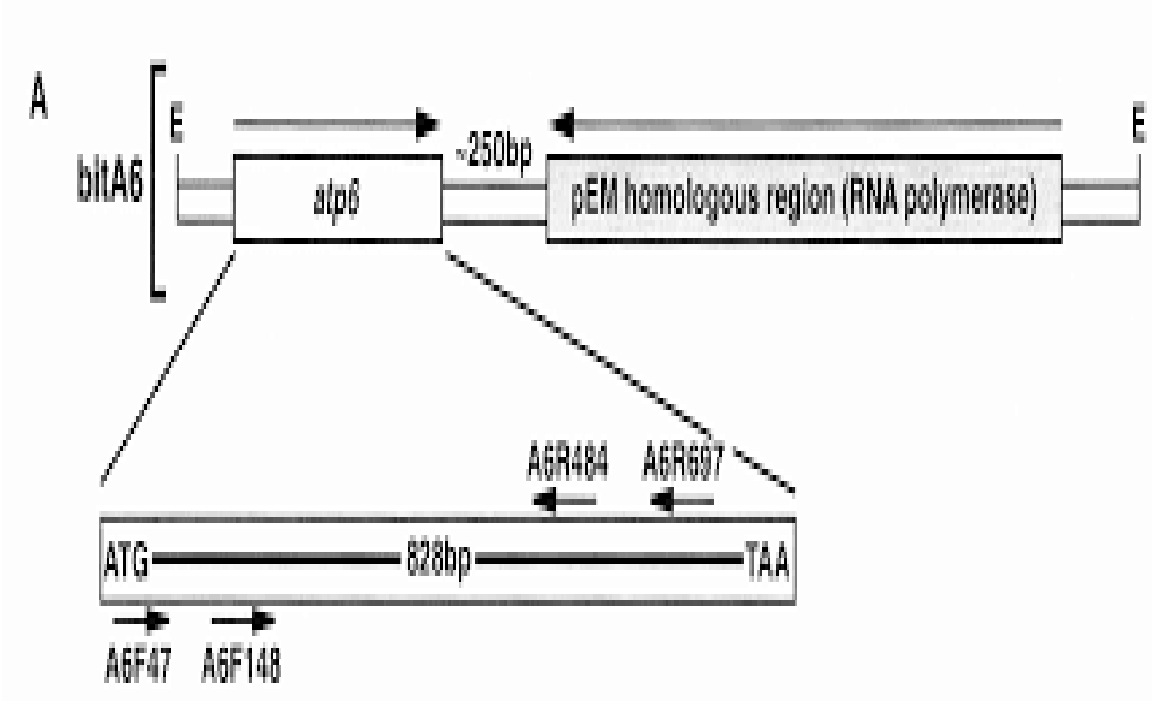
Yapılan bir çalışmada ITS-1 gen bölgesini hedefleyen primer tasarımları yapılmış ve standart suşlar ile klinik materyallere yönelik araştırmalarda *Trichophyton tonsurans* patojeninin tespitini moleküler düzeyde başarılı bir biçimde gerçekleştirmişlerdir (Yoshida vd., 2006).

Çalışmamızda *Trichophyton interdigitale*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton tonsurans*, *Trichophyton verrucosum*, *Trichophyton violaceum* olmak üzere 6 dermatofit mikrofungus türüne yönelik daha önce hiçbir çalışmada olmayan spesifik forward primer, reverse primer ve prob oligonükleotid dizileri tasarlanmıştır.

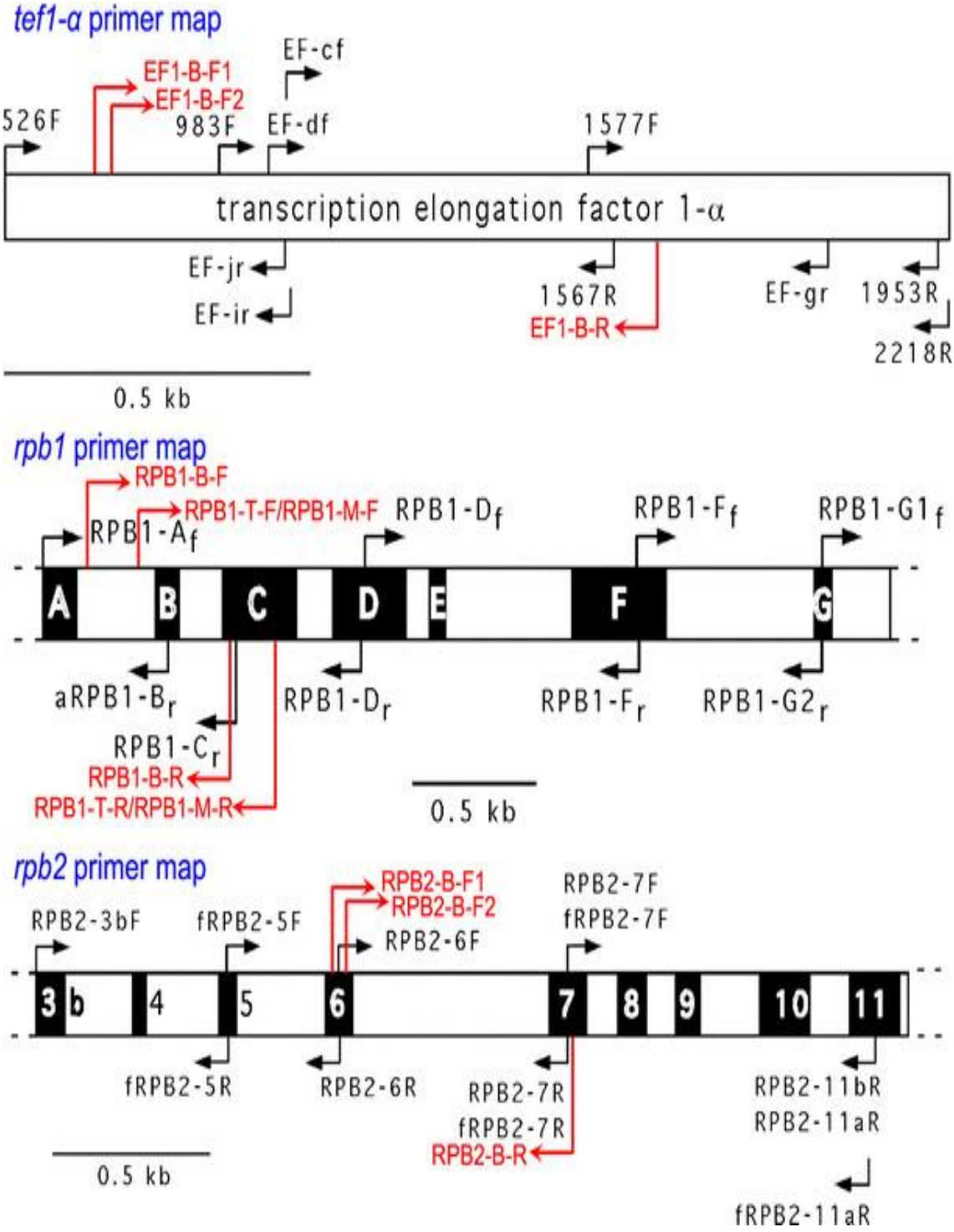
Hedef olan dermatofit patojenlerin başta Aktin, ATP6, Beta-Tubulin, IGS-1, ITS-1, ITS-2, ITS-3, ITS-4, Kalmodulin, NTS, RPB-1, RPB-2 ve TEF-1α gibi barkod genleri başta olmak üzere varsa özgün başka bir gen bölgesine yönelik spesifik primer ve prob setlerinin tasarımı tam bir başarı ile gerçekleştrilmiştir.



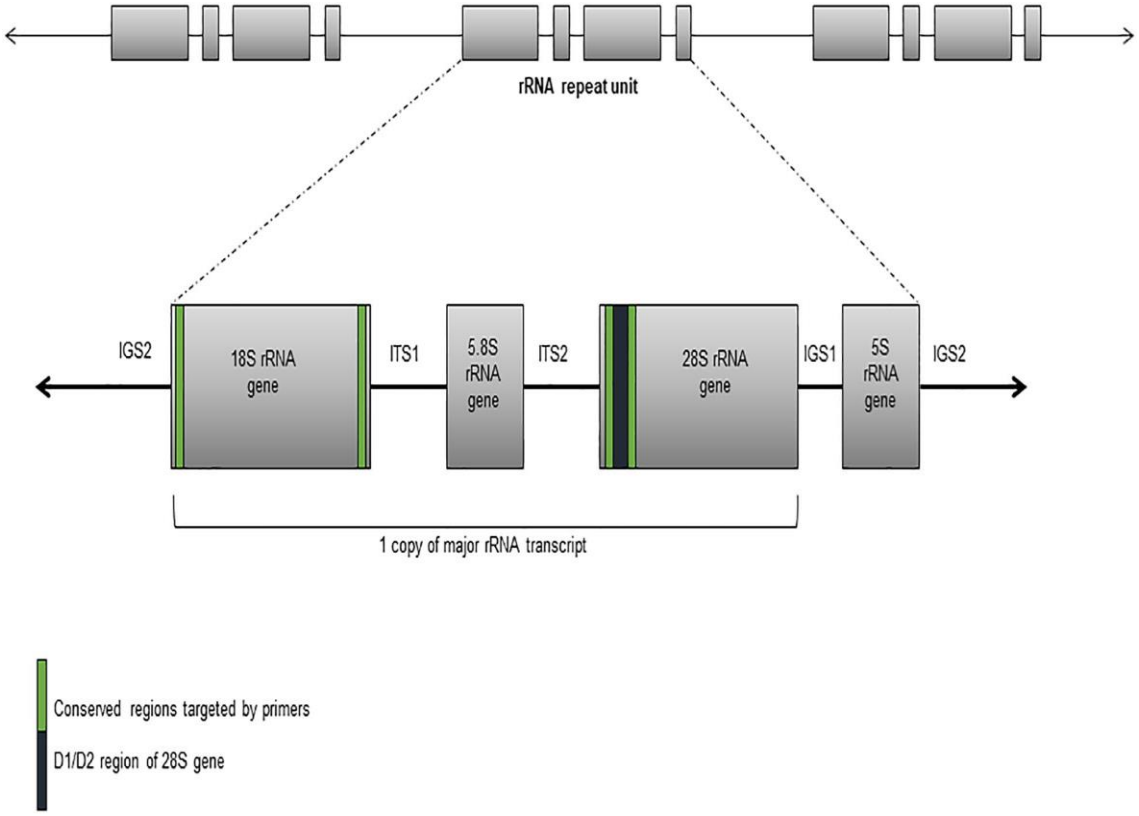
Şekil 5.9.1. Fungal barkod genlerin gösterilmesi-1 (Hidayat, Priyandoko, Wardiny & Islami, 2016).



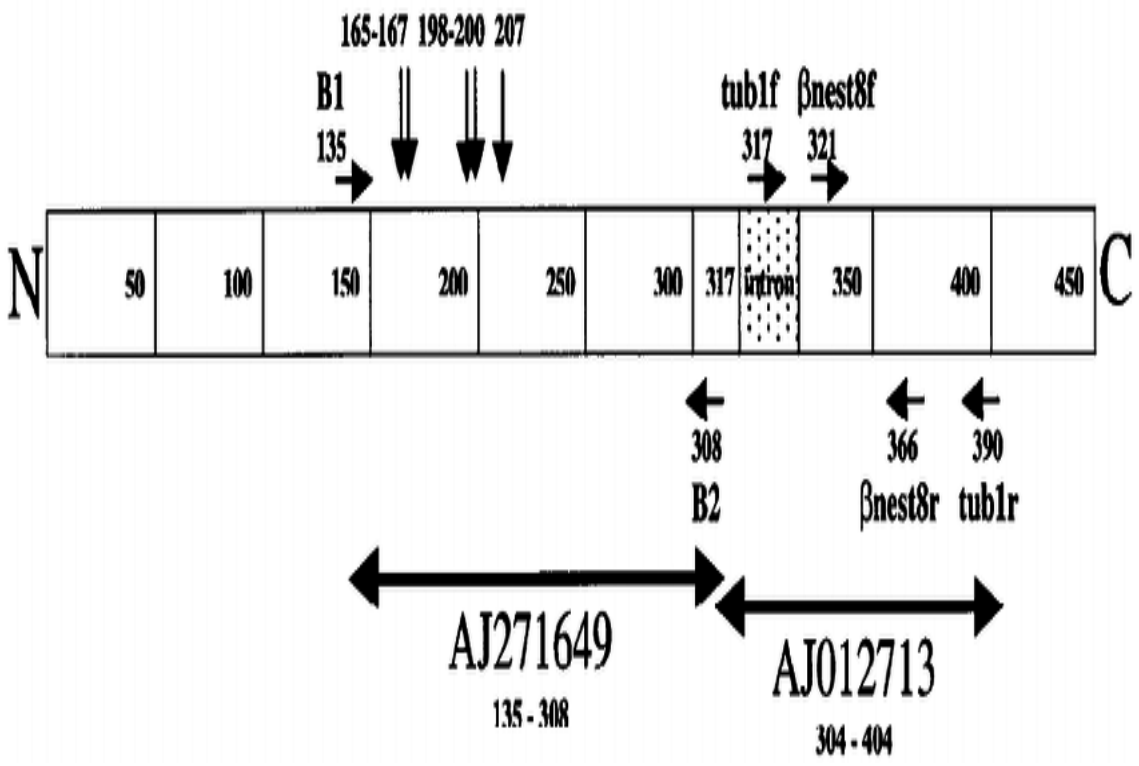
Şekil 5.9.2. Fungal barkod genlerin gösterilmesi-2 (Robison, Chiang & Horgen, 2001).



Şekil 5.9.3. Fungal barkod genlerin gösterilmesi-3 (Wu vd., 2014).



Şekil 5.9.4. Fungal barkod genlerin gösterilmesi-4 (Kidd, Chen, Meyer & Halliday, 2020).



Şekil 5.9.5. Fungal barkod genlerin gösterilmesi-5 (Beta-Tubulin) (Hirsch vd., 2001).

Çalışmamızda tasarımları yapılan primer ve prob setlerinin *in silico* kapsamda birçok program ve veri tabanları kullanılarak özgünlüğü tam bir başarı ile kanıtlanmış ve hedef olmayan bakteriyel ve fungal suşlar ile PCR reaksiyonları yapılarak çapraz reaksiyon vermediğinin belirlenmesi çalışmanın özgünlük katsayısını maksimize etmiştir.

Çalışmamızda tasarımları gerçekleştirilen primer ve prob setleri ile hedef türlerin genomik DNA'larına yönelik olarak gerçekleştirilen PCR reaksiyonlarında uygun Cq değerlerinin alınmış olması ve pozitifliği gösteren sigmoidal eğrilerin elde edilmiş olması gerçekleştirilen bilimsel deney ve aşamaların doğruluğunu göstermiştir. Ayrıca her türe özgü olan primer ve prob oligonükleotid dizileri hedef tür dışında başka herhangi bir türe bağlanma gerçekleşmemiştir.

Çalışmamızda *Trichophyton interdigitale*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton tonsurans*, *Trichophyton verrucosum*, *Trichophyton violaceum* olmak üzere hedef olan 6 dermatofit mikrofungus türüne yönelik, literatürdeki başka hiçbir çalışmada olmayan, tasarlanan primer ve prob oligonükleotid setleri, ilerleyen zamanlarda ilgili patojenlere yönelik yapılacak çalışmalar için önemli bir referans teşkil edecektir. Ayrıca geleneksel kültür ve biyokimyasal tanılama yöntemlerine nazaran çok daha doğru ve hızlı tanılama imkanı veren moleküler genetik yöntemler kapsamına giren bu çalışma sayesinde dermatofitoz enfeksiyonu geçiren hastalardan alınan klinik materyallerde ilgili hedef dermatofitler bulunuyor ise türe özgü tasarlanan primer ve prob setleri kullanılarak klinisyenlere çok hızlı bir tanı koyma ve ilgili hastalara çok daha erken bir zaman diliminde tedaviye başlama imkanı sunacaktır.

KAYNAKLAR

Ahmadi, B., Mirhendi, H., Makimura, K., de Hoog, G. S., Shidfar, M. R., Nouripour-Sisakht, S., & Jalalizand, N. (2016). Phylogenetic analysis of dermatophyte species using DNA sequence polymorphism in calmodulin gene. *Medical Mycology*, *54*(5), 500-514.

Alshibly, M. K., & Al-Marshedy, A. M. (2019). Molecular study of virulence factors influencing the pathogenicity of *Trichophyton rubrum*. *Ecology, Environment and Conservation*, *25*(1), 153-158.

Arabatzis, M., Van Coppenraet, L. E. S. B., Kuijper, E. J., de Hoog, G. S., Lavrijsen, A. P. M., Templeton, K., Van der Raaij-Helmer, E. M. H., Velegraki, A., Gräser, Y., & Summerbell, R. C. (2007). Diagnosis of common dermatophyte infections by a novel multiplex real-time polymerase chain reaction detection/identification scheme. *British Journal of Dermatology*, *157*(4), 681-689.

Arammehr, A., Dehghan, P., Chadeganipour, M., Katoueezadeh, M., & Shadzi, S. (2020). Detection of dermatophytes from dermatophytosis-suspected cases in Iran, evaluation of polymerase chain reaction-sequencing method. *Advanced Biomedical Research*, *9*(56), doi: 10.4103/abr.abr_21_20.

Barken, K. B., Haagensen, J. A. J., & Tolker-Nielsen, T. (2007). Advances in nucleic acid-based diagnostics of bacterial infections. *Clinica Chimica Acta*, *384*(1-2), 1-11.

Begerow, D., Nilsson, H., Unterseher, M., & Maier, W. (2010). Current state and perspectives of fungal DNA barcoding and rapid identification procedures. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *87*(1), 99-108.

Beifuss, B., Bezold, G., Gottlöber, P., Borelli, C., Wagener, J., Schaller, M., & Korting, H. C. (2009). Direct detection of five common dermatophyte species in clinical samples using a rapid and sensitive 24-h PCR-ELISA technique open to protocol transfer. *Mycoses*, *54*(2), 137-145.

Bergmans, A. M. C., Schouls, L. M., Van der Ent, M., Klassen, A., Böhm, N., & Wintermans, R. G. F. (2008). Validation of PCR-reverse line blot, a method for rapid

detection and identification of nine dermatophyte species in nail, skin and hair samples. *Clinical Microbiology and Infection*, *14*(8), 778-788.

Bıyık, F., Gräser, Y., Susever, S., Özarmağan, G., & Yeğenoğlu, Y. (2013). Dermatofitlerin identifikasyonunda moleküler yöntemlerin yeri ve uygulanabilirliğinin belirlenmesi. *Archives of the Turkish Dermatology and Venerology*, *47*(1), 26-32.

Bruns, T. D., White, T. J., & Taylor, J. W. (1991). Fungal molecular systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics*, *22*(1), 525-564.

Ebrahimi, M., Zarrinfar, H., Naseri, A., Najafzadeh, M. J., Fata, A., Parian, M., Khorsand, I., & Babic, M. N. (2019). Epidemiology of dermatophytosis in Northeastern Iran; A subtropical region. *Current Medical Mycology*, *5*(2), 16-21.

Fasihizade, Z., Ahmadi, B., Shokoohi, G. R., Jalalizand, N., Motamedi, M., & Mirhendi, H. (2019). Differentiating agents of dermatophytosis (*Trichophyton rubrum* and *Trichophyton interdigitale*) in human by dual polymerase chain reaction. *Tehran University Medical Journal*, *77*(4), 222-227.

Forootan, A., Sjöback, R., Björkman, J., Sjögreen, B., Linz, L., & Kubista, M. (2017). Methods to determine limit of detection and limit of quantification in quantitative real-time PCR (qPCR). *Biomolecular Detection and Quantification*, *12*, 1-6.

Hidayat, T., Priyandoko, D., Wardiny, P. Y., & Islami, D. K. (2016). Molecular phylogenetic screening of *Withania somnifera* relative from Indonesia based on internal transcribed spacer region. *HAYATI Journal of Biosciences*, *23*(2), 92-95.

Hirsch, P. R., Atkins, S. D., Mauchline, T. H., Morton, C. O., Davies, K. G., & Kerry, B. R. (2001). Methods for studying the nematophagous fungus *Verticillium chlamydosporium* in the root environment. *Plant and Soil*, *232*(1), 21-30.

Hsiao, C. R., Huang, L., Bouchara, J. P., Barton, R., Li, H. C., & Chang, T. C. (2005). Identification of medically important molds by an oligonucleotide array. *Journal of Clinical Microbiology*, *43*(8), 3760-3768.

Iwanaga, T., Anzawa, K., & Mochizuki, T. (2020). Variations in ribosomal DNA copy numbers in a genome of *Trichophyton interdigitale*. *Mycoses*, *63*(10), 1133-1140.

Jackson, C. J., Mochizuki, T., & Barton, R. C. (2006). PCR fingerprinting of *Trichophyton mentagrophytes* var. *interdigitale* using polymorphic subrepeat loci in the r DNA nontranscribed spacer. *Journal of Medical Microbiology*, *55*(10), 1349-1355.

Kahya, S., Büyükcangaz, E., & Carlı, K. F. (2013). Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) optimizasyonu. *Uludag University Journal of the Faculty of Veterinary Medicine*, *32*(1), 31-38.

Kanbe, T., Suzuki, Y., Kamiya, A., Mochizuki, T., Kawasaki, M., Fujihiro, M., & Kikuchi, A. (2003). Species-identification of dermatophytes *Trichophyton*, *Microsporum* and *Epidermophyton* by PCR and PCR-RFLP targeting of the DNA topoisomerase II genes. *Journal of Dermatological Science*, *33*(1), 41-54.

Kidd, S. E., Chen, S. C. A., Meyer, W., & Halliday, C. L. (2020). A new age in molecular diagnostics for invasive fungal disease: Are we ready?. *Frontiers in Microbiology*, DOI: 10.3389/fmicb.2019.02903.

Kobylak, N., Bykowska, B., Nowicki, R., & Brillowska-Dabrowska, A. (2015). Real-Time PCR approach in dermatophyte detection and *Trichophyton rubrum* identification. *ACTA ABP Biochimica Polonica*, *62*(1), 119-122.

Kong, F., Tong, Z., Chen, X., Sorrell, T., Wang, B., Wu, Q., Ellis, D., & Chen, S. (2008). Rapid identification and differentiation of *Trichophyton* species, based on sequence polymorphisms of the ribosomal internal transcribed spacer regions, by rolling-circle amplification. *Journal of Clinical Microbiology*, *46*(4), 1192-1199.

Kralik, P., & Ricchi, M. (2017). A basic guide to Real-Time PCR in microbial diagnostics: Definitions, parameters and everything. *Frontiers in Microbiology*, *8*(108), 1-9.

Millar, B. C., Jiru, X., Moore, J. E., & Earle, J. A. (2000). A simple and sensitive method to extract bacterial, yeast and fungal DNA from blood culture material. *Journal of Microbiological Methods*, *42*(2), 139-147.

Miyajima, Y., Satoh, K., Uchida, T., Yamada, T., Abe, M., Watanebe, S. I., Makimura, M., & Makimura, K. (2013). Rapid real-time diagnostic PCR for *Trichophyton rubrum* and *Trichophyton mentagrophytes* in patients with tinea unguium and tinea pedis using spesific fluorescent probes. *Journal of Dermatological Science*, *69*(3), 229-235.

Mochizuki, T., Takeda, K., & Anzawa, K. (2017). Molecular markers useful for intraspecies subtyping and strain differantiation of dermatophytes. *Mycopathologia*, *182*(1-2), 57-65.

Motamedi, M., Mirhendi, H., Zomorodian, K., Khodadadi, H., Kharazi, M., Ghasemi, Z., Shidfar, M. R., & Makimura, K. (2017). Clinical evaluation of β-tubulin real-time PCR for rapid diagnosis of dermatophytosis, a comparison with mycological methods. *Mycoses*, *60*(10), 692-696.

Nenoff, P., Verma, S. B., Vasani, R., Burmester, A., Hipler, U. C., Wittig, F., Krüger, C., Nenoff, K., Wiegand, C., Saraswat, A., Madhu, R., Panda, S., Das, A., Kura, M., Jain, A., Koch, D., Gräser, Y., & Uhrlauß, S. (2019). The current Indian epidemic of superficial dermatophytosis due to *Trichophyton mentagrophytes*- A molecular study. *Mycoses*, *62*(4), 336-356.

Robison, M. M., Chiang, B., & Horgen, P. A. (2001). A phylogeny of the genus *Agaricus* based on mitochondrial *atp6* sequences. *Mycologia*, *93*(1), 30-37.

Shimoyama, H., Satoh, K., Makimura, K., & Sei, Y. (2019). Epidemiological survey of onychomycosis pathogens in Japan by real-time PCR. *Medical Mycology*, *57*(6), 675-680.

Singh, A., Masih, A., Khurana, A., Singh, P. K., Gupta, M., Hagen, F., Meis, J. F., & Chowdhary, A. (2018). High terbinafine resistance in *Trichophyton interdigitale*

isolates in Delhi, India harbouring mutations in the squalene epoxidase (SQLE) gene. *Mycoses*, *61*(7), 477-484.

Tiryaki, Y., Gültekin Korkmazgil, B., Eyigör, M., & Aydın, N. (2015). Dermatofitozların laboratuvar tanısında polimeraz zincir reaksiyonunun kullanılması. *Mikrobiyoloji Bülteni*, *49*(2), 201-209.

Torre, C., Agüero, J., Gomez-Aix, C., & Aranda, M. A. (2020). Comparison of DAS-ELISA and qRT-PCR for the detection of cucurbit viruses in seeds. *Annals of Applied Biology*, *176*(2), 158-169.

Türkyılmaz, S., & Esendal, Ö. M. (2002). Polimeraz zincir reaksiyonu ve mikrobiyoloji'de kullanım alanları. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, *8*(1), 71-76.

Weitzman, I., & Summerbell, R. C. (1995). The Dermatophytes. *Clinical Microbiology Reviews*, *8*(2), 240-259.

Wiegand, C., Mugisha, P., Mulyowa, G. K., Elsner, P., Hipler, U. C., Gräser, Y., Uhrlauß, S., & Nenoff, P. (2017). Identification of the causative dermatophyte of tinea capitis in children attending Mbarara Regional Referral Hospital in Uganda by PCR-ELISA and comparison with conventional mycological diagnostics methods. *Medical Mycology*, *55*(6), 660-668.

Wisselink, G. J., Van Zanten, E., & Kooistra-Smid, A. M. D. (2011). Trapped in keratin; a comparison of dermatophyte detection in nail, skin and hair samples directly from clinical samples using culture and real-time PCR. *Journal of Microbiological Methods*, *85*(1), 62-66.

Wu, G., Feng, B., Xu, J., Zhu, X. T., Li, Y. C., Zeng, N. K., Hosen, M. I., & Yang, Z. L. (2014). Molecular phylogenetic analyses redefine seven major clades and reveal 22 new generic clades in the fungal family *Boletaceae*. *Fungal Diversity*, *69*(1), 93-115.

Yoshida, E., Makimura, K., Mirhendi, H., Kaneko, T., Hiruma, M., Kasai, T., Uchida, K., Yamaguchi, H., & Tsuboi, R. (2006). Rapid identification of *Trichophyton tonsurans* by spesific PCR based on DNA sequences of nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) 1 region. *Journal of Dermatological Science*, *42*(3), 225-230.

Yüksel, T., & İlkit, M. (2012). Identification of rare macroconidia producing dermatophytic fungi by real-time PCR. *Medical Mycology*, *50*(4), 346-352.

ÖZGEÇMİŞ

06.03.1989 tarihinde İstanbul'da doğdum. İlköğrenimimi Erenköy İlköğretim Okulu'nda 2003 yılında, Lise öğrenimimi Maltepe Orhangazi Lisesi'nde okul 2.'si olarak 2006 yılında tamamladım. Lisans eğitimime 2008 yılında Marmara Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde başlayıp, 2012 yılında tamamladım. Yüksek Lisans eğitimime 2012 yılında Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Ana Bilim Dalı'nda başlayıp, 2015 yılında tamamladım. Yüksek Lisans öğrenimim ile eş zamanlı olarak 2013-2015 yılları arasında Yeditepe Üniversitesi Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda Biyolog olarak çalıştım. Doktora eğitimime 2017 yılında Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Ana Bilim Dalı'nda başladım ve öğrenimime halen devam etmekteyim. 01.02.2016 tarihinden beri Nişantaşı Üniversitesi Meslek Yüksekokulu Tıbbi Laboratuvar Teknikleri Programı akademik kadrosunda Öğretim Görevlisi olarak akademik çalışmalarımı ve yaşantımı sürdürmekteyim.