



Sığırlardan *Trichophyton verrucosum*'un Kültür ve MALDI-TOF MS Yöntemleri ile İdentifikasyonu

Özcan BALIBAY^{1,a,✉}, Osman Yaşar TEL^{2,b}

¹Bozova İlçe Tarım ve Orman Müdürlüğü, Bozova/Şanlıurfa, TÜRKİYE

²Harran Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Şanlıurfa, TÜRKİYE

^aORCID: 0000-0002-5771-0092; ^bORCID: 0000-0001-7848-3899

Geliş Tarihi/Received
04.12.2020

Kabul Tarihi/Accepted
07.04.2021

Yayın Tarihi/Published
30.06.2021

Öz

Trichophyton verrucosum genç sığırlarda gelişme geriliği, süt sığırlarında verim kaybı ve derinin ekonomik değerinin azalması gibi önemli sorunlara neden olmaktadır. Etken teşhisinde konvansiyonel yöntemlerin zaman alıcı olması ve kesin sonuçlar vermemesinden dolayı duyarlılığı ve özgüllüğü yüksek, hızlı yeni tanı yöntemlerine ihtiyaç duyulmaktadır. Bu çalışmada sığırlardan *T. verrucosum*'un kültür ve MALDI-TOF MS yöntemleri ile identifikasyonu amaçlanmıştır. Bu amaca yönelik olarak Şanlıurfa ilinde dermatofitoz şüpheli 100 adet sığırdan deri kazıntısı ve kıl örnekleri alındı. Alınan örnekler direkt mikroskopi ile incelendi ve 52 (%52)'si pozitif bulundu. Örneklerin yapılan kültürü sonucu 63 (%63)'ünde dermatofit izole edildi ve bunların 52 (%52)'si *T. verrucosum* olarak identifiye edildi. Örnek alınan hayvancılık işletmelerinin %100'nün *T. verrucosum* ile infekte olduğu saptandı. İdentifikasyonu yapılan *T. verrucosum* izolatları 7950-7954 arasında MALDI-TOF MS spektrum pikleri saptanarak doğrulandı. *T. verrucosum*'un doğrulanması amacı ile MALDI TOF tekniğinin geleneksel yöntemlere kıyasla daha başarılı bir şekilde kullanılabileceği, etkenin zoonotik önemi ve ülke hayvancılığına verdiği ekonomik zarardan dolayı hastalığa karşı gerekli koruma kontrol önlemlerinin alınması gerektiği sonucuna varıldı.

Anahtar Kelimeler: MALDI-TOF MS, sığır, *Trichophyton verrucosum*, trikofitozis, zoonoz

Identification of *Trichophyton verrucosum* by Culture and MALDI-TOF MS Methods

Abstract

Trichophyton verrucosum causes important problems such as a decline in the development of young cattle, a decrease in milk yield and a decrease in the economic value of the skin. As conventional methods are time consuming and do not yield precise results in the diagnosis of the agent, there is a need for fast new diagnostic methods with high sensitivity and specificity. Isolation of *T. verrucosum* strains from cattle by culture method and verification by MALDI-TOF MS was aimed in this study. For this purpose, skin scrapings and hair samples were taken from 100 cattle with suspected dermatophytosis in Şanlıurfa province. The samples taken were examined by direct microscopy and 52 (52%) of them were found to be positive. As a result of the culture of the samples 63 (63%) dermatophytes were isolated and 52 (52%) of them were identified as *T. verrucosum*. It was found that 100% of the sampled farms were infected with *T. verrucosum*. Identified *T. verrucosum* isolates were confirmed by detecting MALDI-TOF MS spectrum peaks between 7950-7954. It was concluded that MALDI TOF technique can be used more successfully than traditional methods for the purpose of verifying *T. verrucosum* and the necessary protection and control measures should be taken against the disease due to zoonotic importance of the agent and the economic damage it caused to the country's livestock.

Key Words: Cattle, MALDI-TOF MS, *Trichophyton verrucosum*, trichophytosis, zoonosis

GİRİŞ

Trichophyton verrucosum sığır Trikofitozisinin en sık rastlanılan etkenidir (1). Etken cansız kornifiye dokularda sınırlı lezyonlara neden olmaktadır. Lezyonlar genellikle baş bölgesinde sıklıkla da göz çevresi, alın, burun, kulak, yanak çevresinde bulunmakla beraber boyun ve vücudun tüm bölgelerinde rastlanılabilmektedir. Lezyonlar başta lokal kıl dökülmeleri, kepeklenme, gri beyaz kabuklanma şeklinde görülür ve yuvarlak şekilli olmakla beraber düzensiz de olabilmektedir (2). Etkeni taşıyan semptomatik ya da asemptomatik hayvanların çevreye saçtıkları fungal sporlar, temas ve bunların enfekte ettiği materyaller bulaşmada önemli rol oynar (3).

Enfeksiyon süt sığırlarında verim kaybı, genç sığırlarda gelişme geriliği ve derinin ekonomik değerinin azalması gibi önemli hayvan sağlığı ve ekonomik sorunlara neden olmaktadır (4). Etkenin tanımlanmasında konvansiyonel yöntemlerden direkt mikroskopi ve kültür yöntemi kullanılmaktadır. Konvansiyonel yöntemlerin zaman alıcı olması ve kesin sonuç vermemesinden dolayı duyarlılığı ve özgüllüğü yüksek, hızlı yeni tanı yöntemlerine ihtiyaç duyulmaktadır. Moleküler yöntemlerin tanıda giderek artan oranda kullanılması, bu güçlüklerin aşılmasında önemli bir adımdır (5,6). Bütün bunlarla birlikte, dermatofit etkenlerin tanımlanması; doğru antifungal tedaviyi seçmek, epidemiyolojik kökeni saptamak ve

uygun koruma kontrol tedbirleri başlatmak açısından önemlidir. Son zamanlarda MALDI-TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry) teknolojisi, bakteri ve mantarların tanımlanmasında başarılı bir şekilde kullanılmaya başlanmıştır (7). Yaptığımız literatür taramasında Türkiye'de *T. verrucosum* gibi filamentöz mantarların tanımlanmasında MALDI TOF yöntemi daha önce kullanılmamıştır ve dünyada bu tip çalışmalar kısıtlıdır. Bu alanda doğrulayıcı ve nitelikli araştırmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Bu çalışmada dermatofitoz şüpheli sığırlardan *T. verrucosum*'un kültür ve MALDI-TOF MS yöntemleri ile identifikasyonu amaçlanmıştır.

MATERYAL VE METOT

Çalışma örnekleme ve araştırma dizaynı Şanlıurfa ilinde dermatofitoz şüpheli 100 adet sığırdan alınan deri kazıntısı ve kıl örnekleri çalışmanın materyalini oluşturdu. Lezyon ve çevresi %70'lik alkol ile silindi. Lezyonun çevresinden başlamak üzere steril bir bistüri ile deri döküntüleri kazınarak, steril bir pens yardımı ile de kıllar çekilerek steril petrilere alındı. Alınan numuneler en kısa süre içerisinde laboratuvara ulaştırılarak incelemeleri yapıldı. Enfeksiyonun yaşa göre dağılımı SPSS 16.0 programı kullanılarak belirlendi.

Direkt mikroskopi deri kazıntısı ve kıl örnekleri laboratuvara getirilerek az bir miktarı lam üzerine alındı, üstüne %15'lik KOH çözeltisi damlatıldı. Hazırlanan preparatın üzeri lamel ile kapatıldı ve hafifçe ısıtılarak 15-20 dakika oda ısısında bekletildi. Preparat ışık mikroskopunda önce 10X, sonra 40X objektifiyle incelendi. Preparatta mantar spor ve hif yapıları arandı ve sonuçlar kaydedildi (8).

Kültür

Laboratuvara ulaştırılan numuneler Sabouraud Dektroz Agar (SDA)'a ekimleri yapıldı. *T. verrucosum* üretilmesi amacıyla Sabouraud Dektroz Agar (Merck, Darmstadt, Germany)'a thiamine (4 mg /ml), inositol (100 mg/ml), cycloheximide (0.5 mg/ml) ve chloramphenicol (0.1 mg/ml), katılarak kullanıldı. Ekimi yapılan besiyerleri 26°C'lik etüve konularak dört hafta inkübasyona bırakıldı. Oluşan üremeler 3-4 günde bir kontrol edildi. Inkübasyon sonunda oluşan koloniler steril bir öze ile alınarak lam üzerine konuldu. Üzerine Laktofenol Pamuk Mavis damlatılarak mikroskopun önce 10X sonra 40X objektifi ile incelendi. Üreyen kolonilerin; koloni yüzey renkleri, taban pigmentleri, üreme hızları ve mikroskopik olarak hiflerin yapısı, mikrokonidyumlar, makrokonidyumların varlığı göz önüne alınarak mantar atlası yardımı ile identifikasyonları gerçekleştirildi (8). Şüpheli kolonilerin konidyum gelişimini ve pigment oluşumunu arttırmak amacıyla üreme görülen

besiyerlerinden Trichophyton Agar ve Patates Dekstroz Agara (PDA) subkültürleri yapıldı. Besiyerleri 37 °C'lik etüve konuldu ve 4-6 hafta inkübasyona bırakıldı. Üreyen koloniler önce makroskopik özellikleri kaydedildi. Sonra kolonilerden steril bir öze yardımı ile az bir miktar alınarak lam üzerine konuldu ve üzerine Laktofenol Pamuk Mavis damlatılarak mikroskopun önce 10X, sonra 40X objektifleriyle incelenerek mantar atlası yardımı ile identifiye edildi.

Kütle Spektrometrik Analizi- MALDI-TOF MS

Analiz için Biotyper Microflex LT modeli (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Almanya) kullanıldı. Numunelerin hazırlanması ve işlenmesi imalatçı tarafından önerilen şekilde yapıldı (9). Kısaca bir koloni çevresinden üç eşit parça (1 mm x 1 mm) bir inokülasyon iğnesi ile toplandı ve Sabouraud broth içine aktarıldı. Daha sonra, tüpler 48 °C'de doğrusal çalkalayıcıda inkübe edildi. Mantar içeren sıvı kültürler eppendorf tüplerine aktarıldı ve 10 µl %10 Tween 80 çözeltisi eklenerek vortekslendi ve 9520 g'da 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatant dikkatli bir şekilde çıkarıldı ve peletler 1 ml deiyonize steril su ile yıkandı. Vorteksleme, santrifüjleme ve süpernatanın uzaklaştırılması gerçekleştirilerek yıkama işlemi tekrarlandı. Peletler 200 µl deiyonize steril su ve 600 µl mutlak etanol ile karıştırıldı. Numuneler, -80 °C'de 12 saat süreyle donduruldu. Çözünme işleminden sonra, numuneler santrifüjlendi ve süpernatant bir kez daha uzaklaştırılarak, 28 °C'de 30 dakika kurutuldu. Daha sonra, tortu içine 50 µl %70 formik asit ve 50 µl asetronitril ilave edildi. Santrifüjden sonra, 2 µl süpernatant bir MALDI hedef plakasına aktarıldı ve 28 °C'de kurutuldu. Son olarak, numuneler birlikte kristalleştirme için doymuş a-siyano-4-hidroksi sinamik asit çözeltisi (HCCA matrisi, Bruker Daltonik, her bir nokta için 1 µl) ile üzerine bindirildi. Kütle spektrometrik ölçüm, bir kütle içinde doğrusal pozitif iyon modunda yapıldı 2000-20,000 Da aralığı, Spektrumların temel düzeltme, pürüzsüzleştirme ve tepe filtreleme Bruker Daltonik GmbH yazılım paketiyle yapıldı (9).

BULGULAR

İncelemeye alınan 100 adet hayvanın cinsiyete göre dağılımı; 37 (%37) adedi dişi, 63 (%63)'ü erkek olarak belirlendi. Ayrıca incelenen sığırların yaşa göre dağılımı 34 (%34)'ü 0-6 aylık, 53 (%53)'ü 6 ay-1 yaş, 13 (%13)'ünün ise 1 yaşından daha büyük olduğu kaydedildi (Tablo 1). Enfeksiyonun 1 yaşından daha küçük sığırlarda görülme oranının daha yüksek ve bunun istatistiksel olarak anlamlı olduğu ortaya konuldu (P<0,05).

Tablo 1. İncelenen materyallerin yaş ve cinsiyetlere dağılımı

Materyal Kaynakları	Yaş Grupları			Cinsiyet		Toplam
	0-6 ay	6 ay- 1 yaş	1 yaş ve üzeri	Erkek	Dişi	
Hilvan	14	21	-	13	22	35
Bozova	7	30	13	44	6	50
Eyyübiye	13	2	-	6	9	15
Toplam (%)	34 (%34)	53(%53)	13(%13)	63(%63)	37(%37)	100

Direkt mikroskopik incelemede, 100 adet materyalin 52 (%52)'si dermatofit pozitif olarak saptandı. Direkt mikroskopi pozitif olan 52 preparatın yapılan kültürleri sonucu 50'sinde dermatofit izole edildi. Direkt mikroskopide negatif olarak kaydedilen 48 adet numunenin yapılan kültürleri sonucu 13'ünde dermatofit ürerken, 24'ünde kontaminant mantar üredi ve 11'inde üreme saptanmadığı görüldü (Tablo 2).

Tablo 2. Direkt mikroskopi ve kültür sonuçlarının karşılaştırılmalı bulguları

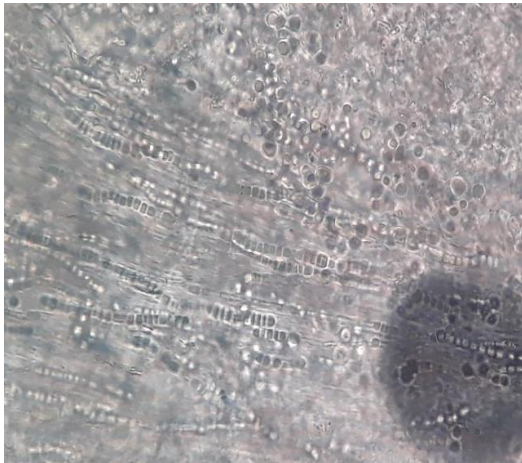
		Kültür		Toplam
		Pozitif (n=63)	Negatif (n=37)	
Direkt mikroskopi	Pozitif	50	2	52
	Negatif	13	35	48
Toplam		63 (%63)	37(%37)	100 (%100)

Kültür mikroskopisinde incelenen 100 adet materyalin 63 (%63)'ünde dermatofit izole edilirken 24 (%24)'ünde ise saprofit mantar izole edildi. İzole edilen 63 adet dermatofitin 52 (%82,53)'si *T. verrucosum* olarak tanımlandı (Tablo 3).

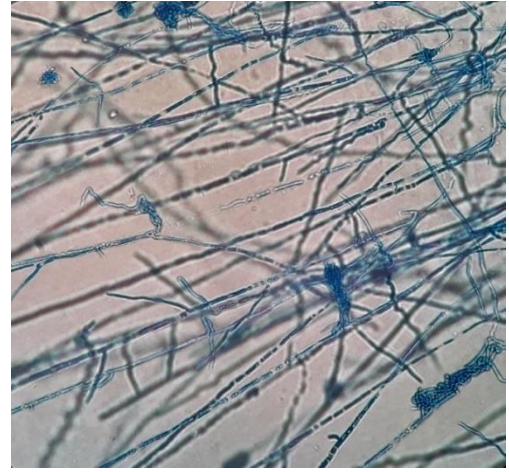
Tablo 3. Kültür yöntemi ile izolasyon sonuçları

Türler	Kültür	
	Sayı	Yüzde (%)
<i>T. verrucosum</i>	52	%52
Diğer dermatofitler	11	%11
Kontaminasyon	24	%24
Üreme saptanmayan	13	%13

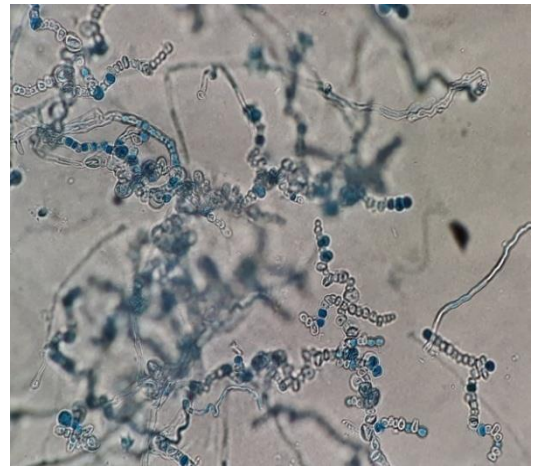
Dermatofit şüpheli 100 adet olgudan en yüksek oranda *T. verrucosum* 52 (%52)'i izole edilirken, 4'ünde *T. tonsurans*, 2'sinde *T. rubrum*, 5'inde ise *T. mantagrophytes* izole edildi. İncelenen materyallerin kültürü sonucu 24'ünün; 10'unda *Aspergillus spp.*, 7'sinde *Penicillium spp.*, 4'ünde *Pseudallescheria boydi*, 3'ünde ise *Candidia spp.* izole edildi. Materyallerin 13'ünde ise üreme saptanmadı.



Şekil 1. Direkt Mikroskopi %15'lik KOH x40 objektif görüntüsü

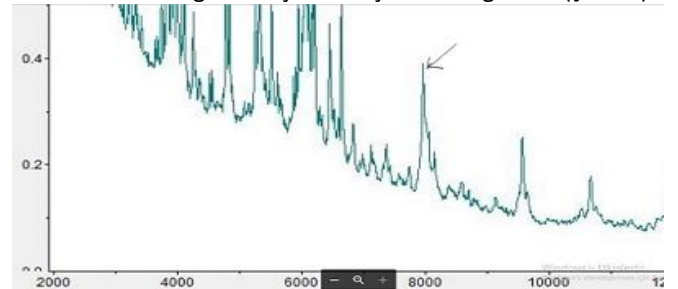


Şekil 2. *T. verrucosum* 26 °C'deki Laktofenol Pamuk Mavis Boyama X40 objektif görüntüsü



Şekil 3. *T. verrucosum* 37 °C'de Laktofenol Pamuk Mavis Boyama X40 objektif görüntüsü

Çalışmada izole edilen 52 adet *T. verrucosum* MALDI-TOF MS yöntemi ile doğrulandı. *T. verrucosum* izolatları spektrum görüntüsünde 7950-7954 m/z 'de karakteristik pik gösterdi. Görülen MALDI-TOF MS spektrumları izolatların *T. verrucosum* olduğunu başarılı bir şekilde doğruladı (Şekil 4).



Şekil 4. *T. verrucosum*'ün MALDI-TOF MS spektrum görünümü

TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada 100 adet dermatofit şüpheli sığırdan alınan numunelerden direkt mikroskopi incelemesinde 52 (%52)'sinde pozitiflik saptandı. Bağdat Üniversitesi Veteriner Fakültesinde 50 adet sığırdan yapılan çalışmada, direkt

mikroskopide 40 (%80) adedinde pozitiflik bulunmuştur (10). İran'daki bir çalışmada, dermatofitoz şüpheli 380 sığırın direkt mikroskopi ile incelenmesi sonucunda, 338 (%88,9)'inde pozitiflik saptanmıştır (11). Erzurum'da klinik olarak dermatofitoz şüpheli 8 adet buzağıdan direkt mikroskopide 5 (62.5%)'inin pozitif olduğu belirlenmiştir (12). Şanlıurfa'da yapılan bir çalışmada, dermatofitozlu 84 sığırdan direkt mikroskopide 84 numunenin 23'ünde (%27.3) pozitiflik saptanmıştır (13). Bu çalışmada direkt mikroskopik bulgular Erzurum bölgesinde yapılan çalışmaya benzer görülmüştür.

Bu çalışmada dermatofitoz şüpheli 100 adet sığırdan kültür mikroskobisi yöntemiyle %52 oranında *T. verrucosum* izole edildi ve numune alınan hayvancılık işletmelerin tamamının %100'nün *T. verrucosum* ile infekte olduğu görüldü. Aghamirian ve Ghiasian (11) yaptıkları bir çalışmada dermatofitoz şüphesi olan 380 sığırdan 352 (%92.6)'sinde *T. verrucosum* izole etmişlerdir. Ayrıca incelenen çiftliklerin tamamının *T. verrucosum* ile infekte olduğunu bildirmişlerdir. İtalya'da Papini ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada ise 20 çiftlikte inceledikleri 294 sığırdan %87.7 oranında *T. verrucosum* izole ettiklerini ve çiftliklerin %100'ünün *T. verrucosum* ile infekte olduğunu bildirmişlerdir (4). Bu çalışmada numune alınan hayvancılık işletmelerin tamamının *T. verrucosum* ile infekte olduğu görüldü. Gösterilen referans çalışmalar bu durumu destekler niteliktedir.

Bu çalışmada *T. verrucosum* izolasyon oranı yukarıda verilen referans çalışmalara göre nispeten daha düşük çıkmıştır. Bu çalışmada incelenen materyallerin kültürü sonucu 24 (%24)'ünün; 10 (%10)'unda *Aspergillus spp.*, 7 (%7)'sinde *Penicillium spp.*, 4 (%4)'ünde *Pseudallescheria boydi*, 3 (%3)'ünde ise *Candida spp.* izole edildi. Materyallerin 13 (%13)'ünde ise üreme saptanmadı. Toprak kaynaklı saprofitler sağlıklı hayvanların deri, kıl ve tüylerine bulaşabilmektedir. Bazı numunelerden saprofit mantarların izole edilmiş olması yapılan bazı çalışmalarda elde edilen bulgularla benzerlik göstermektedir (14, 15). Mohammed ve ark. (10)'nın Bağdat Üniversitesi Veteriner Fakültesinde yapmış oldukları bir çalışmada, bazı materyallerde besi yerinde siklohesimid olmasına rağmen dermatofit kolonilerinin ortaya çıkmasını önleyen saprofitler ürediğini bildirmişlerdir. Ayrıca yapılan çalışmalarda *T. verrucosum* izolasyon oranlarında farklılık gösterilmektedir. Yahyaaray ve ark. (16) tarafından yapılan çalışmada dermatofitoz şüpheli 28 sığırdan 18 (%64.2)'inde *T. verrucosum* izole edilirken, İran'da Khosravi ve Mahmoudi (17) Dermatofitoz şüpheli sığırların %85'inden *T. verrucosum* izole etmişlerdir. Yıldırım ve ark. (18)'nin dermatofitoz şüpheli 50 inekten %44'ünde *T. verrucosum* izolasyonu gerçekleştirmişken, Tel ve ark. (13)' dermatofitozlu 84 sığırdan 25'inde (%29.7) *T. verrucosum* izole etmişlerdir. Özkanlar ve ark. (12) Erzurum yöresinde dermatofitoz şüpheli 8 adet buzağıdan 8 (100%) adet *T. verrucosum* izole etmişlerdir. Irak'ta 50 sığır dermatofitoz yönünden incelediği çalışmada 10 (%28.6)'unda *T. verrucosum* izole edilmiştir (10). Van ve yöresindeki dermatofitoz şüpheli 54 sığırdan alınan numunelerin kültür yöntemiyle incelendiği başka bir çalışmada, örneklerin dermatofit pozitif 18 (%33.3)'numunenin, 9 (%16.6)'unda *T. verrucosum* izole edilmiştir (15). Prevalans saptamak için yapılan çalışmalarda ülkeler arasında büyük

farklılıklar görülebilmektedir. İtalya'da %19, İran'da %5.6, Çin'de %20, İsviçre'de %74 ve İsveç'te %29 gibi farklı oranlarda dermatofitoz prevalansı bildirilmiştir (11,19-22). *T. verrucosum* izolasyon oranlarının bölgeden bölgeye farklılık göstermesinin bölgeler arasında nem, bakım ve barınma koşulları gibi etkenlerden kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Bu çalışmada dermatofitoz şüpheli sığırların yaşa göre dağılımında 87 (%87)'sinin bir yaş ve altında olduğu saptanmıştır. Aghamirian ve Ghiasian (11) tarafından yapılan bir çalışmada sığırlarda dermatofitozlu vakalarının %57.5'nin bir yaş ve altında olduğu bildirilmiştir. Oldenkamp (23) tarafından yapılan çalışmada ise 12 aylığın altındaki sığırlarda yüksek oranda dermatofitoz vakası saptanmıştır. Bu çalışmada da genç hayvanlarda yüksek oranda dermatofitoz saptanmıştır. Yaşla beraber derinin pH değerinin azaldığı bilinmektedir ve böylece genç hayvanlarda derinin yüksek pH'sına bağlı olarak düşük immüniteyle beraber dermatofitoza daha duyarlı oldukları belirtilmiştir (24). Yaş aralıklarına göre enfeksiyonun görülme oranı 1 yaşından küçük sığırlarda daha yüksek görüldüğü ve bunun istatistiksel olarak anlamlı olduğu ortaya konuldu ($P<0,05$). Gösterilen referans çalışmalar bu durumu destekler niteliktedir.

MALDI-TOF MS ilk olarak bakterilerin tanımlanması için uyarlanmıştır (25). Teknik daha sonra maya için kullanılmıştır (26). Mikolojik araştırma ekipleri tarafından yapılan çabalar, yeterli referans spektrum kütüphanelerinin kurulması ve rutin laboratuvarlar için mevcut olması koşuluyla, yöntemin filamentöz mantarların tanımlanmasına başarıyla uyarlanabileceğini bildirilmiştir (27). Bu çalışmada geleneksel yöntemlerle izole edilen *T. verrucosum* izolatlarının tamamı MALDI-TOF MS'de 7950-7954 arasında karakteristik bir pik göstererek tüm izolatların *T. verrucosum* olduğunu doğrulandı. Bartosch ve ark. (9) tarafından yapılan; *T. verrucosum*'un diğer dermatofitlerden kütle spektrometrisi ile ayırt edilmesini sağlamak ve kütle spektrumunun ayırt edici özelliklerini tanımlamak amacıyla yapılan çalışmada; *T. verrucosum*'un MALDI-TOF MS tanımlanması için üretici veri tabanı, sığır ve insan kaynaklı 13 *T. verrucosum* suşu ile genişletilmiştir. Araştırmacılar sığırların tüm izolatlarını MALDI-TOF MS ile diğer dermatofitlerden başarılı bir şekilde ayırt ettiklerini bildirmişlerdir. Genişletilmiş veri tabanı ile MALDI-TOF MS analizi, çalışmada incelenen 45 *T. verrucosum* izolatu tanımlanması sağlanmış ve bu örnekler ITS sekanslaması ile doğrulanmıştır. Ek olarak, çalışmaya *T. benhamiae*, *T. verrucosum*'un veteriner ve insan izolatlarının yanında 10 insan ve 2 aşı suşu da dahil edilmiştir. *T. verrucosum* spektrum piklerinin analizi, 7950-7954 m/z'deki spesifik bir pikin, *T. verrucosum* ile anlamlı şekilde ilişkili olduğunu ortaya çıkarmıştır. Bu pik, araştırılan başka herhangi bir dermatofitin spektrumunda saptanmamıştır. MALDI-TOF MS ve sekans analizi ile elde edilen sonuçların tam olarak uyumu, MALDI-TOF MS'nin, diğer dermatofitlerde de geçerli olarak *T. verrucosum*'u tanımlamak için güçlü ve güvenilir bir araç olduğu bildirmişlerdir. Bu çalışmada kültür yöntemi ile izole edilen *T. verrucosum* izolatları MALDI-TOF MS ile doğrulanmıştır. MALDI-TOF MS'den alınan spektrumda 7950-7954 arası pik göstermiş ve gösterilen referans çalışma da bu durumu destekler niteliktedir.

Bu çalışmada MALDI-TOF MS'nin *T. verrucosum*'un tanımlanmasında yararlı olduğu, Şanlıurfa bölgesinde zoonotik önemi olan *T. verrucosum*'un sığırlarda yaygın olduğu ve enfeksiyonun ülke hayvancılığına verdiği zarardan dolayı enfeksiyon ile mücadele için gerekli koruma ve kontrol önlemlerinin alınması gerektiği sonucuna varıldı.

TEŞEKKÜR

Bu çalışmada MALDI-TOF MS analizlerin yapılmasındaki katkılarından dolayı Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesinden Dr. Öğr.Üyesi Nida ÖZCAN'a teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

1. Neji S, Trabelsi H, Hadrach I, et al. (2016). Molecular Characterization of Strains of the *Trichophyton verrucosum* Complex from Tunisia. *Sabouraudia*. 54(8): 787-793.
2. Gül Y. (2006). Geviş Getiren Hayvanların İç Hastalıkları (Sığır, Koyun-Keçi). II. Baskı. Medipres Matbaacılık Ltd. Şti., Malatya.
3. Hasegawa M, Iida Y, Yano TA, Takaiwa F, Iwabuchi M. (1985). Phylogenetic Relationships among Eukaryotic Kingdoms Inferred from Ribosomal RNA Sequences. *J Mol Evol*. 22(1): 32-38.
4. Papini R, Nardoni S, Fanelli A, Mancianti F. (2009). High Infection Rate of *Trichophyton verrucosum* in Calves from Central Italy. *Zoonoses Public Health*. 56(2): 59-64.
5. Susever S, Yeğenoğlu Y. (2011). İnvazif Mantar Enfeksiyonlarının Tanımlanmasında Moleküler Yöntemlerin Öneminin Konvansiyonel Yöntemler ile Karşılaştırılarak Değerlendirilmesi. *Mikrobiyol Bul*. 45(2): 325-335.
6. Valente P, Ramos JP, Leoncini O. (1999). Sequencing as a Tool in Yeast Molecular Taxonomy. *Can J Microbiol*. 45(11): 949-958.
7. Kallow W, Erhard M, Shah HN, Raptakis E, Welker M. (2010). MALDI-TOF MS for Microbial Identification (In): Years of Experimental Development to an Established Protocol: Mass Spectrometry for Microbial Proteomics. HN Shah, SE Gharbia (eds). pp. 255- 276. John Wiley and Sons Ltd, London, UK.
8. Larone, DH, Larone DH. (1987). *Medically Important Fungi: A Guide to Identification*. 6th ed. Elsevier New York.
9. Bartosch T, Heydel T, Uhrlaß S, et al. (2018). MALDI-TOF MS Analysis of Bovine and Zoonotic *Trichophyton verrucosum* Isolates Reveals a Distinct Peak and Cluster Formation of a Subgroup with *Trichophyton benhamiae*. *Med Mycol J*. 56(5): 602-609.
10. Faraj MK, Mohammed SJ. (2011). A Survey of Dermatophytes Isolated from Cows and Sheep in Iraq. *Iraqi J Vet Med*. 35(2): 40-45.
11. Aghamirian MR, Ghiasian SA. (2011). Dermatophytes as a Cause of Epizoonoses in Dairy Cattle and Humans in Iran: Epidemiological and Clinical Aspects. *Mycoses*. 54(4): 52-56.
12. Ozkanlar Y, Aktas MS, Kirecci E. (2009). Mycozoonosis Associated with Ringworm of Calves in Erzurum Province, Turkey. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*. 15: 141-144.

13. Tel OY, Bozkaya F, Yiğın A, Gürbilek SE, Keskin O. (2018). Isolation and Molecular Characterization of Bovine *Trichophyton verrucosum* Strains Based on Sequence Analysis of Internal Transcribed Spacer Region (ITS1) and Microsatellite Loci. *Pak Vet J*. 38(2): 189-193
14. Mbata TI. (2009). Dermatophytes and Other Skin Mycoses Found in Featherless Broiler Toe Webs. *Int J Dermatol*. 7(2): 399-402.
15. İlhan Z. (2015). Isolation of Dermatophytes from Cattle, Sheep, Goats and Van Cats in Van and its around. *Van Vet J*. 26(1): 1-5.
16. Yahyaraeyat R, Shokri H, Khosravi AR, Soltani M, Erfanmanesh A, Nikaein D. (2009). Occurrence of Animals Dermatophytosis in Tehran, Iran. *World J Zool*. 4(3): 200-204
17. Khosrav AR, Mahmoudi M. (2003). Dermatophytes Isolated from Domestic Animals in Iran. *Mycoses*. 46(5-6): 222-225.
18. Yildirim M, Cinar M, Ocal N, Yagc BB, Askar S. (2010). Prevalence of Clinical Dermatophytosis and Oxidative Stress in Cattle. *J Anim Vet Adv*. 9(14): 1978-1982.
19. Moretti A, Boncio L, Pasquali P, Fioretti DP. (1998). Epidemiological Aspects of Dermatophyte Infections in Horses and Cattle. *J Vet Med*. 45(1-10): 205-208.
20. Ming PX, Ti YLX, Bulmer GS. (2006). Outbreak of *Trichophyton verrucosum* in China Transmitted from Cows to Humans. *Mycopathologia*. 161(4): 225-228.
21. Carlsson J. (1993). Risken for Ringworm Hos Notkreatur Och miinniska. *Sven Vet Tidn*. 45: 467-471
22. Haab C. (1991). *Epidemiologie der Trichophytie beim Mastkalb*. Inaugural: Doctoral Dissertation. Switzerland, Zurich: University of Zurich.
23. Oldenkam EP. (1979). Natamycin Treatment of Ringworm in Cattle in the United Kingdom. *Vet Rec*. 105(24): 5554-5556.
24. Eliopoulos GM, Perea S, Patterson TF. (2002). Antifungal Resistance in Pathogenic Fungi. *Clin Infect Dis*. 35(9): 1073-1080.
25. Seng P, Rolain JM, Fournier PE, La Scola B, Drancourt M, Raoult D. (2010). MALDI-TOF-mass Spectrometry Applications in Clinical Microbiology. *Future microbiol*. 5(11): 1733-1754.
26. Özcan N, Ezi Ö, Akpolat N, Bozdağ H, Mete M, Gül K. (2016). Klinik örneklerde saptanan *Candida* türlerinin MALDI-TOF MS ile tiplendirilmesi. *Dicle Med J*. 43(3): 390-394.
27. Ferreira L, Juanes FS, Vega S, et al. (2013). Identification of Fungal Clinical Isolates by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Rev Esp Quimioter*. 26: 193-7.

✉ Sorumlu Yazar:

Özcan BALIBAY

Bozova İlçe Tarım ve Orman Müdürlüğü, Bozova/Şanlıurfa, TÜRKİYE

E-posta: oycasar@gmail.com