

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

Deniz TANRISEVER

**ADANA ATMOİFERİNDEN İZOLE EDİLEN KÜF
MANTARLARINDAN ALERJEN ÜRETİMİ**

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ADANA-2018

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ADANA ATMOSFERİNDEN İZOLE EDİLEN KÜF
MANTARLARINDAN ALERJEN ÜRETİMİ**

Deniz TANRISEVER

DOKTORA TEZİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Bu Tez 21/02/2018 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından
Oybirliği/Oyçokluğu ile Kabul Edilmiştir.

.....
Prof. Dr. Hatice KORKMAZ GÜVENMEZ
DANIŞMAN

.....
Prof. Dr. Derya UFUK ALTINTAŞ
ÜYE

.....
Prof Dr. Mustafa YILMAZ
ÜYE

.....
Yrd. Doç. Dr. Furkan AYAZ
ÜYE

.....
Yrd. Doç. Dr. Tuğba ARIKOĞLU
ÜYE

Bu Tez Enstitümüz Biyoloji Anabilim Dalında hazırlanmıştır.
Kod No:

**Prof. Dr. Mustafa GÖK
Enstitü Müdürü**

**Bu Çalışma Ç.Ü. Araştırma Projeleri Birimi (Proje No: FDK-2015-31) ve TÜBİTAK
BİDEB “2211-C Yurtiçi Öncelikli Alanlar Doktora Burs Programı” Kapsamında
Desteklenmiştir.**

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge ve
fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri
Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZ

DOKTORA TEZİ

**ADANA ATMOSFERİNDEN İZOLE EDİLEN KÜF MANTARLARINDAN
ALERJEN ÜRETİMİ**

Deniz TANRISEVER

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

Danışman : Prof. Dr. Hatice KORKMAZ GÜVENMEZ
Yıl: 2018, Sayfa: 107
Jüri : Prof. Dr. Hatice KORKMAZ GÜVENMEZ
Prof. Dr. Derya UFUK ALTINTAŞ
Prof. Dr. Mustafa YILMAZ
Yrd. Doç. Dr. Tuğba ARIKOĞLU
Yrd. Doç. Dr. Furkan AYAZ

Bu çalışmada, bölgesel (*Adana atmosferi izolatu*) küflerden deri delme (skin prick) testinde kullanılmak amacıyla test materyali üretilmiş ve standart alerjenler ile kıyaslanmıştır.

Cladosporium cladosporioides, *Cladosporium herbarum* ve *Alternaria alternata* olarak tanımlanmış örnekler PDA katı besiyerinde tek koloni düşecek şekilde, saf kültürler ise Czapek Dox sıvı besiyerinde 26°C’de 14 gün üretilmiştir. Elde edilen miseller filtre kağıdı ile toplanarak 1 gece kurutulup sıvı azot, ultra turrax, sonikatör ve dondur-çöz uygulamalarına tabi tutulmuştur. Son olarak liyofilizatörde 24 saat liyofilize edilmiştir. Ekstraktların protein miktarı Bradford yöntemi ile tayin edilmiştir. Her suşa ait ekstraktlar kolon kromatografisi ile fraksiyonlarına ayrılmıştır. Total ekstraktlar ve fraksiyonların protein bantları ile moleküler ağırlıkları %10’luk SDS-PAGE analizi ile saptanmıştır.

Üretilen test materyalleri Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk İmmünoloji ve Alerji Hastalıkları Bilim Dalı Kliniği’nde 37 hastaya uygulanmıştır. *Cladosporium cladosporioides* için 5 hastada, *Cladosporium herbarum* için 9 hastada, *Alternaria alternata* için 35 hastada hem standart hem de üretilen test materyali ile test sonucu pozitif sonuçlar alınmıştır. Bulgulara göre üretilen test materyalinin klinikte teşhis amaçlı kullanılabileceği önerilebilir.

Anahtar sözcükler: *Cladosporium* sp., *Alternaria* sp., Deri Delme Testi, Alerji

ABSTRACT

PHD THESIS

PRODUCTION OF SKIN TEST MATERIAL FROM ADANA ATMOSPHERIC ISOLATE MOLDS

Deniz TANRISEVER

CUKUROVA UNIVERSITY
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
DEPARTMENT OF BIOLOGY

Supervisor : Prof. Dr. Hatice KORKMAZ GÜVENMEZ
Year: 2018, Page: 107
Jury : Prof. Dr. Hatice KORKMAZ GÜVENMEZ
Prof. Dr. Derya UFUK ALTINTAŞ
Prof. Dr. Mustafa YILMAZ
Asst. Prof. Dr. Tuğba ARIKOĞLU
Asst. Prof. Dr. Furkan AYAZ

In this study, test material was produced of regional molds for use in skin prick test and compared with standard allergens. Samples identified as *Cladosporium cladosporioides*, *Cladosporium herbarum* and *Alternaria alternata* were cultured on PDA solid medium for the production of single colonies and the pure colonies were produced on Czapek Dox liquid medium at 26°C for 14 days. The obtained mycelium was collected with filter paper and dried for 24 h and subjected to liquid nitrogen, ultra turrax, sonicator, freeze-thaw applications. Finally, the extracts were lyophilized for 24 h. The protein content of the extracts was determined by the Bradford Method. Extracts of each strain was fractionated by Column Chromatography. Protein bands and molecular weights of total extracts and fractions were determined by 10% SDS-PAGE analysis.

The test materials produced were applied to 37 patients at the Department of Pediatric Immunology and Allergic Diseases Clinic of Çukurova University Medicine Faculty. In 5 patients for *Cladosporium cladosporioides*, test results were positive with both standard and produced test material, 9 patients for *Cladosporium herbarum*; positive with standard and test material, for *Alternaria alternata* in 35 patients; positive with standard and test material. It can be suggested that the test material produced according to the findings may be used clinically for diagnostic purposes.

Keywords: *Cladosporium* sp., *Alternaria* sp., Skin Prick Test, Allergy

GENİŞLETİLMİŞ ÖZET

Dünya nüfusunun %20-30'u alerjik hastalıklardan müzdariptir. Küfler alerjiye sebep olan en önemli kaynaklardan biridir. Bunlar yüzeyde üreyen aerobik mikroorganizmalardır. 18-32°C'lerde üreyebilseler de 6-60°C arasında canlılıklarını koruyabilirler. Küf sporları ve konidiaları susuzluğa ve kuraklığa karşı dayanıklıdır. Bu şartlar altında 1 yıl canlı kalabilirler.

Alternaria ve *Cladosporium* en yaygın dış ortam küfleridir. Bunlara en fazla maruz kalınan dönem; *Cladosporium* için Mayıs-Ağustos, *Alternaria* için Temmuz-Eylül aralığıdır. Adana'da her iki türe de en çok Mayıs-Ağustos döneminde maruz kalındığı saptanmıştır.

Mikroorganizmalar arasında bir takım biyolojik, fizyolojik ve ekolojik farklılıklar vardır. Dolayısıyla alerjik reaksiyona sebep olan lokal küflerden test materyali üretimi teşhiste daha doğru sonuçlar verecektir. Bu düşünceden yola çıkarak Adana atmosferinde en yaygın bulunan 2 tür; *Cladosporium* ve *Alternaria* üretimi ve bunları fraksiyonlarına ayırarak, hem total alerjen hem de fraksiyonlarından test materyali üretmek ve klinikte standart alerjenler ile karşılaştırmak amaçlanmıştır.

Cladoporium cladosporioides, *Cladosporium herbarum* ve *Alternaria alternata* olarak tanılanmış örnekler PDA katı besiyerinde tek koloni düşecek şekilde, saf kültürler ise Czapek Dox sıvı besiyerinde 26°C'de 14 gün üretilmiştir. Elde edilen miseller filtre kağıdı ile toplanarak 1 gece kurutulup sıvı azot, ultra turrax, sonikatör, dondur-çöz uygulamalarına tabi tutulmuştur. Son olarak liyofilizatörde 24 saat liyofilize edilmiştir. Ekstraktların protein miktarı Bradford yöntemi ile tayin edilmiştir. Protein miktarları sırasıyla; C.c: 0,84 mg/mL, C.h.: 1,826 mg/mL, A.a: 2,883 mg/mL olarak hesaplanmıştır. Her suşa ait ekstraktlar kolon kromatografisi (Sephadex G-100) ile fraksiyonlarına ayrılmıştır. 5'er mL'lik fraksiyonlar toplam 7 tüpte toplanmış ve 280 nm'de spektrofotometrede protein miktarları absorbans olarak ölçülmüştür. Sonuçlara göre C.c örneğinde ilk 4 (C.c-

1: 257 µg/mL, C.c-2: 130 µg/mL, C.c-3: 69,2 µg/mL, C.c-4: 43,2 µg/mL) C.h örneğinde ilk 4 (C.h-1: 563,6 µg/mL, C.h-2: 464,8 µg/mL, C.h-3: 470 µg/mL, C.h-4: 508,2 µg/mL), A. a örneğinde ilk 5 fraksiyonda (A.a-1: 723,8 µg/mL, A.a-2: 716,8 µg/mL, A.a-3: 472,6 µg/mL, A.a-4: 500 µg/mL, A.a-5: 507,2 µg/mL) farklı düzeylerde protein saptanmıştır. Total ekstraktlar ve fraksiyonların protein bantları ile moleküler ağırlıkları %10'luk SDS-PAGE analizi ile saptanmıştır. Sonuçlara göre; C.c; 147, 112, 100, 82, 76, 68, 62, 50, 24, 13, 10 kDa büyüklüğünde 11 bant, C.c-1, C.c-2, C.c-3, C.c-4; 67, 62, 57 kDa büyüklüğünde 3 bant, C.h; 156, 128, 80, 75, 71, 67, 34, 17 kDa büyüklüğünde 8 bant, C.h-1, C.h-2, C.h-3, C.h-4; 80, 72 kDa büyüklüğünde 2 bant, A.a; 123, 107, 84, 73, 67, 60, 54, 50, 25, 14 kDa büyüklüğünde 10 bant, A.a-1, A.a-2, A.a-3, A.a-4; 80, 74, 67 kDa büyüklüğünde 3 bant, A.a-5; 13 kDa büyüklüğünde 1 bant gözlenmiştir. 3 küf suşu ve onlardan elde edilen 13 fraksiyondan hazırlanan test materyalleri özel damlalıklı steril şişelere alınmıştır. Ç.Ü. Tıp Fakültesi Çocuk İmmünoloji ve Alerji Hastalıkları Bilim Dalı'nda küf alerji testi pozitif olan hastalara klinikte kullanılan alerjenlere paralel olarak uygulanmıştır. Test sonucunun değerlendirilmesi amacıyla pozitif kontrol olarak histamin, negatif kontrol olarak serum fizyolojik (SF) uygulanmış, sonuçlar 15 dk sonra değerlendirilmiştir. Kaynaklara göre hiperemi ve kabarıklık 2 mm ve üzeri olduğunda test sonucu pozitif olarak değerlendirilmektedir.

Üretilen test materyalleri Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk İmmünoloji ve Alerji Hastalıkları Bilim Dalı Kliniğinde 37 hastaya uygulanmıştır (6 aylık sürede kliniğe gelen).

Cladosporium cladosporioides için 5 hastada hem standart hem de üretilen test materyali ile test sonucu pozitif, 5 hastada test materyali ile negatif, *Cladosporium herbarum* için 9 hastada hem standart hem de üretilen test materyali ile test sonucu pozitif, 2 hastada test materyali ile negatif, *Alternaria alternata* için 35 hastada hem standart hem de üretilen test materyali ile test sonucu pozitif, 2 hastada test materyali ile negatif sonuçlar alınmıştır. Fraksiyonlarda ise *Cladosporium* örneklerinde genellikle negatif, *Alternaria* örneğinde ise daha çok

ilk iki fraksiyonda pozitif sonuçlar elde edilmiştir. Bulgulara göre üretilen test materyalinin klinikte teşhis amaçlı kullanılabileceği sonucuna varılmıştır.

Üretilen test materyallerinin bazı hastalarda negatif sonuç vermesi, alerjen konsantrasyonunun eşik değerin altında olmasından kaynaklanmaktadır. Satışa sunulmuş alerjenlerin standardizasyonu bilinmediğinden, bu çalışmadan sonraki basamak, test materyallerinin konsantrasyonunu artırarak, ülkemizde bölgesel hava kaynaklı küfler, gıdalar ve diğer alerjenlerden test materyali üreterek klinik kullanıma sunmak olacaktır.





TEŞEKKÜR

Yüksek lisans ve doktora eğitimim boyunca kıymetli bilgi, birikim ve tecrübeleri ile her zaman bana yol gösterici ve destek olan değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Hatice KORKMAZ GÜVENMEZ’e sonsuz teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Doktora tez izleme komitemde yer alan Sayın Prof. Dr. Derya UFUK ALTINTAŞ ve Sayın Prof. Dr. Mustafa YILMAZ hocalarıma çalışmama olan ilgi ve katkılarından dolayı saygı ve şükranlarımı sunarım.

Deri testleri uygulamalarında teknik bilgi ve desteğini esirgemeyen Sayın Nihal CESUR GÖKÇE’ye ve Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk İmmünoloji ve Alerji Hastalıkları Bilim Dalı hocaları ve çalışanlarına teşekkür ederim.

Doktora çalışmalarım boyunca yanımda olan laboratuvar arkadaşlarıma yardımları için çok teşekkür ederim.

Hayatım boyunca her konuda desteklerini hissettiğim, beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan sevgili annem Bahar TANRISEVER’e ve babam Naci TANRISEVER’e en derin sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Desteğini her zaman kalbimde hissettiğim hayat arkadaşım sevgili Şükrü BİLTEKİN’e varlığı için teşekkür ederim.

“2211-C Yurtiçi Öncelikli Alanlar Doktora Burs Programı” kapsamında tezimi destekleyen ve burs imkanı sağlayan TÜBİTAK Bilim İnsanı Destekleme Daire Başkanlığı’na (BİDEB) teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

SAYFA

ÖZ.....	I
ABSTRACT	II
GENİŞLETİLMİŞ ÖZET	III
TEŞEKKÜR.....	VII
İÇİNDEKİLER.....	VIII
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	XII
ŞEKİLLER DİZİNİ	XIV
SİMGELER VE KISALTMALAR	XVI
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Mantarların Genel Özellikleri.....	2
1.1.1. Mantarların Anatomisi.....	2
1.1.2. Spor Yapısı ve Gelişimi.....	4
1.1.3. Fungusların Beslenme Şekli	5
1.1.4. Fungal Üreme	6
1.1.5. Mantar Sistematiği.....	6
1.2. Atmosferik Funguslar.....	11
1.3. Fungal Alerjenler.....	11
1.3.1. Küfler.....	15
1.3.1.1. Küflerin Karakteristik Özellikleri.....	17
1.3.1.2. Alternaria sp.	19
1.3.1.3. Cladosporium sp.	24
1.4. Deri Delme Testi (Skin Prick Test)	26
1.5. Amaç	27
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	29
3. MATERYAL VE METOD	39
3.1. Materyal.....	39
3.1.1. Mantar Suşları	39

3.1.2. Kullanılan Kimyasallar.....	39
3.1.3. Kullanılan Besiyerleri.....	39
3.1.3.1. Potato Dextrose Agar (PDA) (Merck).....	39
3.1.3.2. Czapek Dox (CZ)	40
3.1.3.3. Kanlı Agar	40
3.1.3.4. Bradford Reagent.....	41
3.1.4. SDS-PAGE İşleminde Kullanılan Solüsyonlar	41
3.1.4.1. Solüsyon-A (Akrilamid Stok Solüsyonu).....	41
3.1.4.2. Solüsyon-B (4X Separating Jel Tamponu).....	42
3.1.4.3. Solüsyon-C (4X Stacking Jel Tamponu).....	42
3.1.4.4. AMPS (%10 Amonyumpersulfat)	42
3.1.4.5. Elektroforez Tamponu	43
3.1.4.6. Örnek Tamponu (1X Sample Buffer).....	43
3.1.4.7. TEMED (N, N, N', N'-tetramethylene-ethylenediamine).....	43
3.1.4.8. SDS-PAGE Boyama Solüsyonu (Coomassie Brilliant Blue- CBB R-250)	44
3.1.4.9. Jelden Boyayı Geri Alma (Destaining) Solüsyonu.....	44
3.1.4.10. İstenilen Konsantrasyonda (%X) Ayırıcı Jelin Hazırlanması.	44
3.1.4.11. Protein Marker (Promega, V849A, MW: 225-10 kDa).....	45
3.1.5. Ekipmanlar	45
3.2. Metod.....	45
3.2.1. <i>Cladosporium</i> ve <i>Alternaria</i> Suşlarından Mantar Ekstraktlarının Hazırlanması.....	46
3.2.2. Ekstraktların Protein Miktarının Saptanması.....	47
3.2.3. Kolon Kromatografisi.....	49
3.2.3.1. Sephadex G-100 Kolonu'nun Hazırlanması	49
3.2.3.2. Fraksiyonlama	50
3.2.4. SDS-PAGE Elektroforezi ile Moleküler Ağırlığın Belirlenmesi	50
3.2.4.1. Ayırıcı Jelin Hazırlanması (%10).....	50

3.2.4.2. Yığma Jelin Hazırlanması (%5)	50
3.2.4.4. SDS-PAGE Jelinin Boyanması	51
3.2.5. Deri Delme Testinde Kullanılan Test Materyalinin Hazırlanması	51
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	53
4.1. <i>Cladosporium</i> ve <i>Alternaria</i> Suşlarından Küf Ekstraktlarının Hazırlanması.....	53
4.2. Liyofilize Örneklerin Deneysel Aşamalarda Kullanılmak Üzere Hazırlanması.....	58
4.3. Alerjenlerin Protein Miktarının Saptanması.....	59
4.4. Kolon Kromatografisi.....	62
4.5. Fraksiyonların Protein Miktarının Saptanması.....	64
4.6. SDS-PAGE Elektroforezi ile Moleküler Ağırlığın Belirlenmesi	65
4.7. Kanlı Agarda Sterilite Kontrolü	69
4.8. Deri Delme Testi (Skin Prick Test)	71
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	85
KAYNAKLAR.....	91
ÖZGEÇMİŞ.....	103
EKLER	104



ÇİZELGELER DİZİNİ

SAYFA

Çizelge 1.1.	Spor yapısı.....	24
Çizelge 3.1.	BSA Kalibrasyon Grafiğinin Hazırlanması.....	48
Çizelge 4.1.	<i>C. cladosporioides</i> Fraksiyon Sonuçları	63
Çizelge 4.2.	<i>C. herbarum</i> Fraksiyon Sonuçları	63
Çizelge 4.3.	<i>A. alternata</i> Fraksiyon Sonuçları.....	64
Çizelge 4.4.	<i>Cladosporium cladosporioides</i> Deri Testi Sonuçları (Kontrol Grubu)	73
Çizelge 4.5.	<i>Cladosporium cladosporioides</i> Deri Testi Sonuçları (Hasta Grubu)	74
Çizelge 4.6.	<i>Cladosporium herbarum</i> Deri Testi Sonuçları (Kontrol Grubu).....	76
Çizelge 4.7.	<i>Cladosporium herbarum</i> Deri Testi Sonuçları (Hasta Grubu)	77
Çizelge 4.8.	<i>Alternaria alternata</i> Deri Testi Sonuçları (Kontrol Grubu)	79
Çizelge 4.9.	<i>Alternaria alternata</i> Deri Testi Sonuçları (Hasta Grubu)	80



ŞEKİLLER DİZİNİ

SAYFA

Şekil 1.1.	DNA Dizilemesine Dayanan Önemli Aeroalerjen Üretimi ile İlişkili 3 Mantar Filumunun Taksonomisi	8
Şekil 1.2.	Yaygın Alerjenik Funguslar A) Hava örneğinde <i>Cladosporium conidia</i> , B) <i>Alternaria conidia</i> , C) Hava örneğinde <i>Bipolaris conidium</i> , D) <i>Curvularia conidium</i> , E) Hava numunesinde <i>Epicoccum conidium</i> , F) Kültürden <i>Aspergillus fumigatus conidiophore</i> , G) <i>Penicillium solitum</i> kültürden konidiofor, H) Karışık basidiosporlar ve I) <i>Ustilago maydis</i> teliosporları.	9
Şekil 1.3.	Ortak Alerjik Mantarların Filogenisi Ve Alerjen Takson ile İlişkili Alerjenler Arasındaki İlişki. Kısmi Nükleus Sekanslarının Clustalx2 Kullanılarak Hizalanmasına Dayanan ve Treeview V1.6.6'daki Komşu Katılma Algoritması Kullanılarak Üretilen Filogenetik Ağaç.....	10
Şekil 3.1.	Liyofilizasyon aşamaları.....	47
Şekil 3.2.	Standart Protein Eğrisi.....	49
Şekil 4.1.	<i>C. cladosporioides</i> , <i>C. herbarum</i> ve <i>A. alternata</i> PDA'daki Koloni Morfolojileri.....	53
Şekil 4.2.	Czapek Dox Sıvı Besiyerinde Üremiş Küf Kültürleri (14 Gün).....	54
Şekil 4.3.	A. Küflerin Filtrasyon Sonrası Görüntüsü, B. Filtrasyonla Toplanan Misellerin Kurutulmuş Hali	54
Şekil 4.4.	Sıvı Azot Tankı ve Sıvı Azot İle Parçalanmış Toz Haldeki Küf Örneği	55
Şekil 4.5.	Ultra Turrax ve Sonikatör İle Parçalama İşlemi	55
Şekil 4.6.	Liyofilizasyon Uygulaması (0,0010 mbar Basınç Altında, - 82°C'de, 24 Saat).....	56
Şekil 4.7.	Liyofilize Örneklerin Deneylerde Kullanılmak Üzere Hazırlanması	58

Şekil 4.8.	Standart Protein Eğrisi	59
Şekil 4.9.	Örneklerin Protein Miktarı.....	60
Şekil 4.10.	Standartların Protein Miktarı	60
Şekil 4.11.	Sephadex G-100 Kolon Kromatografisi	62
Şekil 4.12.	Fraksiyonların Protein Miktarı (µg/mL)	65
Şekil 4.13.	<i>C. cladosporioides</i> , <i>C. herbarum</i> ve <i>A. alternata</i> 'nın SDS- PAGE Sonucu Moleküler Ağırlıkları.....	66
Şekil 4.14.	<i>C. cladosporioides</i> , <i>C. herbarum</i> ve <i>A. alternata</i> 'nın Fraksiyonlarının SDS-PAGE Sonucu Moleküler Ağırlıkları.....	67
Şekil 4.15.	<i>C.cladosporioides</i> 'e Ait Jel Görüntüsü.....	68
Şekil 4.16.	<i>C. herbarum</i> 'a Ait Jel Görüntüsü.....	68
Şekil 4.17.	<i>A. alternata</i> 'ya Ait Jel Görüntüsü.....	69
Şekil 4.18.	Tüm örnekler için Kanlı Agar'da Sterilite Kontrol Sonuçları	70
Şekil 4.19.	Hazırlanan Total Hücre Ekstraktları ve Fraksiyonları	71
Şekil 4.20.	Deri Testi Sonucu Hastada Oluşan Endürasyon ve Hiperemi Görüntüleri (2 Hasta Örneği)	72

SİMGELER VE KISALTMALAR

°C	: Santigrat derece
µg	: Mikrogram
A.a	: <i>Alternaria alternata</i>
BSA	: Bovine Serum Albumin
C.c	: <i>Cladosporium cladosporioides</i>
C.h	: <i>Cladosporium herbarum</i>
cm	: Santimetre
CZ	: Czapek Dox
Ç.Ü.	: Çukurova Üniversitesi
dk	: Dakika
g	: Gram
h	: Saat
IgE	: Immunoglobulin E
kDa	: Kilodalton
km	: Kilometre
L	: Litre
m	: Metre
m ²	: Metrekare
m ³	: Metreküp
mbar	: Milibar
MEA	: Malt Extract Agar
mg	: Miligram
mL	: Mililitre
mm	: Milimetre
nm	: Nanometre
OD	: Optik Dansite
PBS	: Fosfat Buffer Salın

PDA	: Potato Dextrose Agar
SF	: Serum Fizyolojik
sp.	: Tür
spp.	: Türleri
SPT	: Skin Prick Test (Deri Delme Testi)
β	: Beta



1. GİRİŞ

Atmosfer; su damlacıkları, polen mikroskopik ve sub-mikroskopik partikülleri, mantar sporları, toz, bakteri ve virüsler dahil olmak üzere çeşitli mikroorganizmaları içerir (Bhattacharjee ve ark, 2012). Biyolojik orijinli partiküller havayla taşınırken tek bir hücre ya da mikroorganizma kümeleri şeklinde olabilirler (Kasprzyk, 2008). Biyoaerosoller olarak isimlendirilen, atmosferde bulunan biyolojik materyaller; fungus sporları, bakteriler, virüsler, polenler, çeşitli hayvan ve bitki parçalarından oluşur (Jones ve Harrison, 2004; Bonetta ve ark, 2010). Havayla taşınan mikroorganizmalar bir ekosistemdeki esas biyolojik bileşenler olup, ekolojik denge ile direkt bir ilişki içindedirler ve doğadaki diğer birçok yaşam formları üzerinde çeşitli fonksiyonlara sahiptirler (Fang ve ark, 2005). Dünya atmosferinin çok fazla miktarda mikroorganizma ihtiva ettiği bilinmektedir. Bunların çoğu toprak, göller, hayvan ve insanlar gibi doğal ortamlardan kaynaklanmaktadır (Giorgio ve ark, 1996; Stepalska ve Wolek, 2009).

Atmosferde mevcut olan çeşitli biyolojik parçacıkların arasında, mantar sporlarının, çok önemli bir yeri vardır. Bu hava kaynaklı mantarlar ile ilgili çalışmalar, neden olduğu çeşitli hastalıklardan dolayı büyük önem taşımaktadır. Bunlar hafif tahrişten ciddi hastalıklara kadar insan sağlığı üzerinde olumsuz etkiler yapabilirler. Havadaki mikroorganizmaların varlığından kaynaklanabilen enfeksiyon örnekleri tüberküloz, kızamık, lejyoner, histoplazmoz, çeşitli mantar enfeksiyonları ve toksikozdur (Bhattacharjee ve ark, 2012).

Bitkiler aleminin “Mycota” bölümünde Myxomycotina ve Eumycotina olmak üzere iki alt bölümde yer alan mantarlar, daha sonraları “Protista” aleminin bir bölümü olarak kabul edilmiştir. Günümüzde ise ayrı bir alem “Fungi” olarak ele alınmaktadır. Her ne kadar mantarlar bir zamanlar bitkilerle gruplandırılmışlarsa da genel olarak beslenme şekilleri, yapısal organizasyonları, büyüme ve üreme açısından diğer ökaryotlardan farklıdır. Gerçekten de moleküler çalışmalar, mantarların en yakın akrabalarının bitkiler değil hayvanlar olduğunu göstermiştir

(Alexopoulos ve Mims 1979; Campbell ve Reece, 2010). Funguslar Eucaryota domaini içerisinde yer alan ökaryotik mikroorganizmalardır (Madigan ve Martinko, 2010).

1.1. Mantarların Genel Özellikleri

Funguslar nemli yerleri sevmelerine karşın, değişik habitat ve substratlarda da gelişebilme özelliğindedir. Bu nedenle dünyanın birçok yerinde; havada, karada, suda, bitkiler, hayvanlar ve insanların üzerinde bulunabilirler. Bazı funguslar mikroskopik, bazıları ise makroskopiktir (Asan ve ark, 2010).

Mantarlar ökaryotik canlılar olup klorofil içermeyen, spor oluşturan ve heterotrof yaşayan organizmalardır. Saprofit, parazit veya mikorizal olarak yaşarlar. Dağlar, ovalar, denizler, sulak alanlar, orman alanları, tarım alanları, çayır ve meralar bilhassa toprakların üst tabakaları çeşitli canlı türleriyle iskân edilmiş durumdadır. Biyosfer denilen dünyanın bu alanlarında yaklaşık 1.7 milyon canlı türü olduğu bilinmektedir.

Mantarlar, bitkiler ve bunlarla birlikte diğer tüm canlılar arasında karşılıklı ilişkiler, insanın müdahalelerine rağmen, bugünün flora ve faunasının var olmasında önemli katkılar sağlamıştır. Özellikle floranın evriminde mantarlardan mikorizal türlerin dahil olduğu *Glomeromycota* mensubu türler ile *Basidiomycota* ve az da olsa *Ascomycota*'ya ait türler önemli rol oynamışlardır. Bu açıdan bakıldığında mantarlar, birçok aktivitesi yanında özellikle çürükçül beslenme biçimleri ile yerkürede besin döngüsünün devamını sağlamakta olup, yaşamın devamlılığı için oldukça önemlidir. Toprakta yaşayan mantar türleri, bitkilerin ve birlikte yaşadıkları hayvanların tiplerini belirlemiştir (Liang, 2005). Mikorizal mantar çeşitliliği bitki çeşitliliğini, ekosistem çeşitliliğini ve üretkenliğini belirler (Song ve ark, 2010).

1.1.1. Mantarların Anatomisi

Mantarlar; **küfler, mayalar, basidiomycetes (şapkalı mantarlar)** olmak

üzere 3 temel gruba ayrılırlar. Çoğu mantarın vejetatif (beslenme açısından aktif) gövdesi, çoğunlukla, besin kaynaklarının dokuları içinde ve çevresinde yaygın bir şekilde organize olarak saklanmış durumdadır. Bir hücreli mayalar hariç, mantarların hücreleri 3-10 µm genişliğinde **hif** (tekil, hypa) olarak isimlendirilen ince dallanma iplikçiklerden oluşmuştur. Hifler, selüloz veya kitinle takviye edilmiş, iyi tanımlanmış duvarlara ve açık olmayan çekirdeklere sahip, plazma zarı ve sitoplazmayı kuşatan tüpsü çeperlerden oluşmuştur. Hifsel iplikçikler sıklıkla aralıklı septalar gösterirken Zygomycetes gibi diğer formlarda sitoplazmanın serbestçe akmasına izin veren çapraz duvarlar çok azdır veya hiç yoktur. Bir **miselyum** bir hif topluluğudur. Miselyum, bir mantarın “beslenme” şebekesidir. Bunların bazıları sırayla tomurcuk üretse de doğrusal bir psödo-miselyum oluştururlar. Hifler birçok mantarın üreme bölümlerini taşıyacak ve aynı zamanda "etli mantar"ların (Örn. mantar, kurtmantarı) yapısal dokularını oluşturacak şekilde modifiye edilmiştir. Önemli olan şu ki, misellerin doğal çevrelerinde tek bir fizyolojik ve ekolojik birimi var gibi görünmesine rağmen gerçekte genetik bir mozaiktir.

Mantarların çoğu çok hücreli olup, hifleri ortak çeperler ya da **septa** (tekil, **septum**) ile hücrelere bölünmüştür. Septumlar, genel olarak ribozom, mitokondri ve çekirdeklerin hücreden hücreye geçişine izin verecek büyüklükte deliklere sahiptir. Mantarların hücre çeperi, bitkilerin selüloz çeperlerinden farklıdır. Mantarların çoğunun çeperleri esas olarak **kitin**den yapılmıştır; bu kitin, böceklerin ve diğer eklembacaklıların dış iskeletlerinde bulunan kitine benzeyen, azotlu ve dayanıklı, fakat esnek olan bir polisakkarittir. Bazı mantarlar septumsuzdur; yani, bu tür mantarların hifleri ortak çeperlerle hücrelere ayrılmamıştır. **Senositik** olarak bilinen mantarlar, yüzlerce ya da binlerce çekirdek içeren ve süreklilik gösteren bir sitoplazma kütesinden oluşmuştur. Senositik durum, sitoplazma bölünmesi olmaksızın çekirdek bölünmesinin tekrarlanmasından kaynaklanmaktadır. Parazitik mantarların hiflerinin bir kısmı, çoğunlukla **emeç** olarak değişime uğramıştır. Haustoria, konukçunun dokusuna giren ve besin maddelerini absorblayan hif

uçlarıdır. Hatta hifleri, hayvanlar üzerinde beslenmeye uyum sağlamış mantarlar bile vardır.

Yapı ve işlev arasındaki ilişki biyolojinin temel konusudur. Miselyumun iplikli yapısı, mantara geniş bir yüzey alanı sağlar. Bu özellik absorpsiyonla beslenmeyi uygun hale getirir. Organik maddece zengin olan on santimetreküp büyüklükteki bir toprak, 1 km uzunluğunda hif içerebilir. Bu, mantar yüzeyinin, 300 cm²'den fazla bir toprakla temas ettiği anlamına gelir.

Bir mantarın miselyumu çok hızlı büyür. Miselyum bir besin kaynağının her yanında dallanarak her gün bir kilometre hifin ilave olmasını sağlar. Bu tür hızlı bir büyüme olasıdır; çünkü tüm miselyum tarafından sentezlenen proteinler ve diğer mineraller sitoplazmik akışkanlık yoluyla genişleyen hifin uçlarına gönderilir. Mantar enerjisini ve kaynaklarını, enine büyümek için değil hifin boyuna uzaması ve böylece toplam absorblayıcı yüzey alanının artırılması için harcar. Mantarlar hareketsiz organizmalardır; besin bulmak ya da çiftleşmek için hareket edemezler, yüzemezler ya da uçamazlar. Fakat miselyum, hareketin eksikliğini gidermek için hif uçlarını süratle yeni alanlara uzatır (Adkinson ve ark, 2009; Campbell ve Reece, 2010).

1.1.2. Spor Yapısı ve Gelişimi

Mantarlar seksüel ve aseksüel sporlarla çoğalırlar (her ne kadar hifal fragmentleri de çoğalabilirse de) ve spor taşıyan kısımlar fungusların sınıflandırılması için bir temel oluşturur. Eşeysiz sporların iki temel türü tanımlanır: Çoğu konidya, hifler veya konidiosporlar üzerinde oluşur; diğerleri ise ayrılmamış hiflerden kaynaklanmaktadır. Buna ek olarak, birçok mantar, interkaler hifal segmentlerin yuvarlanması ve yoğunlaşması sonucunda kalın duvarlı klamidoforlar üretir. Konidial oluşum şekilleri incelenmiş ve bir dizi kategori açıklanmıştır. Basit bölünme ve hiflerin duvar oluşumu ile artrosporların oluşumu gibi işlemlerin bazıları gözleme açıktır. Olgun sporlar, renkleri, boyutları, şekilleri ve yüzey dokuları ile tanımlanır. Diğer septasyon kategorileri; septası olmayan

(amerospor), bir septumlu (didymospores), iki veya daha fazla enine septalı (fragmospor) ve enine ve boyuna septalı (dictyospores) olarak tanımlar (Adkinson ve ark, 2009).

1.1.3. Fungusların Beslenme Şekli

Funguslar besinlerini diğer canlıların organik bileşiklerinden elde ederler, yani heterotrofturlar. Fotosentez yapamazlar. Bazı funguslar gübre gibi diğer organizma atıkları ve ölü organizma kalıntıları üzerinde saprofitik olarak beslenirler. Bir kısmı ise bitki, hayvan ve diğer fungusların canlı hücreleri üzerinde veya hücrelerin içinde parazitik olarak yaşarlar. Parazitik mantarlar, besinlerini canlı konukçusunun hücrelerinden absorblar. Parazitik mantarların bazıları hastalık yapıcıdır. Örneğin insan akciğerlerini enfekte eden belirli türler bunlar arasındadır. Patojenik mantarlar bitki hastalıklarının yaklaşık %80'inden sorumludurlar. Mutualistik mantarlar da besinlerini konukçu bir organizmadan absorblamakla birlikte, mutualistik ilişki kurdukları organizmaya bazı yollarla yarar sağlarlar. Örneğin, topraktan mineralleri alması için bitkilere yardım ederler. Mutualizmin son derece önemli bir diğer örneği de, bazı mantarların bitki kökleriyle ortak yaşayarak oluşturdukları “mikoriza”lardır. Çok yaygın olan bu oluşum, bitkilerin yaklaşık % 90'ında görülmektedir. Bu birliktelik sonucunda hem mantar hem de bitki karşılıklı fayda sağlar. (Graham ve ark, 2008; Tamer ve ark, 2008; Campbell ve Reece, 2010).

Funguslar besinlerini dışarıdan absorbsiyonla alırlar. Bu beslenme şeklinde, küçük organik moleküller ortamdan absorbe edilir. Bu durum monosakkaritler, aminoasitler gibi basit bileşikler için geçerlidir. Polimerler gibi kompleks bileşikler ise hücre dışında sindirir. Mantarlar çok çeşitli hidrolitik enzim sentezleme yetenekleri sayesinde, besinleri parçalayabilirler. Ekzoenzim olarak isimlendirilen bu enzimler; kompleks molekülleri, mantarların absorblayabileceği ve kullanabileceği daha basit bileşiklere parçalar. Bu bileşikler daha sonra ozmoz veya özelleşmiş taşıyım mekanizmalarıyla hücre içine alınırlar (Tamer ve ark,

2008; Campbell ve Reece, 2010).

1.1.4. Fungal Üreme

Funguslar eşeyli ve eşeysiz çoğalırlar. Her iki durumda da spor oluşturlar (Tamer ve ark, 2008). Sporlar çok büyük miktarlarda üretilir. Örneğin, küf mantarları gibi bazı mantarların üreme yapıları, trilyonlarca spor içeren toz bulutunu çevreye yayar. Rüzgarla ya da su ile taşınan sporlar, besin içeren nemli ortamlara yerleşince misel oluşturmak için çimlenirler. Böylece yayılma işlevi gören bu sporlar, pek çok mantar türünün geniş yayılışından sorumludur. Havaya saçılan mantar sporlarının yeryüzünden 160 km yükseklikte bile bulunabildikleri saptanmıştır (Campbell ve Reece, 2010).

Farklı morfoloji ve büyüklükteki fungus sporları atmosferde çok uzun süre asılı kalıp rüzgarla uzak mesafelere (4000 m yüksekliğe, 1450 km uzağa) taşınabilir. Bazı sporlar atmosferde yaklaşık 5 yıl canlılığını koruyabilmektedir. Sporların canlı kalması üreme ve patojenite yönünden önem taşırken, canlılığını yitirmiş sporlar bile insanlar için oldukça alerjen özellik gösterebilmektedir. Funguslar üremeyi garantiye almak için bol miktarda spor üretirler. *Penicillium* türlerinin 2,5 cm çapındaki kolonileri günde ortalama 400 milyon spor üretebilir. Bu durum fungusların çoğalması, patojenitesi ve alerjik etkileri açısından önem taşır. Bunun bir sonucu olarak atmosferdeki sayısı metreküp başına 20000-2 milyon olan mikroskobik mantar sporları deri ve solunum yolu hastalıklarının önemli bir nedeni olarak karşımıza çıkmaktadır. Dolayısıyla atmosferdeki spor konsantrasyonu özellikle alerjik duyarlılığı olan bireylerin sağlığını olumsuz etkilemektedir (Çeter ve Pınar, 2009; Gelişken, 2008).

1.1.5. Mantar Sistematigi

Mantarlar arasındaki filogenetik ilişkiler yakın zamana kadar belirsizdi. Sınıflandırma, cinsel durum morfolojisine dayanıyordu, bu nedenle açık cinsel bir aşamadan yoksun olan mantarlar, Deuteromycetes veya Fungi Imperfecti adı

verilen yapay, artık eskimiş bir kategoriye alındı. Son 20 yılda, 3'ü önemli aeroalerjenlerin üretimi ile ilişkili olmak üzere 8 fungus şubesinin DNA dizilimi ortaya konmuştur (Şekil 1). Sonuç olarak, Deuteromycetes kategorisi atılmış ve cıvık küfler (miksomycetes) ve su küfleri (oomycetes) gibi diğer mantar benzeri organizmalar diğer alemlere taşınmıştır.

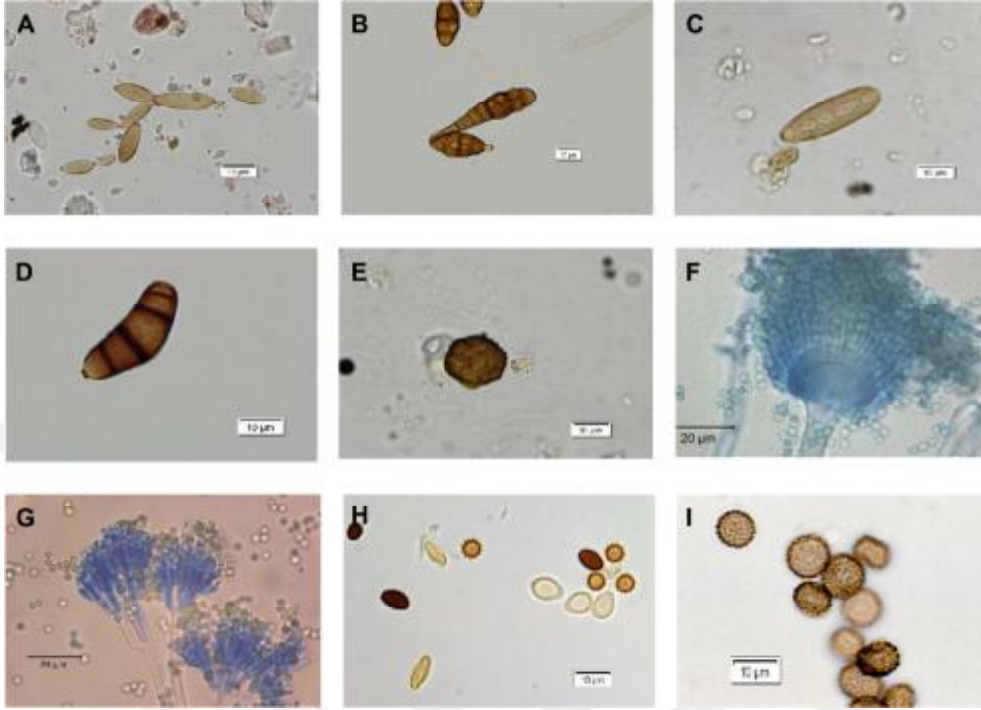
Mantarların sınıflandırılmasındaki gelişmeler, tanıdık bazı taksonlar için isim değişiklikleri yapılmasını gerektirir. Örneğin, *Penicillium notatum* artık eski adı değil ve eskiden bu isimle bilinen izolatlar artık *P. chrysogenum* ve *P. rubens* gibi yakından ilişkili türler olarak tanınmaktadır. Düzenleyici kısıtlamalar nedeniyle, birçok fungal alerjen özütü eski isimlerini korumuştur.

Zygomycota, Ascomycota ve Basidiomycota şubeleri havadaki mantar alerjenleri üreten mantarların çoğunu içerir (Şekil 2). Bu yeniden yapılandırmadan elde edilen en büyük fayda, mantarlara duyarlı hale gelen bireylerde özgül immünoglobülin E (IgE) düzeylerinin filogenetik ilişkileriyle yakından örtüşmesidir. Moleküler mantar sistematigi ve mantar türlerine karşı IgE duyarlılığı arasındaki bu yakın ilişki, çapraz reaktiviteye bakmak için sistematik bir yol sağlar ve her bir taksonun temsilcisinin gruba IgE için bir vekil görevi görmesine izin verir.

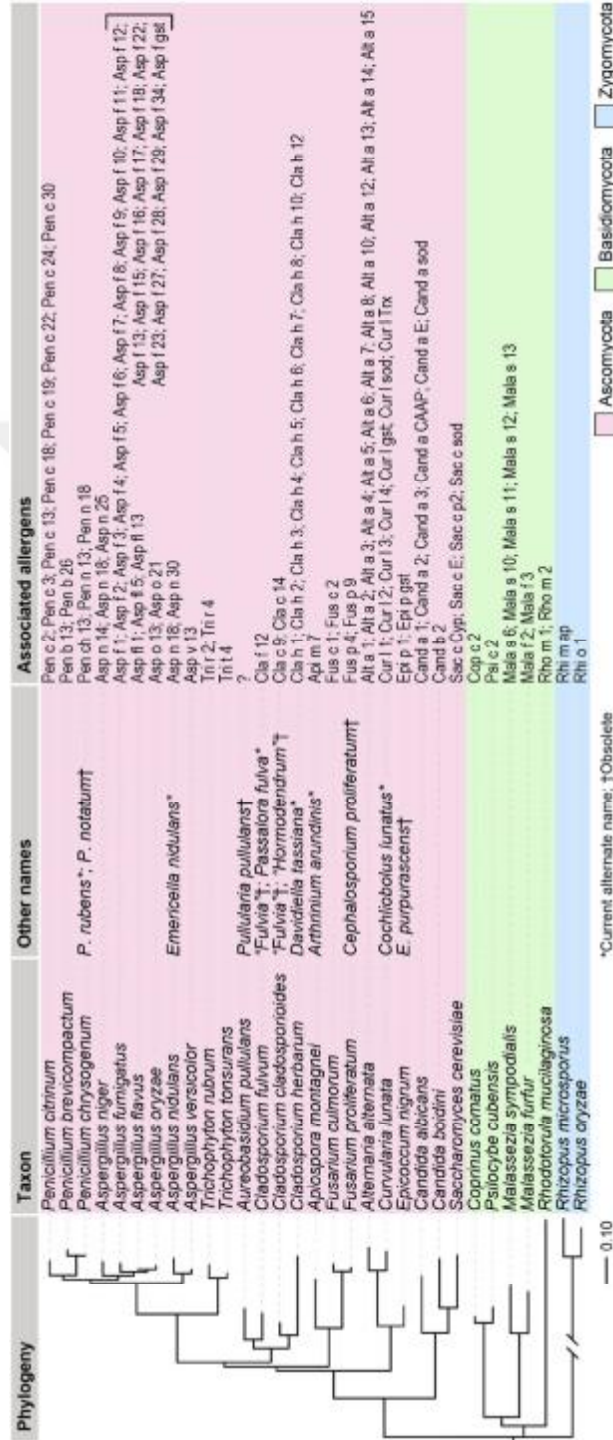
Aşağıda tanımlanan fungal cinslerin her biri, insanları olumsuz yönde etkileyebilecek, diğer bozukluklar arasında alerjik rinit ve astıma neden olan maddeler üreten türlere sahiptirler. Bu türlerden bir dizi fungal türevli alerjen tespit edilmiştir (Şekil 3, Tablo E1, www.jaci-inpractice.org adresindeki bu Çevrimiçi Repository'de mevcuttur) ve Uluslararası İmmünoloji Dernekleri Birliği (IUIS) terminolojisinde listelenmiştir (bkz. IUIS, Alerjen Proteinlerin Yapısal veritabanı, AllFam veritabanı ve Allergome veritabanı) (Levetin ve ark, 2016).

Phylum	Class	Order	Family	Genus
Zygomycota		Mucorales	Mucoraceae	Mucor Rhizopus
Ascomycota	Saccharomycetes	Saccharomycetales	Saccharomycetaceae	Candida Saccharomyces
			Dipodascaceae	Geotrichum
	Dothideomycetes	Capnoidiales	Davidiellaceae	Cladosporeum / Fulvia / Hemodendron
		Pleosporales	Pleosporaceae	Aitmania Curvularia Orchiloma Sporobolus Helminthosporium Stemphylium
			??	Phoma Eulocium
		Dothideales	Dothideaceae	Aureobasidium / Pulchella
	Eurotiomycetes	Eurodiales	Trichomonaceae	Aspergillus Penicillium
		Oryziales	Arthrodermataceae	Trichophyton Epidermophyton
	Sordariomycetes	Hypocreales	Nectriaceae	Fusarium
			Hypocreaceae	Trichoderma
			??	Stachybotrys
		Sordariales	Sordariaceae	Chrysomya (Monilia) / Neurospora
			Chaetomiaceae	Chaetomium
			??	Acremonium / Cephalosporium
	Leotiomycetes	Helotiales	Sclerotiniaceae	Botrytis
	??	??	Plectosphaerellaceae	Venturia
Basidiomycota	Microbotryomycetes	Sporidiobolales	??	Rhodosporia
	Ustilaginomycetes	Ustilaginales	Ustilaginaceae	Ustilago Sporisorium / Sphacelotheca

Şekil 1.1. DNA Dizilemesine Dayanan Önemli Aeroalerjen Üretimi ile İlişkili 3 Mantar Filumunun Taksonomisi



Şekil 1.2. Yaygın Alerjenik Funguslar A) Hava örneğinde *Cladosporium conidia*, B) *Alternaria conidia*, C) Hava örnekleminde *Bipolaris conidium*, D) *Curvularia conidium*, E) Hava numunesinde *Epicoccum conidium*, F) Kültürden *Aspergillus fumigatus* konidiophore, G) *Penicillium solitum* kültürden konidiofor, H) Karışık basidiosporlar ve I) *Ustilago maydis* teliosporları.



*Current alternate name; †Obsolete

Şekil 1.3. Ortak Alerjik Mantarların Filogenisi Ve Alerjen Takson ile İlişkili Alerjenler Arasındaki İlişki. Kısmi Nükleus Sekanslarının Clustalx2 Kullanılarak Hizalanmasına Dayanan ve Treeview V1.6.6'daki Komşu Katılma Algoritması Kullanılarak Üretilen Filogenetik Ağaç.

1.2. Atmosferik Funguslar

Yüksek ı ışık şiddeti, aşırı sıcaklık değışimi, düşük organik madde içeriği ve kullanılabilir suyun çok az miktarda olmasından dolayı atmosfer mikrobiyal üreme açısından aslında uygun bir ortam değildir (Şen ve Asan, 2009). Ancak, atmosferde çeşitli organizmalar ve bunlara ait sporlar değışik oranlarda bulunmaktadır. Atmosferdeki fungal spor sayıları, bölgeden bölgeye değışiklik göstermektedir (Boyacıoğlu ve ark, 2007). Farklı ortamlarda fungusların fazla miktarda olmalarının sebebi, küçük boyutlara sahip olmaları ve propagüllerin dağılım kolaylığı sayesinde. Böylece hem kapalı hem de açık ortamlarda fungal sporlar yüksek konsantrasyonda var olabilirler.

Funguslar, hemen hemen tüm karbon kaynaklarını kullanma yeteneğindedir. Uygun bir besin kaynağının olmasının yanında, üremeyi ve spor salınımını etkileyen diğer faktörler nem, sıcaklık, pH ve oksijen durumudur (Aringoli ve ark, 2008; Şen ve Asan, 2009). Fungal sporların yoğunluğu, coğrafik alanın özelliklerine, mevsimsel değışikliklere, rakım ve vejetasyon tipi, biyotik-abiyotik faktörlere bağlı olarak değışir. Ayrıca, sıcaklık, güneş, nem, yağış, kar, rüzgâr hızı gibi iklim koşulları da bir bölgenin atmosferinde bulunan fungusların nitelik ve niceliğini etkilemektedir (Aringoli ve ark, 2008; Kılıç ve ark, 2010).

1.3. Fungal Alerjenler

Alerjik hastalıklar 21. yüzyılın en önemli sağlık sorunlarından biridir. Özellikle gelişmiş ölkelerde, alerjik rinit ve astım vakalarının görölme sıklığında artış gözlenmiştir. Birçok çalışmaya rağmen, çevrenin alerjilerin klinik bulguları üzerindeki etkisi konusunda bir boşluk söz konusudur. Önerilen hijyen hipotezine göre, bazı viral veya bakteriyel enfeksiyonlarda azalma, aşılama ve antibiyotik kullanımı, alerjik hastalıkların gelişimine katkıda bulunan Th2 bağışıklık yanıtını ortaya çıkarmaktadır. Bu hipotez, erken yaşta alerjenlere azaltılmış maruz kalmanın yalnızca alerji duyarlılığı artırma eğilimi ile ilişkili olduğunu belirtmektedir. Hipotezin önemli unsurları arasında endotoksinlere maruz kalma,

evcil hayvanlara maruz kalma ve bir çiftlikte yetiştirme sayılabilir. Bununla birlikte, hijyen hipotezi tek başına alerjik hastalığın gözlenen artışı için yeterli bir açıklama sağlamamaktadır. İkincisinin pato-mekanizması hakkında hala birçok soru vardır. Bunun bir örneği, ev tozu akarı veya polen gibi tanınmış alerjenlere ek olarak, alerjik hastalıkları indüklemesindeki rollerini belirlemek için hala birçok alerjen araştırılmakta ve test edilmektedir. Bunlara mantarlar ve onlara karşı alerjilerin klinik belirtileri de dahildir (Bozek ve Pyrkosz, 2017).

Yaklaşık 1,5 milyon fungus türü olduğu tahmin edilse de yalnızca 80.000 kadarı tanımlanmıştır. Bunlardan 15.000-20.000'i makrofungus, 60.000-65.000'i ise mikrofungustur. Yeryüzündeki 80.000 fungustan 112 fungusun **alerjik** reaksiyona neden olduğu saptanmış olup, bunlardan 50'sine atmosferik çalışmalarda daha fazla rastlanmıştır (*Acremonium*, *Agrocybe*, *Alternaria*, *Ascobolus*, *Aspergillus*, *Boletus*, *Botrytis*, *Cercospora*, *Chaetomium*, *Cladosporium*, *Coprinus*, *Curvularia*, *Cylindrocladium*, *Dictyosporium*, *Didymella*, *Drechslera*, *Epicoccum*, *Exosporium*, *Fusarium*, *Ganoderma*, *Helminthosporium*, *Leptosphaeria*, *Melanomma*, *Melanospora*, *Monilia*, *Mucor*, *Mycelia*, *Myrothecium*, *Nigrospora*, *Oidium*, *Paraphaeosphaeria*, *Penicillium*, *Periconia*, *Peronospora*, *Pithomyces*, *Pleospora*, *Puccinia*, *Rhizopus*, *Rhodotorula*, *Scopulariopsis*, *Sporormiella*, *Stemphylium*, *Tetracoccosporium*, *Torula*, *Trichoderma*, *Ulocladium*, *Ustilago*, *Venturia* ve *Xylaria*).

Bu funguslardan Türkiye'de; Adana'da 34, Samsun'da 29, Kastamonu ve Ankara'da 35 tanesi saptanmıştır (*Agrocybe*, *Alternaria*, *Ascobolus*, *Boletus*, *Botrytis*, *Chaetomium*, *Cladosporium*, *Coprinus*, *Curvularia*, *Dictyosporium*, *Didymella*, *Drechslera*, *Epicoccum*, *Exosporium*, *Fusarium*, *Ganoderma*, *Leptosphaeria*, *Melanomma*, *Melanospora*, *Nigrospora*, *Oidium*, *Paraphaeosphaeria*, *Periconia*, *Peronospora*, *Pithomyces*, *Pleospora*, *Puccinia*, *Sporormiella*, *Stemphylium*, *Tetracoccosporium*, *Torula*, *Ustilago*, *Venturia*, *Xylaria*, 1-septalı askospor) (Çeter ve ark, 2008).

Funguslar iç ve dış ortamda oldukça fazla biyolojik çeşitliliğe sahiptir. Her türlü iklimde ve coğrafik bölgede yaygın olarak bulunurlar ve havada asılı duran biyopartiküllerin büyük bir bölümünde payları vardır. Bunlar duyarlı insanlarda aşırı duyarlılığa sebep olan ajanlardır. Dünya nüfusunun yaklaşık %20-30'unun alerjik rahatsızlıklardan muzdarip olduğu saptanmıştır (Kochar ve ark, 2014; Gofron ve ark, 2016).

Aeroalerjenler arasında fungal sporlar hava kaynaklı biyopartiküllerin çok sayıdaki fraksiyonlarını kapsarlar. Polen taneciklerinden sayıca bir hayli fazladır. Bu yüzden de Dünya Sağlık Örgütü hava kaynaklı funguslara maruz kalmayı halk için önemli bir sağlık riski olarak ifade etmiştir (Katotomichelakis ve ark, 2016).

Mantarlar çevrede oldukça yaygındır ve gerek sporları gerekse miselyum parçaları birer alerjen kaynağı olabilir. Bitkilerden farklılıkları nedeniyle “mantarlar” olarak bilinen ayrı bir alem içindedirler. Alerjik hastalıklar açısından, önemli tipler *Ascomycetes*, *Zygomycetes*, *Deuteromycetes* ve *Basidiomycetes*'dir (Bozek ve Pyrkosz, 2017). Bugüne kadar yapılan çalışmalar göstermektedir ki *Aspergillus* iç ortamda bulunan tipik bir küf türü iken, *Cladosporium* ve *Alternaria* dış ortamda bulunan en yaygın küflerdir. Öte yandan *Alternaria* ve *Cladosporium* oldukça fazla alerjiye neden olduğu için klinik olarak en fazla öneme sahip türlerdir (Katotomichelakis ve ark, 2016).

Bilinen 100.000 fungus türünden yalnızca birkaç yüz tanesi insanlarda hastalığa sebep olan fırsatçı patojenler olarak tanımlanmıştır. Bunu üç spesifik mekanizma ile gerçekleştirirler:

1. Konağa direk infeksiyonla,
2. Bağışıklık sisteminin zayıflaması/baskılanması sonucu,
3. Sekonder metabolitlere bağlı toksik etki ile.

Bunlar arasında 80 kadar küf cinsinin atopik bireylerde tip I alerjik reaksiyonu indüklediği gösterilmiştir. En önemli alerjik mantarlar *Alternaria*, *Aspergillus* ve *Cladosporium* cinslerine aittir. Öte yandan *Candida*, *Penicillium*, *Clavularia* ve farklı cinsler tarafından da alerji geliştiği görülmektedir. Literatürde tanımlanmış Ig E'ye bağlanabilen fungal protein sayısı 200 alerjeni geçmektedir ve tamamlanmak üzeredir. Çünkü alerjenlerin çoğunluğu pulmoner ve deri hastalıklarına sebep olan en önemli fungal türlerden elde edilmektedir. Bunların 23 tanesi *Aspergillus fumigatus*, 11 tanesi *Alternaria alternata*, 8 tanesi *Cladosporium herbarum* küfünden üretilmektedir. Bu alerjenlerin çoğu diğer fungal türlerde bulunan homolog proteinler ile çapraz aktivite gösterir (Crameri, 2015; Gofron ve ark, 2016).

Mantar sporları, alerji, astım, deri ve sistemik mantar enfeksiyonlarında çok önemli bir rol oynar ve bağışıklık sisteminde kolayca gelişebilen invaziv aspergilloz durumunda olduğu gibi zaman içerisinde ölümcül olabilir (Bhattacharjee ve ark, 2012).

Adana'da solunum yolu alerjisi gösteren çocukların %11,6'sında funguslara duyarlılık saptanmıştır (İnal ve ark, 2008). Avrupa ülkelerinde *Cladosporium* ve *Alternaria* duyarlılığının %3-30 olduğu saptanmıştır. Ankara'da *Cladosporium* ve *Alternaria*'ya duyarlılık erişkinlerde %14,8'dir (Bavbek ve ark, 2006).

Kapalı mekanlardaki fazla miktardaki hava kaynaklı mantar spor konsantrasyonları, hasta bina sendromu gibi sağlık sorunları ve fungal rahatsızlıklarla bağlantılı olması sebebiyle dikkat çekmektedir. Alerjenlerin, iritantların ve mikotoksinlerin üretiminden ortaya çıkan mantarların sebep olduğu olumsuz sağlık etkileri baş ağrısı, öksürük ve dermatit gibi belirtiler gösterir. Belirli fırsatçı mantar türlerine maruz kalan kişilerde, bağışıklık yetmezliği ile sonuçlanan ciddi mantar enfeksiyonları görülebilir (Torpy ve ark, 2013).

Mantarlar özellikle sıcak ve nemli evlerde tüm yıl boyunca üreme yeteneğine sahiptirler. Ev içinde yıl boyu bulunabilirlerse de, miktarları yaz ve sonbahar aylarında daha fazladır. İç ortam mantar düzeyi dış ortam mantar

düzeyinden etkilenmektedir. İç ortam mantar düzeyi hem iç hem de dış ortam mantar düzeyinin karışımı olarak değerlendirilir (Dickerson ve Li, 1998).

Yapılan çalışmalar havada bulunan küflerin konsantrasyonlarının mevsimsel özelliklere göre değiştiğini göstermektedir (Adhikari ve ark, 2006).

Toprakta bol bulunan, hatta organik madde ve su içeren tüm yüzeylerde hızla gelişip çoğalabilme yeteneğine sahip olan funguslar, değişik hava hareketleriyle geniş alanlara yayılırlar. Küfler her zaman ve her yerde bulunabilir, birçok maddeyi substrat olarak kullanarak üreyip ortamı istila edebilirler (Özyaral ve ark, 2007). Son zamanlarda havanın kimyasal ve fiziksel kirlenmesiyle fungal sporlar da artmıştır (Çetinkaya ve ark, 2005). Hem kapalı hem de açık mekanlarda bulunmaları nedeniyle fungus sporları aeroalerjenler arasında önemli bir yere sahiptir. Vücuda solunum yoluyla giren bu alerjenler en çok rinite, konjunktivite ve astıma yol açarlar, bazen çok nadir olarak ürtiker ve sistemik anafilaksiye neden olabilirler (Ren ve ark, 2001; Çetinkaya ve ark, 2005).

Küf alerjileri tüm dünyada önemli bir sorundur. Küfler geniş bir alerjen kaynağıdır. Mantar alerjenlerine maruz kalma ve hassaslaşma, alerjik hastalıkların gelişmesine ve kötüleşmesine neden olabilir. Literatürde birçok mantar türü alerjik hastalıklarla ilişkili olmasına rağmen, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Penicillium* ve *Aspergillus* küflerinin önemi iyi açıklanmıştır. Alerjik hastalıkların tedavisi için çeşitli yöntemler arasında alerjen spesifik immünoterapi (allergen-specific immunotherapy: AIT) özellikle önemlidir. Örneğin; immünoterapinin, alerjik riniti olan çocuklarda astım gelişme riskini azalttığı gösterilmiştir (Bozek ve Pyrkosz, 2017).

1.3.1. Küfler

Küfler hücre duvarı olan, klorofil ihtiva etmeyen (inorganik maddelerden organik bileşik sentezleme yetenekleri yoktur), sporları sayesinde seksüel veya aseksüel olarak yayılan ökaryotik organizmalardır. Organik maddelerin kaynağı canlı organizmalar ise parazit olarak değerlendirilirler. Bunun yanında odun, kağıt,

boya, toz, yemek artıkları, deri gibi cansız, nemli organik materyaller veya substratlardan bileşikler elde ediyorlarsa saprofitler olarak değerlendirilirler.

Dünyadaki biyokütle içerisinde küflerin payı %25'tir. Tüm mantarlar havada var olan veya suda çözünmüş olan oksijene ihtiyaç duyarlar. Küfler içerisinde mutlak anaerob olanı yoktur. Smith ve Nadim'in 1983'te yaptıkları çalışmada küflerin, parmak izlerinin olduğu renksiz düz cam üzerinde bile 2-3 haftada gelişebilme yeteneğinde oldukları bildirilmiştir. Üremek ve gelişmek için ihtiyaçları azdır, bu da onların organik materyal açısından oldukça zayıf oyuklarda bile kolonize olmalarına izin verir. Öte yandan bina materyalleri veya boya gibi organik madde açısından zengin materyaller küflerin gelişimi açısından muhteşem substratlardır. Küfler yerleşim yerleri ve iş yerlerinde yaygın olarak bulunurlar ve literatür bilgilerine göre yerleşim binalarının içinde 400'den fazla fungus türü olduğu bilinmektedir. Bu nedenle iç mekan havası sıklıkla aşırı derecede küf sporu ile kontamine olmaktadır (Żukiewicz-Sobczak ve ark, 2013).

Evlerde nem ve buna bağlı olarak küf gelişimi artan bir sıklıkla solunum sistemi semptomları ile ilişkilendirilmiştir. Alerjen, toksin ve uçucu bileşenlerin üretimi ile astımın ve küf hücre duvarı ürünlerine maruz kalma ile desteklenen diğer spesifik olmayan inflamatuvar mekanizmaların gelişiminde küfün etkisi olabilir. Nem; toz, mayt ve küflere karşı hassasiyete bağlı olarak solunum sistemi semptomlarıyla ilişkilidir. Dünya çapında sayısız çalışma yürütülmüş ve 80'den fazla çevresel küf cinsi solunum sistemi bozuklukları ile ilişkilendirilmiştir. *Cladosporium* spp., *Aspergillus* spp. ve *Penicillium* spp. en sık tanımlanan türlerdir. Sporlardaki alerjen etkinin varlığından dolayı bütün küflerin duyarlı insanlarda alerjiye yol açabilecek potansiyele sahip olduğu düşünülmektedir. Artan konsantrasyonları ile solunan mantar sporları arasındaki ilişki, küf antijenleri ve solunum sistemi alerjilerinin (rinit ve astım) tetiklenmesi iyi bir şekilde anlaşılmasına rağmen bu hastalıkların patojenitesindeki rolü hala net değildir (Galante ve ark, 2006).

1.3.1.1. Küflerin Karakteristik Özellikleri

Küflerin gelişiminde optimum koşullar yüksek nem ve mantar üremesine uygun besi ortamıdır. Buna rağmen *Aspergillus* ve *Penicillium*'un kserofilik türlerinin çoğu oldukça kuru ortamlarda hayatta kalmayı başarmaktadır. Küf sporları ve konidiaları su yokluğuna ve kuraklığa karşı dirençlidir ve bu koşullar altında 1 yıl canlı kalabilirler. Küfler çoğunlukla yüzeyde üreyen aerobik mikroorganizmalardır. Bu organizmalar için karbon kaynağı farklı bileşikler olabilir. Küflerin üreyebileceği sıcaklık aralığı 18-32°C olmasına rağmen 6-60°C aralığında canlı kalabilirler.

Küfler binlerce kilometre yayılabilen ve stratosferde bile rastlanabilen oldukça fazla sayıda spor üretirler. Çok küçük boyuttaki (3-10 µm) spor bile bronşiyal bölgeye derin bir şekilde nüfuz edebilir ve böylece küf alerjisinin başlangıcına neden olabilir. Sporum yayılımı fungusun tipine bağlı olduğu kadar hava koşullarına da bağlıdır. Dış ortamdaki spor miktarı arttıkça evsel ortamdaki konsantrasyon da artar. Birçok çalışma artan düzeydeki fungal sporlar ve antijenler ile alerji semptomlarının varlığı arasında belirgin bir ilişki olduğunu göstermektedir (Żukiewicz-Sobczak ve ark, 2013).

Küfler tarafından ortaya çıkarılan hipersensitivite reaksiyonlarının klinik spektrumu çok geniştir. IgE aracılı tip I alerjilere ek olarak, II, III ve IV tipi reaksiyonlar mevcuttur. Klinik olarak, küf alerjenlerine IgE aracılı sensitizasyon, alerjik rinit ve rinosinüzit, atopik dermatit ve alerjik astım olarak ortaya çıkabilir (Bozek ve Pyrkosz, 2017).

Araştırmalara göre; en alerjen olanlar miselyum ve mikotoksinlerin sekonder metabolitlerce zengin sporlardır. Miselyumların yüzeyindeki su damlaları en yüksek konsantrasyondaki patojenik metabolitlerin kaynağıdır. Bazı küfler çok sayıda toksin üretirler ve bazı toksinler de birden fazla fungus türü tarafından üretilir. Ana toksinler; aflatoksin (AF), okratoksin A (OT), zearalenon (ZEN), trikotesen ve fumonisin (F)'dir. Mikotoksinler çok yönlü aktiviteler ile karakterizedir: mutajenik, nörotoksik, immünosupresif ve karsinojenik. İnsanlar ve

hayvanlar için en büyük risk taşıyan filamentli fungus cinsleri; *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Stachybotrys*, *Alternaria* ve *Cladosporium*'dur. Bugün, insan sağlığı üzerinde yan etki oluşturan minimum mikotoksin konsantrasyonu ve minimum maruz kalma süresi hala bilinmemektedir (Żukiewicz-Sobczak ve ark, 2013).

Alternaria, *Cladosporium*, *Botrytis*, *Epicoccum* ve *Fusarium*, dış ortamda yaygın olan mantarlardır. Havadaki varlıklarına ek olarak, toprakta, bitkilerde ve besinlerde, özellikle sebze ve meyvelerde bulunurlar. Dış ortamda *Alternaria* ve *Cladosporium* cinsleri egemendir. En fazla maruz kalındıkları dönem ilkbahardan yaza veya sonbahara kadar olan dönemdir. Mayıs-Ağustos ayları özellikle *Cladosporium* sporlarına, Temmuz-Eylül ayları ise *Alternaria* sporlarına yüksek maruz kalınan zamanlardır. Örneğin, bu dönemde orta Avrupa'da, alerjik hastalarda, teneffüs ettikten sonra rinit ve konjonktivit ve / veya astım şeklinde alerjilere neden olabilirler (Gofron ve ark, 2016; Bozek ve Pyrkosz, 2017).

Aspergillus ve *Penicillium* tipik iç ortam küfleridir. Yüksek nem varlığında, iyi aydınlanma ve iyi havalandırma olmadığında yoğun ürerler. Ev ortamında, yıl boyunca alerji kaynağı olan *Aspergillus*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Mucor* ve diğerleri gibi yüksek oranda alerjen içeriği söz konusudur. Astım ve alerjik rinitin yanı sıra, küflere alerjik hastalar alerjik bronşiyal pulmoner aspergilloz, alerjik alveolit, kronik alerjik sinüzit ve hatta alerjik dermatitten muzdarip olabilir. Bazıları, özellikle bazı peynir, şarap, et, meyve suları vb. bazı besinlerde bulunan mantar alerjenlerinin alımından sonra anafilaktik reaksiyonlar gibi sistemik reaksiyonları da tetikler. Küf, prevalansı nedeniyle, kontakt dermatit, mesleki astım veya daha önce bahsedilen solunum yolu alerjisi gibi çiftçiler, bahçıvanlar, ormancıları ve diğer meslekleri etkileyebilecek mesleki hastalıklardan sorumlu olabilir. Buna ek olarak, *Candida* veya *Triphophyton* cinsi bazı mantar türleri, insanlarda uzun süreli tedavi gerektiren bulaşıcı hastalıkları tetikleyebilir. Literatüre göre, *Alternaria*, *Cladosporium* ve *Aspergillus*'a karşı olan alerjiler en yaygın olanlardır. Alerjik rinit ve bronşiyal astım, alerji hastaları arasında çok sık

karşılaşılan hastalıklardır. Dahası, küfe alerjisi olan hastaların daha şiddetli astıma sahip olduğunu gösteren veriler vardır (Bozek ve Pyrkosz, 2017).

Küf alerjileri, insan nüfusunun %3-40'ını etkiler ve bu seviye, ülkeye, bölgeye, cinsiyete, yaşa ve diğer faktörlere bağlı olarak değişir. Şu ana kadar, 18 küf türünden izole edilen 78 alerjen, kimyasal yapı, nükleotid dizilimi ve hücresel işlev açısından karakterize edilmiştir (Uluslararası Bağışıklık Dernekleri Birliği (DSÖ / IUIS) Alerjen İsimlendirme Alt Komitesi). Bu 18 tür şu cinslere aittir: *Alternaria*, *Cladosporium*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Curvularia*, *Epicoccum*, *Stachybotrys* ve *Trichophyton* (Skóra ve ark, 2015).

Cladosporium herbarum ve *Alternaria alternata* türleri alerjiye neden olan mikrofungusların başında gelmektedir. Şimdiye kadar tespit edilmiş alerjenlerin büyük bir kısmı *C. herbarum*'un hücre içi proteinleridir (Breitenbach, 2002).

1.3.1.2. *Alternaria* sp.

Alternaria Nees eski Wallroth cinsi Ascomycota filumuna aittir (www.mycobank.org). Tüm iklim bölgelerinde bulunan Dothideomycetes sınıfının kozmopolit koyu renkli mantarlarını içerir. Türlerin üyeleri geniş bir sıcaklık aralığını tolere eder, ancak en bol spor üretimi ve miselyum gelişimi 22-28 °C'de görülürken, büyüme ve gelişme 0°C'nin altındaki sıcaklıklarda neredeyse hiç görülmez. Laboratuvar koşullarında, sporülasyon 8-24°C'de gerçekleşir ve konidyalar, başlangıçlarının 14-24. saatlerinde tamamen olgunlaşırlar. Simmons (2008) sadece morfolojiye dayanılarak, *Alternaria* cinsini, kimlik kılavuzunda ayrıntılı olarak tanımlanan 276 türle ifade etmiştir. Son zamanlarda, Woudenberg ve arkadaşları (2013), cins içindeki tür tanımlamasını yeniden tanımlamak için 18S nükleer DNA, 28S nükleer DNA, iç transkripsiyonlu ayırıcı, gliseraldehit 3-fosfat dehidrojenaz, RNA polimeraz II (RPB2) ve translasyon uzatma faktörü 1 alfa (TEF-1α) gen bölgelerinin fragmanlarından nükleotid dizisi verilerini kullanmıştır. Bu temelde, *Alternaria* tür kompleksi bölümler olarak adlandırılan 24 iç tabaka ve altı monotip çizgi içermektedir. Bu çalışmanın sonucunda *Allewia*, *Brachycladium*,

Chalastospora, *Chmelia*, *Crivellia*, *Embellisia*, *Lewia*, *Nimbya*, *Sinomyces*, *Teretispora*, *Ulocladium*, *Undifilum* ve *Ybotromyces* cinsleri *Alternaria*'nın eşanlamlısı olarak önerilmiş ve böylece Hoog ve Horre (2002)'nin sadece ITS dizilerine dayanan sonuçları daha da genişletilmiştir. Çoğu durumda, *Alternaria* türleri zorunlu ya da fakültatif patojendir. Ayrıca saprofitler veya endofitler olarak büyüyebilir ve toprak, bitkiler, organik maddeler, tekstil, sıva veya ahşap gibi su ve substratlardan izole edilebilirler (Kasprzyk ve ark, 2015).

Alternaria spp. çeşitli sekonder metabolitlerin, özellikle toksinlerin en tanınmış üreticileri arasındadır. *Alternaria*'ya ait 70'den fazla küçük molekül bileşiği bildirilmiştir. Bu metabolitlerden bazıları, mutajenik ve teratojenik özelliklere sahip güçlü mikotoksinlerdir (Örn., Alternariol, alternariol metil eter, tenuazonik asit vb.) ve bazı kanser formlarıyla bağlantılıdır. Gıda ve gıda ürünlerinde potansiyel olarak zararlı *Alternaria* metabolitlerinin görülmesi gittikçe artan bir çevre kaygısı haline gelmektedir. Diğer toksinler, konağa özgü veya konağa özgü olmayan fitotoksinlerdir ve bitki patogeneğinde önemli virulans faktörleridir. Bugüne kadar, bu özel metabolitlerin üretilmesinden sorumlu genlerin birçoğu bilinmemekle birlikte, kısa süre önce, *A. alternata*'daki toksin Alternariol ve Alternariol metil eterin yanı sıra, *A. brassicicola*'da HDAC inhibitörü depudesin'in üretilmesinden sorumlu genler açıklanmıştır. Açıklanan genom dizisi bilgileri bu bulgular için kritiktir (Dang ve ark, 2015).

Bitki patojen türleri ve saprofitleri ciddi ekonomik tarımsal kayıplara neden olur. Enfekte patatesler, yağlı tohum posaları veya tahıllar daha az yumru kök veya tohum üretirler. İlgili *Alternaria* türlerinin sporulasyonu, ürün kalitesini düşürür ve taşıma ve depolama sırasında tarım ürünlerinin yanı sıra gıda bozulmasına neden olur. *Alternaria* türleri insan sağlığını da olumsuz yönde etkileyebilir. Atopik insanların % 12-42'sinin küfe duyarlı olduğu ve hastaların yaklaşık %70'inin hava örneklerinde *Alternaria* sporlarının varlığına tepki verdiği tahmin edilmektedir. 10 tür *Alternaria* alerjeni tanımlanmış olsa da, en zararlı olanı ve sık bildirileni, Alt a1

olarak adlandırılan 31 kDa'luk bir glikoproteindir (Kasprzyk ve ark, 2015; Dang ve ark, 2015).

Alternaria konidiaları, birçok Avrupa ülkesinin uzun süreli fungal hava sporlarında göze çarpan özelliktedir. Coğrafi konum, nem, denizden uzaklık, iklim bölgesi (enlem) ve jeobotanik koşulların hava kaynaklı fungal sporların günlük konsantrasyonları üzerine etkisinin yanı sıra bu sporların süresi, tarihleri ve dalgalanmalarında da dikkat çekici farklılıklar gözlenmiştir. İsveç ve Danimarka'da, *Alternaria* sporlarının havada yüksek konsantrasyonda bulundukları süre kısadır. En yoğun konsantrasyon Ağustos'un ilk yarısından Eylül'ün ortasına kadar olan dönemdir. Orta ve batı Avrupa'da spor konsantrasyonları Kuzey Avrupa'dakinden daha yüksektir ve Nisan ayı ortasından itibaren kademeli olarak yükselme göstermiştir. Eylül sonuna kadar yüksek veya nisbeten yüksek seviyelerde kalmıştır. En yüksek konsantrasyonlar genellikle Temmuz ve Ağustos aylarında kaydedilmiştir (Kasprzyk ve ark, 2015).

Genellikle saprofitik kirleticiler olarak kabul edilse de, *Alternaria* çeşitli hastalıklardan sorumlu tutulmaktadır. Astım gelişimi ve alevlenmesinde *Alternaria* kaynaklı alerjilerin rolü daha sık gözlenmektedir. (Kustrzeba-Wójcicka ve ark, 2014).

***Alternaria alternata*:** *Alternaria* cinsinin daha yaygın türü olan *Alternaria alternata*, sporları dünya genelinde görülen bir mantar türüdür. Yıl boyunca sporlar topraktaki organik bileşenlerde bulunabilir. İlkbahardan sonbahara kadar hava yoluyla taşınırlar ve bu nedenle daha yaygın olarak bulunurlar (Kustrzeba-Wójcicka ve ark, 2014).

Önceki çalışmalar, *Alternaria alternata*'nın şimdiye kadar incelenenler arasında en alerjik tür olduğunu göstermiştir. Bu türün yüksek alerjenitesinin, bu küf tarafından üretilen proteolitik enzimlerin bir sonucu olan solunum yolu epitelindeki morfolojik değişikliklerden kaynaklandığı öne sürülmüştür. 1 m³ havada 100 çeşit *Alternaria alternata* varlığının, bu türe duyarlı hastalarda alerjik

belirtilerin ortaya çıktığı eşik konsantrasyonu olduğu tahmin edilmektedir (Skóra ve ark, 2015).

Taksonomi

Kingdom: Fungi

Phylum: Ascomycota

Class: Dothideomycetes

Order: Pleosporales

Family: Pleosporaceae

Genus: *Alternaria*

Species: *Alternaria alternata*

Tarihi: *Alternaria alternata* önce bilim dünyasında *Alternaria tenuis* adı altında bilinmekteydi. 1817'de, Christian Gottfried Daniel Nees von Esenbeck (1776-1858), *Alternaria* cinsini belirlemiş ve *A. tenuis*'i tür olarak tanımlamıştır (Kustrzeba-Wójcicka ve ark, 2014).

Morfoloji: Siyah pigmentli (melanin nedeniyle) küf ailesine ait *A. alternata*, gri ile zeytin veya kahverengi arasında değişen koyu renklerde hızlı büyüyen koloniler oluşturur. Olgun kolonilerin yüzeyleri çok sayıda hifin varlığına bağlı olarak "bulanık", "ince tüylüden yünlüye doğru" ya da "süet gibi" görünebilir. Konidia, ya tek ya da zincirler oluşturan, basit ve büyük, 45-50×36 µm boyutludur. Doğal habitatlarda konidyanın daha büyük, daha düzgün ve agar besiyerinde üretilenler ile karşılaştırıldığında uzatılmış iplikçiklere sahip olduğu kaydedilmiştir. Daha serin ve kuru koşullarda üretilen konidyalarda iplikçikler daha kısadır. Hücreler, kitin ve β-1,3-glukanlardan oluşan hücre duvarlarıyla çevrilidir. *A. alternata*, kuru, nispeten büyük sporlar (25-56×8-17 mikron) üretir; bunlar "gagaya benzer", uzunlamasına ve transversal olarak bölünürler. Sporlar, hem pasif olarak, hem de daha güçlü rüzgarların etkisi altındaki kuru havadaki konidyofordan ayrılırlar.

Aşağıdaki ölçümler genel olarak geçerlidir:

5-13 nm'den 6-24 nm'ye kadar olan sporun maksimum genişliği, ortalama 9-17 nm; spor uzunluğu 16-37'den 35-110 nm'ye kadar olanınki ortalama 37-69 nm; 0 ila 23 arası enine septum sayısı; gaga uzunluğu 4 ila 90 nm; ve konidyofor uzunluğu 20 ila 300 nm arasındadır (Kustrzeba-Wójcicka ve ark, 2014).

Alternaria alternata tarafından üretilen temel alergen, 30 kDa (dimer) molekül ağırlığına sahip Alt a 1 glikoproteinidir. Bu glikoprotein, SDS-PAGE analizinde 16,4 ve 15,3 kDa'lık iki ayrı bant olarak ayrılarak monomerlerin bir disülfid bağı ile bağlandığını düşündürmektedir. Alt a 1, küf sporlarının ve miselyumun sitoplazmasında saptanır. Alt a 1, *Alternaria*'ya duyarlı hastaların %95'inden fazlasında IgE aracılı aşırı duyarlılığa neden olur. Ayrıca, *A. alternata* ekstraktlarındaki alerjenlerin sayısının 10 ila 30 arasında değişebileceği ve incelenen hemen hemen tüm ekstraktlarda birkaç alergenin mevcut olduğunu da eklemek gerekir (Skóra ve ark, 2015).

Ekoloji: *A. alternata* mantarları "dış mekan" küfleri olarak sınıflandırılır. *Alternaria* hem saprofitik, hem de parazitik beslenme yapabilen türlere sahip bir küf cinsidir. Saprofitik türler bitkilerde, topraklarda ve gıda maddelerinde bulunabilir. Paraziter türler, bitkiler, hayvanlar ve insanlarda enfeksiyonlara neden olabilir. Özellikle bağışıklığı baskılanmış hastalarda görülen bir çeşit mycosis, alternaryoz gelişimine neden olur. *A. alternata* bir mesohigrofildir. Ren ve arkadaşları (1998) tarafından yapılan bir araştırma %84-89 ve 97 nemli koşulların hem fungusların üremesini hem de mikotoksinlerin üretimini kolaylaştırdığını göstermiştir. Sporlar, havaya uçabilmesi ve yayılması için kuru, sıcak ve rüzgarlı hava gereklidir; böylelikle havadaki spor sayısı, yaz sonlarında ve sonbahar başında güneşli öğleden sonraları boyunca en üst seviyeye çıkar ve kış boyunca sifıra düşer. *A. alternata* 2-32°C arasındaki sıcaklıklarda hayatta kalmasına rağmen optimum sıcaklığı 20°C civarındadır. *Alternaria* tarafından üretilen ve gıda maddelerinde bulunabilen ana mikotoksinlerden biri olan "alternariol" sentezi için, optimum sıcaklık 20°C'dir (Kustrzeba-Wójcicka ve ark, 2014).

Medikal Önemi: *Alternaria* türleri, bitkiler için toksik olan birçok metabolit üretir; bunların bazıları hayvanlara ve insanlara karşı da toksiktir. Bununla birlikte, Edmondson ve arkadaşları (2005) "toksik küf sendromu"nu incelediğinde, çalışılan gruptaki belirtilerin başlıca nedeni olarak toksik olmayan, alerjik yanıtlar bulmuşlardır. Simon-Nobbe ve arkadaşları (2008), "polenlerin aksine fungal sporlar ve/veya misel hücreleri, sadece küflerin neden olduğu en yaygın hastalık olan tip I alerjisine değil aynı zamanda çok sayıda diğer hastalıklara da neden olabilir: Alerjik bronkopulmoner mikozlar, alerjik sinüzit, aşırı duyarlılık pnömonisi ve atopik dermatit; ve yine polen türevi alerjilerin aksine mantar alerjileri sıklıkla alerjik astım ile bağlantılıdır" (Kustrzeba-Wójcicka ve ark, 2014).

1.3.1.3. *Cladosporium* sp.

Dünyanın birçok yerinde, *Cladosporium*, havadan izole edilen en yaygın fungal bileşen olup, genellikle kaydedilen sporların %30-85'ini oluşturmaktadır. Doğada ve insan yapımı inşaatlarda ve objelerde geniş bir yelpazede habitat ve ortamlarda üremesine rağmen, anamorfik mantar sınıfından bu küf en sık sarı veya çürümüş yapraklar üzerinde, otsu ve odunsu bitkilerin sap ve dallarında ortaya çıkar. Normalde bir veya iki hücre halinde olan ve kolayca parçalanabilen uzun, dallanmış zincirlerde bulunan küçük mantar sporları (konidya) oluşturularak çoğalır.

Çizelge 1.1. Spor yapısı

Boyut	Şekil	Renk	Yüzey Dokusu
3-70 x 2-56 µm	Yuvarlak	Siyah	Pürüzsüz
	Varilimsi	Zeytin	Kaba
	Ovoid	Kahverengi	Parlak
	Elipsoid	Koyu Gri	
	Hafifçe uzamış	Koyu yeşil	
		Hiyalin	

Atmosfere aktif ya da pasif olarak salınırlar ve uzun mesafelerde çok sayıda rüzgarla dağılırlar. Birkaç saatten birkaç güne kadar değişen sürelerde havada asılı kalabilirler. Yüksek oranda heterojen olan *Cladosporium* cinsi 700'den fazla ismin altında rapor edilmiş ve 500'den fazla farklı türü içerir. Ilıman ve soğuk iklimlerde açık havada en yaygın olarak tanımlanan *C. herbarum*'dur. Kalın duvarlı ve verrukat konidya ile karakterizedir. Tersine, *C. cladosporioides* (pürüzsüz duvarlı konidyalı) sıklıkla kapalı mikofloraya hakimdir (Sindt ve ark, 2016).

Cladosporium cinsi üyeleri, konidiyojenik lokusların ve konidial hilanın benzersiz bir koronat yapısı ile karakterize edilen, büyütülmüş bir periklinal jant ile çevrili merkezi bir konveks kubbe biçiminde olan dematiaceous hyphomycetes'lerdir. Cins, ayrı bir ailenin, Capnodiales (Dothideomycetes), Mycosphaerellaceae ve Teratosphaeriaceae'nin kardeş bir ailesi olan Cladosporiaceae'ye aittir. Çok sayıda cladosporioid cinsinin kapsamlı revizyonlarına dayanan *Cladosporium* hem filogenetik olarak hem de morfolojik olarak tanımlanmış ve çeşitli eski *Cladosporium* türlerinin ayrıldığı sayısız morfolojik açıdan benzer fakat farklı cinslere ayrılmıştır (Bensch ve ark, 2015).

Cladosporium sporlarının büyük mikotoksinleri az içerdiği veya hiç içermediği fakat atopik alerji hastalarında rinokonjunktivit, rinosinüzit, kuru öksürük ve/veya bronşiyal astım gibi semptomların gelişmesi, alevlenmesi veya kötüleşmesini tetikleyebilir olduğu ortak bir görüştür. Astımın patogeneze bu cinsin katkısı *Alternaria*'ninkinden biraz daha zayıf görünse de, *C. herbarum*'dan gelen yaklaşık 60 inhalant antijen, çapraz immünoelektroforez ile tanımlanmış ve bunların en az 36'sı hasta serumundaki IgE antikorları ile reaksiyona girdiği görülmüştür. Avrupa Topluluğu Solunum Sağlık Araştırması verileri, genel popülasyonda 20-44 yaş arası erişkinlerde *Cladosporium* ekstraktları kullanılan pozitif deri testlerinin yaygınlığının %1.7'lik bir ortalama ile %0-11.9 arasında değişmekte olduğunu göstermektedir. Hassasiyete sahip kişilerde erken alerjik semptomları tetikleyecek muhtemel günlük minimum konsantrasyonun, *Cladosporium* için sıklıkla 2800 veya 3000 spor/m³'e eşit veya daha yüksek olduğu

tahmin edilmektedir ve bu, *Alternaria* için olandan çok daha fazladır (yaklaşık 80-100 spor/m³). *Cladosporium* ve *Alternaria* sporlarının farklı eşik değerlerinin nedenlerinden biri de bu parçacıkların hacimlerinin farklı olmasıdır: 10-20 *Cladosporium* sporları bir *Alternaria* sporuna karşılık gelebilir. *Cladosporium* sporlarının havadaki konsantrasyonunun hava şartlarına göre dalgalandığı bilinmektedir. Bu sporlar herhangi bir sıcaklıkta gelişebilmesine rağmen, günlük spor sayılarıyla en güçlü korelasyonu gösteren meteorolojik parametre hemen hemen her zaman sıcaklıktır (Sindt ve ark, 2016).

***Cladosporium herbarum*:** Bitki patojeni olan *C. herbarum*, toprakta çürümüş bitkiler üzerinde gelişebilirler. Doğal ortamlarda ve kültürlerde koloniler yaygın, zeytin yeşili veya zeytinimsi kahverengi renklerinde bulunur. Velvet, koloni altı malt agar besiyerinde yeşilimsi siyah, stroma bazen özellikle otsu gövdelerde iyi gelişmekte, konidiyoforlar düz veya dalgalı, bazen genikulat, çoğunlukla nodoz, soluk-orta zeytinimsi kahverengi veya kahverengi düz çeperli, 250 mikrona kadar uzunlukta, 3-6 mikron kalınlıkta, terminal veya interkalar şişkinlikler varsa 7-9 mikron çapındadır. Konidiler oldukça uzun, genellikle dallanmış zincirler halinde, elipsoidal veya oblong, uçlarda yuvarlak soluk- orta kahverengi veya zeytinimsi kahverengi oldukça kalın çeperli, belirgin şekilde verrukuloz, uzun olmayan siğilli, tamamıyla 0-1 bölmeli, bazen daha fazla bölmeler de oluşabilmektedir. 5-23x3-8 (çoğunlukla 8-15x4-6) mikron bir ucunda veya iki ucunda çıkıntılı, çıkıntılar küçük fakat açık şekilde dışarıya çıkmış, çok kozmopolit bir türdür. Özellikle ılıman zonlarda yaygın, otsu ve odunsu bitkiler üzerinde, havadan, topraktan gıda maddelerinden tekstil maddelerinden vs. izole edilmektedir (Ellis, 1971).

1.4. Deri Delme Testi (Skin Prick Test)

Küf kaynaklı IgE duyarlılığının teşhisi, genellikle, test materyalinin heterojenliği ve standartlaştırmadaki eksiklik nedeniyle zordur. Bir başka neden de, piyasada bulunan cilt testi materyallerinin sayısında ciddi bir azalma olmasıdır.

Bununla birlikte, cilt testleri, alerjik hassasiyeti değerlendirmek için klinik olarak en sık kullanılan teknik olma özelliğini korumaktadır. Deri delme testlerinin (Skin Prick Test: SPT) düzgün bir şekilde yürütülmesini sağlamak için farklı alerji kurumlarından kılavuzlar, örneğin; EAACI, IAAAI ve DGAKI mevcuttur. Bu testlerin doğruluğu alerjen potensi, alerjen içeriği ve alerjen test çözeltisinin stabilitesi, testin uygulanma metodu (örneğin delinme derinliği), cilt reaktivitesinin durumu, uygulama cihazları, hastaların ilaç tedavisi gibi bir seri faktöre bağlıdır (Kespohl ve ark, 2016).

1973'te Aas ve Belin, alerjen kabarcık alanını 1 mg/mL histamin boyutu ile benzer ise oransal büyüklüğü +++, eğer histaminin iki katı ise +++, eğer histaminin yarısı ise ++ olarak tasarlamışlardır. Yarı nicel bir değerlendirmeye sahip olan yöntem alerjen reaktivitesinin sadece kabaca bir değerlendirmesini verir ve hiçbir zaman geçerli kılınmamıştır. Dahası, kullanılan ekstraktların potensi ve bileşimi ve deri delme testi tekniği dikkate alınmamıştır. 1980'li yılların başından itibaren, standartlaştırılmış ekstraktlar piyasaya sürülmüş ve Avrupa'da önerilen histamin referansı, mL'de 1-10 mg histamin dihidroklorür'e değiştirilmiştir.

Alerjen standardizasyonu ve deri testleri (1993'de yayınlanan) üzerine EAACI'nin makalesi, sınırlama noktası olmaksızın + sistem veya pozitiflik için bir sınırlama olarak ≥ 3 mm'lik kabarcık çapı kullanmayı önermiştir. + Sistemi cildin reaktivitesindeki farklılık +++++ ve ++ arasında dört büyüklükten farklı olduğu için kaba bir tahmin verir. + Yöntemi ve kabarcık çapı, alerjen potensi ve bileşimi gibi çeşitli faktörlere ve asistanların test tekniklerine bağlıdır. Histamin tepkisi, histamin bronşiyal bağışıklık testinde olduğu gibi, aracıya cilt reaksiyonunu yansıtmaktadır. Cilt reaktivitesi bireyler arasında değişir ve alerjinin derecesine bağlıdır (Dreborg, 2015).

1.5. Amaç

Şubat 2005-Ocak 2006 tarihleri arasında Adana'da 6 farklı istasyondan ev dışı (outdoor) alerjen küflerin izolasyonu ve cins düzeyinde tanınması, yine aynı

tarikhlerde Ç.Ü. Tıp Fakültesi Çocuk İmmünoloji ve Alerji Hastalıkları Bilim Dalı Kliniğinde küf alerjisi tanısı almış 20 çocuğun evinden (indoor) alerjen küflerin izolasyonu ve cins düzeyinde tanılanması konulu yüksek lisans tez sonuçlarına göre Adana’da en yaygın küf cinsinin *Cladosporium* olduğu saptanmıştır. Ayrıca atmosferdeki *Cladosporium* ve *Alternaria* sporlarının Burkard Spor Tutma Cihazı ile 12 ay boyunca izlemi konulu üçüncü bir yüksek lisans tezi yürütülmüş ve 6 farklı küf türünden total hücre ekstraktı hazırlanarak klinikte küf alerjisi tanısı almış hastalara uygulanmıştır.

Bu çalışmalardan elde edilen veriler ve ithal edilen deri testi materyallerinin kısıtlanması bizi alerjen üretimi noktasında daha detaylı çalışmalar yapmaya yönlendirmiştir.

Bu araştırmada, Adana bölgesinde, atmosferden izole edilen yoğun/yaygın alerji etkeni olan 2 küf türünden deri delme testinde kullanılmak üzere test materyali üretmek amaçlanmıştır. Mikroorganizmalardaki biyolojik, fizyolojik, ekolojik çeşitlilik dikkate alındığında, alerjik reaksiyona neden olan, bölgesel küflerden test materyali üretmenin, teşhiste daha doğru sonuç vereceği düşüncesinden hareketle, Adana atmosferinden izole edilen küflerden test materyali üretmek, bunları fraksiyonlara ayırmak ve hem total alerjen hem de fraksiyonel alerjenlerin etkisini hazır kitlerle kıyaslamak amaçlanmıştır. Bu çalışmadan elde edilecek bulgular, üretime yönelmek için bir temel ar-ge çalışması niteliğinde olacaktır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Codina ve ark (2008), Florida'da yağmur mevsimi boyunca rutubet problemi olmayan evlerde bulunan hava kaynaklı fungus sporlarının düzeyini araştırmışlardır. Yaptıkları çalışmada hem iç ortam hem de dış ortam hava örneklerinde tespit edilen en yaygın spor tiplerinin, genellikle *Penicillium/Aspergillus* grubu; askosporlar, basidiosporlar ve *Cladosporium* türleri olduğunu saptamışlardır.

O'Gorman ve Fuller (2008), dış ortam havasından seçilen alerjenik ve patojenik hava ile taşınan fungusların etkilerini incelemişler ve bu çalışmaları sonucunda total izolatta en fazla *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium* ve *Penicillium* cinslerinin bulunduklarını tespit etmişlerdir.

Haleem Khan ve ark (2009), havalandırması bulunan çeşitli iç ortamlardan izole ettikleri ve teşhisini yaptıkları fungusların alerji testlerini gerçekleştirmişlerdir. *Aspergillus niger*, *A. oryzae*, *A. fumigatus*, *A. terreus*, *A. nidulans*, *A. versicolor*, *A. parasiticus*, *Penicillium citrinum*, *Fusarium oxysporum*, *Trichoderma viride*, *Neurospora crassa* ve *Alternaria alternata* olmak üzere 12 tür izole etmişlerdir. *A. fumigatus*, *A. niger*, *P. citrinum* türlerinin ekstraktlarının çok güçlü alerjiye neden olduklarını belirlemişlerdir. Bu çalışma ile iç ortamlarda bulunan havalandırmaların funguslar için rezervuar olabildiği ve bu ortamlarda bulunan kişilerde söz konusu fungusların alerjik semptomlara veya enfeksiyonlara neden olabildiklerini bildirmişlerdir.

Miao ve ark (2009), Çin'de kapalı bir tavşan barınağındaki hava ile taşınan funguslar ile ilgili yaptıkları çalışmalarında baskın olan cinslerin *Cladosporium*, *Penicillium*, *Aspergillus* ve *Alternaria* olduğunu ve fungus yoğunluğunun yaz ve sonbahar döneminde kış ve ilkbahar dönemine göre fazla olduğunu tespit etmişlerdir.

Bhattacharjee ve ark (2012), otobüs terminalinden yaptıkları örneklemeler sonucunda *Aspergillus* cinsine ait 11 tür, *Cladosporium*'a ait 3 tür, *Curvularia*,

Fusarium, *Monilia*, *Penicillium* cinslerine ait 2 tür saptamışlardır. Bu türlere ait toplam spor sayılarına bakıldığında *Cladosporium* cinsine ait türlerden elde edilen toplam spor sayısının saptanan tüm fungal sporların %20,7'sini oluşturduğu gözlemlenmiştir.

Pakpour ve ark (2015), New York ve Toronto'da 20 yılda, her yıl, 3 gün boyunca, günde 6 defa 2 saat arayla 10 dakikalık hava örneklemeleri yapmışlardır. Samplair-MK1 cihazıyla yerden 1.8 m yükseklikten dakikada 9 L hava toplamışlardır. *Alternaria*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Ascospores*, *Basidiospores*, *Bispora*, *Cladosporium*, *Curvularia*, *Epicoccum*, *Fusarium*, *Pithomyces* gibi farklı cinslerde sporlar tanımlamışlardır. Bu sporların sayısını Toronto için m³'de 114.800-236.700, New York için m³'de 60.200-204.800 olarak saptamışlardır.

Dallongeville ve ark (2015), Brittany, Fransa'da 150 evde yaptıkları araştırmada, konutların %90'ından fazlasında hava kökenli *Cladosporium* ve *Penicillium*'a, %46'sında *Aspergillus*'a ve %6'sında *Alternaria*'ya rastlamışlardır. Yerdeki toz örneklerine baktıklarında ise; %80-92 oranında *Cladosporium* ve *Penicillium*, %49 *Aspergillus* ve %14 *Alternaria* varlığı saptamışlardır.

Reddy ve Srinivas (2017), Visakhapatnam, Hindistan'daki iki anaokulundan hava kaynaklı mantarları izole edip bunların tür tayinini yapmışlardır. 10 ay boyunca haftada bir defa yerden 0,6 m yükseklikte örnekleme yapmışlardır. Bu amaçla PDA ve Sabouraud Agar besiyerleri kullanarak 15 dk süreyle petriyi açık tutarak örnekleme yapmışlardır. Ardından kapağı kapatılarak 25°C'de 5 gün inkübe etmişlerdir ve mikroskopik tanılama yapmışlardır. Çalışma sonunda 320 petriden toplam 3520 küf kolonisi izole edilmiş ve isolatların bu 21 genusa ait olduğunu saptamışlardır. 21 genustan 35 fungus türü izole etmişlerdir. Bunlar içerisinde en sık görülenlerin; *Aspergillus* (%29,9), *Cladosporium* (%20,1), *Penicillium* (%17,7), *Alternaria* (%8,7), *Fusarium* (%6,4) ve *Curvularia* (%3,4) olduğu belirtilmiştir.

Rodriguez-Rajo ve ark (2005), Kuzey Batı İspanya'da bulunan üç merkezden *Cladosporium cladosporioides*, *Cladosporium herbarum* ve *Alternaria*

spp. örnekleme yaparak, mevsimlere ve rakım farklılıklarına bağlı olarak spor dağılımlarını incelemişlerdir. En yüksek spor sayılarını yaz sonlarında ve sonbahar başlarında kaydetmişlerdir. Karasallık arttıkça *C. cladosporioides* spor konsantrasyonunun arttığını, *Alternaria*'nın ise azaldığını görmüşlerdir. Deniz seviyesinden yükseklerle çıkıldıkça *C. herbarum* konsantrasyonunun arttığını gözlemlemişlerdir. Atmosferdeki en yüksek spor konsantrasyonu için gereken optimum koşulların 23-29°C ve %80 bağıl nem olduğunu saptamışlardır.

Sindt ve ark (2016), Fransa'da toplam beş istasyonda yaptıkları araştırma sonucunda *Cladosporium* sporlarının şehir merkezinde yüksek sayılara ulaştığını, kıyı bölgelerde iç bölgelere göre dört kat daha düşük olduğunu saptamışlardır. Kıyı bölgelerinde fungus gelişimi için gerekli substratın daha az olduğunu ve bunun bu bölgelerdeki bitki örtüsüne bağlı olduğunu belirtmişlerdir.

Özmay (2007), Adana'da 6 farklı istasyondan outdoor mantarların izolasyonu, identifikasyonu, mevsimsel dağılımı ve alerjik hastalıklarla ilişkisini saptamışlardır. ECO MASS 100 Mikrobiyal Hava İzleme Sistemi ile atmosferik fungusları izole etmişler ve Rose Bengal Streptomycine Agar'a ekim yapmışlardır. PDA, MEA, CZ besiyerlerindeki üreme davranışları, koloni morfolojisi, pigment oluşumu, petri kutusundaki görünüşleri, mikroskopta gözlenen spor ve hifsel yapılarını göz önünde bulundurarak identifiye etmişlerdir. Şubat 2005-Ocak 2006 arasında ayda bir defa olmak üzere 12 kez örnekleme yapmışlardır. Toplam 3220 mantar kolonisi izole etmişler ve tanımlama sonrası 9 farklı mantar cinsi saptamışlardır. Bunların %44,5'i *Cladosporium*, %20'si *Penicillium*, %17'si *Aspergillus*, %5,4'ü *Alternaria*, %1,36'sı *Rhizopus*, %0,90'ı *Fusarium*, %0,55'i *Acremonium*, %0,27'si *Trichoderma*, %0,03 *Chaetomium* olarak tanımlanmıştır.

Kim ve ark (2010), Kore halk hastanelerindeki bakteri ve fungus dağılımlarını belirlemek amacıyla yaptıkları çalışmaları sonucunda en fazla *Cladosporium* spp. (%30) tespit etmişlerdir. Bunu sırasıyla *Penicillium* spp. (%20-25), *Aspergillus* (% 15-20) ve *Alternaria* (%10-20) cinslerinin izlediğini bildirmişlerdir.

Kılıç ve ark (2010) *Alternaria* sporlarına karşı hassasiyeti olan çocuklar üzerinde yapmış oldukları çalışma sonucunda, *Alternaria* cinsinin yaz sonunda ve sonbahar başlangıcında artış gösterdiğini, özellikle Eylül ayında en üst seviyeye ulaştığını bildirmişlerdir.

Peden ve Reed (2010), çevresel ve mesleki alerjiler konulu çalışmalarında iç ve dış ortam örneklemeleri sonucunda *Cladosporium*, *Penicillium*, *Aspergillus* ve *Alternaria* cinslerinin baskın olduğunu bildirmişlerdir.

Gofron ve ark (2010), 2006-2008 yılları arasında yaptıkları bir araştırmada alerjilere en çok neden olan fungus türlerinin; *Cladosporium* ve *Alternaria* cinslerine ait olduğunu saptamışlardır. Ayrıca bu cinslerin meteorolojik faktörler ve hava kirliliği ile olan ilişkilerini araştırmış ve her iki cinsin de meteorolojik faktörler ile pozitif ilişki içerisinde olduklarını rapor etmişlerdir.

Kalyoncu (2010), Ocak 2004-Aralık 2005 arasında Manisa'nın 11 farklı bölgesindeki hava kaynaklı fungal alerjenler üzerine sıcaklık, nem ve rüzgarın etkisini araştırmışlardır. Merck MAS100 hava örnekleme cihazı ile 792 örnek almış ve 12988 koloni saymışlardır. Bunların 14 tanesini tanımlayabilmişlerdir. İçlerinde en baskın cinsin *Cladosporium* olduğunu ve onu *Penicillium*, *Apergillus* ve *Alternaria*'nın takip ettiğini bildirmişlerdir.

Docampo ve ark (2010), Güney İspanya'da bulunan Nerja Mağarası'ndaki fungus çeşitliliğini incelemişler ve en yoğun bulunan cinslerin *Aspergillus* ve *Penicillium* olduğunu, bunları *Cladosporium*'un izlediğini bildirmişlerdir. Ayrıca mağara içinde bulunan fungus sporlarının iç ve dış ortam yoğunlukları ile mevsimsel özelliklerden etkilendiğini belirtmişlerdir.

Rid ve ark (2010), *Cladosporium herbarum* hidrolazının, test ettikleri küf alerjili popülasyonun %17'sinden sorumlu olduğunu saptamışlardır.

Kuna ve ark (2011), araştırmaları sonucunda çocuklardaki alerjilerde *Alternaria alternata*'nın alerjik rinit ve astıma sebep olduğunu bildirmişlerdir.

Pavon ve ark (2012), *Alternaria* patojenitesi ile ilgili genel bir bakış sunmuştur. Tahıl, sebze ve meyve mahsullerinin hem depolama öncesinde hem de

depolama esnasında etkilenebileceğini vurgulamışlardır. *Alternaria* genellikle taze meyve ve sebzelerde bulunurken, bazen hasarlı ürünlerden hazırlanan konserve, meyve suları veya soslarda da görülebildiğini açıklamışlardır.

Jacqueline ve ark (2010), çocuklardaki astım vakaları üzerinde iç ve dış ortam havasının farklı etkileri üzerine yaptıkları çalışma sonucunda alerji görülme olasılığı olan 469 çocuğa test uygulamışlardır. Bu testin sonucuna göre *Alternaria* duyarlılığı %36 ile ilk sırada yer alırken bunu sırasıyla *Aspergillus* (%27), *Cladosporium* (%18) ve *Penicillium* (%13) 'un takip ettiğini bildirmişlerdir.

Gelişken (2008), Adana'da mantar alerjisi pozitif olan 20 çocuğun ev içi ortamındaki mantar konsantrasyonunu, türünü/cinsini saptamışlar ve mantarlardan total hücre proteini ekstraktları hazırlayarak Ç.Ü. Tıp Fakültesi Çocuk İmmünoloji ve Alerji Hastalıkları Bilim Dalı Kliniği'nde hastalara uygulamıştır. Şubat 2005-Ocak 2006 arasında ayda bir kez olmak üzere 12 kez örnek almıştır. Toplam 10423 mantar kolonisi izole etmiş ve bunların tanımlanması sonucunda 9 farklı mantar cinsi saptamıştır: 3832'si *Cladosporium* (%36,76), 3570'i *Penicillium* (%34,25), 1048'i *Aspergillus* (%10,05), 661'i *Alternaria* (%6,34), 216'sı *Rhizopus* (%2,07), 155'i *Fusarium* (%1,49), 95'i *Steril* (%0,91), 87'si *Acremonium* (%0,83), 62'si *Trichoderma* (%0,59), 1'i *Chatemonium* (%0,01) ve 696'sı diğerleri (%6,68). 52 hastaya protein ekstraktları ile deri delme testi uygulamıştır. 11 hastada hazır mantar alerjenlerine karşı pozitif sonuç elde etmiş, 6 hastada ise kendi hazırladığı ekstraktlara karşı pozitif sonuç gözlemlemiştir.

Hidir ve ark (2008), yaşları 12-80 arasında olan 100 kronik rinosinüzitli hastayı ve 40 sağlıklı bireyi dahil ettikleri çalışmada mite, küf, çimen karışımı, polen karışımı, ot karışımı, hamamböceği ve hayvan kepeği olmak üzere 56 yaygın aeroalerjen kullanarak deri delme testi gerçekleştirmişlerdir. Hastaların %13'ünde fungal alerjen saptamışlardır.

Uztan ve ark (2010), İzmir'de merkezden uzak mahallelerde bulunan ilköğretim okullarında potansiyel alerjenik floranın ve etkilerinin belirlenmesini amaçladıkları çalışmalarında *Alternaria*, *Aspergillus*,

Cladosporium ve *Penicillium* cinslerini tespit etmişlerdir. Ayrıca bu cinslerin öğretmen ve öğrencilerde alerjilere neden olabileceğini belirtmiş ve okullarda görev yapan 117 öğretmene alerji anketi uygulaması yapmışlar ve verilen cevaplara göre 55 öğretmene deri testi uygulamışlardır. Bunun sonucunda 17 öğretmende küf hassasiyeti tespit etmişlerdir.

Akdağ (2010), 01 Ocak 2006-01 Ocak 2007 tarihleri arasında Adana atmosferinde bulunan *Cladosporium* Link ve *Alternaria* Nees ex Wallroth sporlarını Burkard Spor Tutma Aleti ile toplamıştır. *Cladosporium* ve *Alternaria* spor konsantrasyonları günlük, aylık ve yıllık olarak saymıştır (spor/m³). Sıcaklık, yağış, rüzgar, nispi nem gibi meteorolojik faktörlerin spor konsantrasyonlarının değişimi üzerine etkileri araştırmıştır. 2006 yılı Adana atmosferinde toplam 1537307 mantar sporu mikroskopta saymış, bunların %73'ünü *Cladosporium*, %27'sini ise *Alternaria* olarak tanılamıştır. Adana atmosferinde dominant mantar cinsinin *Cladosporium* olduğu gözlemlemiştir. Çalışmada Adana atmosferinden izole ettikleri ve tür düzeyinde tanıladığı *Cladosporium herbarum*, *Cladosporium oxysporum*, *Alternaria alternata*, *Alternaria pluriseptata* ve *Alternaria tenuissima* mantar türlerinden total hücre ekstraktları hazırlayarak Ç.Ü Tıp Fakültesi Çocuk İmmünoloji ve Alerji Hastalıkları Bilim Dalı Kliniğinde, standart mantar alerjenleri ile beraber hasta ve kontrol gruplarına deri delme testi uygulamıştır. 35 mantar alerjili birey ve 20 kontrol grubu bu çalışmaya dahil edilmiştir. Hazırladığı mantar ekstraktları ile elde ettiği sonuçları klinikte standart olarak kullanılan testler ile kıyasladıklarında başarılı olduğunu bulmuştur.

Mishra ve ark (2016), yaptıkları çalışmada 60 hastaya, polen, mantar, haşerat, toz, hayvan kepeği, kumaş gibi çeşitli alerjenleri deri delme testi ile uygulamışlardır. Sonuçları değerlendirdiklerinde 60 hastanın 17'sinde fungal alerjenlerin pozitif yönde reaksiyon verdiğini gözlemlemişlerdir.

Kespohl ve ark (2016), küf duyarlılığını saptamak amacıyla deri delme testi ile IgE testini karşılaştırmışlardır. 168 hastanın 56'sında IgE testi ile pozitif sonuç alırken, deri delme testi ile 90'ında pozitif sonuç almışlardır.

Erel ve ark (2017), 4223 alerjik rinit ve bronşiyal astımlı hastaya deri delme testi gerçekleştirmişlerdir. Hastaların 2419'unun (%57'si) pozitif, 1804'ünün (%43'ü) negatif sonuç verdiğini gözlemlemişlerdir. Bunların içerisinde fungal sporlara karşı görülen alerjik cevabın %22 olduğu saptamışlardır.

Yükselen ve ark (2013), Adana atmosferinde 2006 yılı süresince 1 m³ havadaki toplam *Cladosporium* sporlarının sayısını 1.117.763 spor/m³, *Alternaria* sporlarının sayısını ise 419.544 spor/m³ olarak saptamışlardır. Yaz mevsiminde; *Cladosporium* %67, *Alternaria* %33, ilkbaharda; *Cladosporium* %72, *Alternaria* %28, kış mevsiminde; *Cladosporium* %92, *Alternaria* %8, sonbaharda; *Cladosporium* %83, *Alternaria* %17 oranında tespit etmişlerdir. *Cladosporium*'un her mevsimde *Alternaria*'dan dominant olduğunu saptamış, *Alternaria* yüzdesinin en yüksek değerlere yaz mevsiminde ulaştığını gözlemlemişlerdir.

Bush ve Prochnau (2004), *Alternaria*'nın atmosferde en yüksek seviyelerde bulunduğu dönemde hayatını tehdit eden astım atağı geçiren bir hasta ile yaptıkları çalışmada standart alerjenlerle yapılan deri testi sonuçlarına göre endüryon ve hiperemi sonuçlarını *Cladosporium herbarum* için; 5 mm ve 15 mm, *Alternaria alternata (tenius)* için; 13 mm ve 30 mm olarak vermişlerdir.

Reyes ve ark (2009), 1 Şubat 2005-31 Ocak 2007 tarihleri arasında atmosferden fungus izolasyonu yapmışlardır. 2005 yılında toplanan toplam spor sayısı *Alternaria* için 4.500, *Cladosporium* için 93.744 iken 2006 yılında bu değerlerin *Alternaria* için 8.385, *Cladosporium* için 150.144 olmak üzere artış gösterdiğini belirtmişlerdir. Spor konsantrasyonunu etkileyen meteorolojik parametreleri araştırmış ve en fazla pozitif etkiyi sıcaklık ile elde etmişlerdir. Yağış miktarı, nisbi nem ve rüzgar sıklığı *Alternaria* ile negatif bir etki içerisindeyken *Cladosporium* ile pozitif bir korelasyonu olduğunu gözlemişlerdir. Toplam 767 alerjik hastaya deri testi uygulamışlardır. 73 tanesinin *Alternaria*'ya (%9,5), 7 tanesinin ise *Cladosporium*'a (%0,9) karşı pozitif reaksiyon verdiğini saptamışlardır. *Alternaria*'ya alerjik olan hastaların %26'sında rinokonjonktivit, %74'ünde astım görüldüğünü bildirmişlerdir.

Katotomichelakis ve ark (2012), *Alternaria alternata*'ya duyarlı alerjik riniti olan 623 hastaya deri delme testi uygulamışlar ve diğer alerjenlerle olan ilişkisini saptamışlardır. *Alternaria alternata*'ya duyarlı hastaların %66,7'sinde birkaç alerjene duyarlılık, %18,5'i çoklu duyarlılık, %14,8'inde tek bir alerjene duyarlılık gözlemişlerdir. Bu hastaların çoğunlukla çimen, kedi epiteli, çavdar ununa da hassas olduklarını saptamışlardır. Hastaların %11,1'inin aynı zamanda *Cladosporium*'a da hassasiyet gösterdiğini ifade etmişlerdir.

Kochar ve ark (2014), Hindistan'ın Rohtak şehrinde 2 yıl boyunca (Mart 2008-Şubat 2010) hava örnekleme yapmışlardır. Bu süre boyunca 45 mantar sporu saptamışlardır. Şubat-Nisan ve Temmuz-Kasım dönemlerinin en yüksek konsantrasyonların elde edildiği dönemler olduğunu ifade etmişlerdir. *Cladosporium* %25,14 ile en yüksek konsantrasyona sahip iken, *Alternaria* %18,05, *Aspergillus niger* %7,66, *Curvularia* %5,31, *Epicoccum* %5,29 olarak kaydetmişlerdir. Atmosferden elde ettikleri bazı fungus türleri için deri testi ile alerji tespiti yapmışlardır. Mantar türlerinin çoğunda pozitif sonuç almışlardır (%17,3-2,3). *Penicillium*'un %17,3 ile en yüksek reaksiyona sebep olduğunu saptamışlardır. *Cladosporium herbarum* için %8, *Alternaria solani* için ise %3,3 pozitif sonuç almışlardır.

Tham ve ark (2017), %63,2'si erkeklerden oluşan, %90'ı 10 yaşından küçük 2-17 yaşları arasındaki 644 çocuk ve genç bireyden 630 tanesine deri delme testi uygulamışlardır. %8,9'u *Alternaria*'ya, %6,5'i *Cladosporium*'a, %13,7'si *Alternaria* ve *Cladosporium* karışımına karşı hassas olduğunu saptamışlardır. Maruz kalınan fungal spor sayılarına baktıklarında toplam mantar sporları içerisinde en yaygın türlerin *Cladosporium* (%44), *Leptosphaeria* (%14) ve *Alternaria* (%11) olduğunu gözlemlemişlerdir.

Hoo ve ark (2001), bir sivrisinek türü olan *Aedes togoi*'nin tükürük bezi salgısından, %0,3 fenol salın ve %50 gliserin içeren çözelti içerisine ekleyerek test materyali hazırlamışlardır. Kore Yonsei Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Severance Hastanesi, Alerji Kliniği'ne sivrisinek ısırığı sonucu çeşitli deri reaksiyonları

şikayeti ile başvuran 17 hastaya hazırladıkları test materyali ile deri delme testi uygulamışlardır. Hastaların 12 tanesinin pozitif, 5 tanesinin negatif sonuç verdiğini gözlemlemişlerdir.

İnal ve ark (2006), bir olgu üzerine çam tırtılı ekstraktı ile deri delme testi yapmışlardır. Ekstraktı tırtılı 1:10 (w/v) oranında sulandırarak hazırlamışlardır. Hastanın habitatından topladıkları son larval aşamada olan çam tırtıllarını steril tuzlu su ilave edip 15 dk santrifüj ederek homojenize etmişlerdir. Bu homojenatı sıvı azot ve filtre işlemlerinden geçirerek tekrar homojenize etmişlerdir. Filtratı 10000 x *g*'de 10 dk santrifüj edip 1 gece 4°C'de saf suya karşı diyaliz etmişlerdir. Son olarak ekstraktı filtre ile steril etmişlerdir. 30 maruz kalmamış hastaya (15 atopik ve 15 non-atopik) testi uygulamışlar ve kendi vakalarında sonucun negatif olduğunu saptamışlardır. Pozitif kontrol olarak histamin (10 mg/mL), negatif kontrol olarak serum fizyolojik kullanmışlardır.

Jong ve ark (2006), yaptıkları çalışmada bir seradan kırmızıbiber bitkisinin çiçeklerinin polenlerini toplayarak, deri delme testinde kullanmak üzere %25 (w/v) konsantrasyonda olacak şekilde %0,03 insan serum albümini ve %0,5 fenol içeren PBS içerisinde ekstrakt hazırlamışlardır. Ekstraktları 10 dk 2,000 x *g*'de santrifüj etmişler ve süpernatantı 0,22 µm Millex GS filtreden geçirmişlerdir. Tüm ekstraktları deri delme testinde kullanılabilecek uygun oranlarda -20°C'de saklamışlardır. Kullanmadan 1 saat önce çözdürüp çalkalamışlardır. Deri delme testi ile 43 hastanın 39'unda pozitif sonuç görmüşlerdir.

Chatterjee ve ark (2006), balık duyarlılığı ile ilgili yaptıkları çalışmada 110 hastaya Hindistan'da bulunan 4 balık çeşidinin (pomfret, hilsa, bhetki ve mackerel) çiğ, haşlanmış ve kızartılmış ekstraktı ile deri delme testi gerçekleştirmişlerdir. 161 hastanın 110'unun (%68,32) 1 veya daha fazla balık ekstraktına pozitif sonuç verdiğini gözlemlemişlerdir. Bunların 92'sinin (%83,63) 4 balık ekstraktına da pozitif sonuç verdiğini saptamışlardır. Bu 92 hasta içerisinde 50 tanesine çiğ balıklar ile deri testi uygulamışlar ve 50'sinde de pozitif sonuç almışlardır. 50 hasta içerisinde 12 tanesine haşlanmış ve kızartılmış balıklar ile test gerçekleştirmişler

ve 12'sinin de pozitif sonuç verdiğini görmüşlerdir.

Patiwael ve ark (2010), bir seradan çilek bitkisinin polenlerini toplamışlar ve deri delme testinde kullanılmak üzere ekstrakt hazırlamışlardır. Çilek polen ekstraktlarını, %0,03 insan serum albümini ve %0,5 fenol içeren pH 7.4 fosfat buffer salin (PBS) içerisinde hazırlamışlardır. Çilek suyu hazırlamak için çilekleri mikser ile homojenize etmişler, elde ettikleri bulamacı filtre etmişler ve son olarak sıvıyı 0,22 µm filtreden (Millex GS, Millipore, Hollanda) geçirmişlerdir. Çilek polen ekstraktının protein konsantrasyonunu 0,25 g/L, çilek suyununkini 1,1 g/L olarak saptamışlardır. *Amblyseius cucumeris* mite'ını da ekstrakte etmişler ve protein konsantrasyonunu 1,05 g/L olarak bulmuşlardır. Bu şekilde hazırladıkları tüm ekstraktları deri delme testinde kullanmışlardır. Çalışmaya katılan 3 hastada (A, B, C) ev yapımı çilek polen ekstraktına karşı pozitif sonuç elde etmişlerdir. B ve C hastalarında çilek suyuna karşı da deri testinin pozitif olduğunu gözlemlemişlerdir. *A. cucumeris*'e karşı bir duyarlılık saptamamışlardır.

Palacin ve ark (2010), yaptıkları çalışmada buğday türevi gıda maddelerini yedikten sonra anafilaksiye giren 8 yetişkin hasta seçmişlerdir. Ev yapımı buğday ekstraktı, doğal olarak saflaştırılmış ve rekombinant Tri a 14 (Buğday unu lipid transfer proteini alerjeni), şeftali meyvesi ve *Artemisia* bitkisi poleni lipid transfer proteinleri; Pru p 3 ve Art v 3 ile deri delme testi, spesifik IgE tayini (ELISA) ve IgE immuno-tanımlama deneyleri gerçekleştirmişlerdir. Ev yapımı buğday ekstraktı ile bütün testlerin 8 hastada pozitif sonuç verdiğini saptamışlardır. Deri delme testi sonuçlarına göre doğal Tri a 14 ile 8 hastanın 5'inde, Pru p 3 ile 8 hastanın 6'sında ve Art v 3 ile 4 hastanın 4'ünde pozitif sonuç almışlardır.

3. MATERYAL VE METOD**3.1. Materyal****3.1.1. Mantar Suşları**

Bu çalışmada total hücre proteinlerinin ekstraksiyonu (mantar ekstraktları) amacıyla kullanılan mantar suşları Adana dış atmosferinden (outdoor) izole edilmiş (Ç.Ü. Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Mikrobiyoloji Laboratuvarı Kültür Koleksiyonu) ve tür düzeyinde tanımlanmıştır.

1-*Cladosporium herbarum*

2-*Cladosporium cladosporioides*

3-*Alternaria alternata*

3.1.2. Kullanılan Kimyasallar

Besiyerleri, Sephadex G-100, Serum Fizyolojik, Etil Alkol, Sodyum Hidroksit, Bradford Çözeltilisi, Fenol, Gliserin, BSA (Bovine Serum Albumin), Standart Mantar Alerjenleri, Sıvı Azot, Histamin gibi kimyasallar kullanılmıştır.

3.1.3. Kullanılan Besiyerleri**3.1.3.1. Potato Dextrose Agar (PDA) (Merck)**

Mantar suşlarının üretilmesi ve stok kültürlerin hazırlanması/saklanması amacıyla kullanılmıştır (Ellis ve Ellis, 1997).

Granül halindeki besi yeri (hazır besi yeri) karışımından 30 g tartılıp, 1 L distile suda çözüldükten sonra, otoklavda steril edilmiştir (121°C’de 15 dk). *pH*: 5,6± 0,2. Steril petri kutularına 20 mL dökülmüştür.

3.1.3.2. Czapek Dox (CZ)

Mantar suşlarının test materyali (total hücre ekstraktı) hazırlama aşamasında üretilmesi için kullanılmıştır (Al-Suwaini ve ark, 2001).

Bileşimi		g/L
$C_{12}H_{24}O_{12}$	Sükroz	30
$NaNO_3$	Sodyum Nitrat	3
$MgSO_4$	Magnezyum Sülfat	0.5
KCl	Potasyum Klorid	0.5
Fe_2SO_4	Demir 2 Sülfat	0.01
K_2HPO_4	di-Potasyum Hidrojen Fosfat	1

Yukarıdaki kimyasallar tartılıp, 1 L hacimli şişelerde magnetik karıştırıcıda ısıtılarak maddelerin çözünmesi sağlanmış, besi yerinin pH'sı 7.3 ± 0.2 'ye ayarlandıktan sonra, otoklavda $121^\circ C$ 'de 15 dakika steril edilmiştir.

3.1.3.3. Kanlı Agar

Mantar ekstraktlarının deri testinde kullanılmadan önce sterilite kontrollerinin yapılması amacıyla kullanılmıştır (Anonymous, 1978).

Bileşimi	g/L
Pepton	10
Et özütü	10
NaCl	5
Agar	15

Besiyeri otoklavda steril edildikten sonra, $45-50^\circ C$ 'ye soğutulmuş ve 80 mL (%5-10) **defibrine kan** yavaşça karıştırılarak ilave edilmiştir (bu aşamada besiyerinin köpürmemesine dikkat edilmelidir).

3.1.3.4. Bradford Reagent**Bileşimi**

Coomassie Brilliant Blue G-250	100 mg
%95'lik Etanol	50 mL
%85'lik Fosforik asit (ortofosforik asit)	100 mL

Hazırlanışı: 100 mg Coomassie Brilliant Blue G-250, 50 mL %95'lik etanole eklenmiş ve karıştırılmıştır. 100 mL %85'lik fosforik asit yavaşça eklenmiş ve distile suyla son hacim 1 L'ye tamamlanmıştır. Whatman No.1 filtre kağıdı ile filtre edilmiştir. Hazırlanan solüsyon oda sıcaklığında 1 ay, 4°C'de 3 ay koyu renkli şişede saklanabilir (Gallagher ve Wiley, 2008).

3.1.4. SDS-PAGE İşleminde Kullanılan Solüsyonlar**3.1.4.1. Solüsyon-A (Akrilamid Stok Solüsyonu)**

Bileşimi	g/100mL
Acrylamide	29.2
Bis-acrylamide	0.8

Akrilamid ve bisakrilamid 50 mL distile suda (dH₂O) tamamen çözününceye kadar magnetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Son hacim 100 mL'ye tamamlanmıştır. Çözelti +4 °C'de aylarca saklanabilir (Bollag ve ark, 1996).

Not: Polimerize olmamış akrilamid deriyi irrite eder ve nörotoksik özelliktedir. Buharının solunmaması gerekir, çeker ocağa ve eldivenle çalışmak gerekir.

3.1.4.2. Solüsyon-B (4X Separating Jel Tamponu)

Ayırıcı jelin hazırlanmasında tampon çözelti olarak kullanılmıştır (Bollag ve ark, 1996).

Bileşimi	mL/100mL (v/v)
2M Tris-HCl (pH = 8.8)	75 (1.5 M)
%10 SDS	4 (%0.4)
H ₂ O	21

Bu çözelti buzdolabında aylarca stabil kalabilir.

Not: Native jel uygulamalarında SDS kullanılmadığı için distile su 25 mL ilave edilir.

3.1.4.3. Solüsyon-C (4X Stacking Jel Tamponu)

Yığılma jelinin hazırlanmasında tampon çözelti olarak kullanılmıştır (Bollag ve ark, 1996).

Bileşimi	mL/100mL (v/v)
1M Tris-HCl (pH = 6.8)	50 (0.5 M)
%10 SDS	4 (%0.4)
H ₂ O	46

Bu çözelti buzdolabında aylarca saklanabilir.

3.1.4.4. AMPS (%10 Amonyumpersulfat)

Polimerizasyon başlatıcı olarak kullanılmıştır (Bollag ve ark, 1996).

Bileşimi	g/100mL (w/v)
Amonyum persülfat	10
Distile su	100 mL

Kapaklı renkli şişede buzdolabında saklanmalı ve taze hazırlanmalıdır.

3.1.4.5. Elektroforez Tamponu

SDS-PAGE analizinde yürütme tamponu olarak kullanılmıştır (Bollag ve ark, 1996).

Bileşimi	g/L (w/v)
Tris	3 (25 mM)
Glycine	14.4 (192 mM)
SDS	1 (%0.1)
H ₂ O	1000 mL

pH=8.3, oda sıcaklığında stabil değildir.

Not: Bu çözelti çalışma çözeltisidir, 10X konsantrasyonlarda hazırlayarak, kullanılacağı zaman sulandırmak, çözeltinin kontaminasyonunu engellemek açısından önerilmektedir.

3.1.4.6. Örnek Tamponu (1X Sample Buffer)

SDS-PAGE analizinde proteinin solubilizasyonu için kullanılmıştır (Zhang ve ark, 2009).

Bileşimi
62.5 mM Tris-HCl (pH=6.8)
%2 SDS
%5 2-mercaptoethanol
%10 Glycerol
%0.002 Bromophenol Blue

Hazırlandıktan sonra otoklavda steril edilerek +4 °C'de birkaç hafta, -20 °C'de birkaç ay saklanabilir.

3.1.4.7. TEMED (N, N, N', N'-tetramethylene-ethylenediamine)

Polimerizasyonun gerçekleşmesi için katalizör olarak kullanılmıştır.

3.1.4.8. SDS-PAGE Boyama Solüsyonu (Coomassie Brilliant Blue-CBB R-250)

Elektroforezden sonra protein bantlarının boyanarak görünür hale gelmesini sağlamak için kullanılmıştır (Bollag ve ark, 1996).

Bileşimi	mL/1000 mL (v/v)
Coomassie Brilliant Blue R-250	1 g
Methanol	450
Glacial Acetic Acid	100
H ₂ O	450

Boya metanolde iyice çözüldükten sonra filtre edilerek asetik asit ve su ilave edilir. Ağzı kapaklı amber şişede saklanmalıdır.

3.1.4.9. Jelden Boyayı Geri Alma (Destaining) Solüsyonu

Jelde ayrılmış protein bantlarının net görünebilmesi için boya fazlasını uzaklaştırmak amacıyla kullanılmıştır (Bollag ve ark, 1996).

Bileşimi	mL/1000 mL (v/v)
Methanol	100
Glacial Acetic Acid	100
H ₂ O	800

Solüsyonun rengi mavi oluncaya kadar kullanılabilir.

3.1.4.10. İstenilen Konsantrasyonda (%X) Ayırıcı Jelin Hazırlanması

Sol-A ve Sol-B ayrı ayrı hazırlandıktan sonra, verilen miktarlarda karıştırılmıştır, degaz işleminden sonra AMPS ve TEMED ilave edilmiştir (Bollag ve ark, 1996).

Bileşimi	
Solüsyon-A	x/3 mL
Solüsyon-B	2.5 mL
H ₂ O	7.5 ^{-x/3} mL
<i>Degaz işleminden sonra; (vakum pompası ile 5 dk. çözünmüş O₂ çözeltiden uzaklaştırılır)</i>	
%10 Amonyum persülfat	50 µL
TEMED	5 µL (eğer x<%8 →10 µL)

3.1.4.11. Protein Marker (Promega, V849A, MW: 225-10 kDa)

SDS-PAGE analizinde örneklerin moleküler ağırlığının saptanabilmesi amacıyla standart protein olarak kullanılmıştır. Protein marker; 225, 150, 100, 75, 50, 35, 25, 15, 10 kDa boyutlarındaki proteinleri ihtiva etmektedir.

3.1.5. Ekipmanlar

Kaba Filtre Kağıdı (Whatman No. 1), 0,2 µm Steril Enjektör Tipi Filtre, Liyofilizatör, Çalkalamalı İnkübatör, Ultra Turrax-T25, Sonikatör (Bandelin Sonopuls HD 2070 Ultrasonik Homojenizatör), Havan, Öğütücü, Magnetik Stirrer, Pastör Fırını, Işık Mikroskobu (Olympus Cx 21), pH Metre.

3.2. Metod

Laboratuvar kültür koleksiyonumuzda bulunan, Adana atmosferinden izole edilmiş, *Cladosporium* ve *Alternaria* olarak tanımlanmış mantar suşlarına ait stok kültürlerden PDA besiyerine ekim yapılarak 14 gün 25°C’de inkübe edilmiştir. PDA besiyerinde canlandırılan sporlardan tek koloni elde etmek üzere bir miktar kazıma yapılarak 1 mL saf su içerisine eklenmiş ve buradan 200 µL tekrar PDA besiyerine inoküle edilerek yayma yapılmış ve 14 gün 25°C’de inkübasyona bırakılmıştır (Bensch ve ark, 2015). Tek düşmüş koloniler seçilerek PDA besiyerine inoküle edilmiş ve 14 gün süreyle 25°C’de inkübasyona bırakılmıştır.

Bu şekilde çoğaltılan koloni 500 mL Czapek Dox sıvı besiyerine inoküle edilerek 14 gün süre ile çalkalamalı inkübatörde 25°C’de üretilmiştir. Bu süre sonunda elde edilen miseller 6500 rpm’de +4°C’de santrifüj edilerek çöktürülmüştür. Miseller, santrifüj tüplerinin dibine tam yapışmadığı için bir kez de kaba filtre kağıdından süzülerek tamamı toplanmıştır. Toplanan miseller filtre kağıdından yapılmış kese içerisinde ağzı kapatılarak 30°C’de 1 gece kurumaya bırakılmıştır (Levac, 2011).

3.2.1. *Cladosporium* ve *Alternaria* Suşlarından Mantar Ekstraktlarının Hazırlanması

Kurutularak suyundan uzaklaştırılan örnekler sıvı azot ile dondurularak havanda ezilmiş, öğütücüden geçirilerek daha küçük parçalara ayrılmıştır. Daha ileri parçalama için, elde edilen miseller önce homojenizatör (Ultra Turrax-T25) ile 20500 devir/dk’da, daha sonra sonikatör (Bandelin Sonopuls HD 2070 Ultrasonik Homojenizatör) ile 30’ar dk’lık 2 tekrar gerçekleştirerek parçalanmıştır. Daha sonra tam parçalanmayan örnekler dondur-çöz (freze & thaw) uygulaması ile homojenize edilmiştir (Skóra ve ark, 2015).

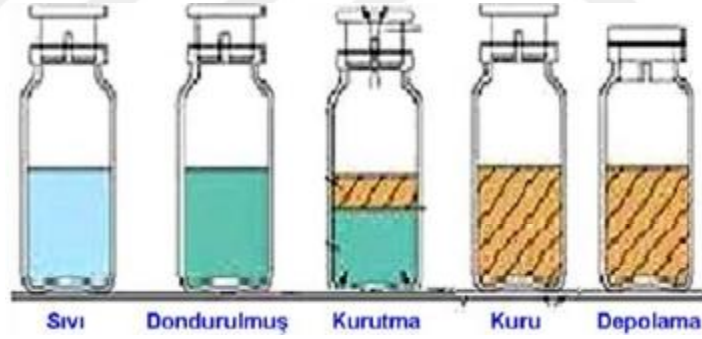
Freeze & Thaw Yöntemi:

- Örnekler -80°C’de 3 dk dondurulmuştur,
- Hızlıca 42°C’de çözülmüştür,
- Nazikçe vortekslenmiştir,
- Bu aşamalar toplam 4 defa tekrarlanmıştır.

Örnekler kaba filtreden süzülüp 0,2 µm enjektör tipi filtre ile steril edilmiş ve liyofilizasyona hazırlık amacıyla 250 mL’lik erlenlere 100 mL olacak şekilde eklenerek -20°C’de dondurulmuştur. Dondurulan örnekler 24 saat süre ile Liyofilizatörde liyofilize edilmiştir. Alerji testleri için kullanılıncaya kadar +4°C’de saklanmıştır.

Liyofilizasyon: Su, hücreler içerisindeki biyokimyasal aktiviteleri destekleyen evrensel bir çözücüdür. Bu özelliğiyle canlılık işlemleri ve metabolik aktivitelerin kesintisiz devam etmesinden sorumludur. Su yokluğunda hayat diye tanımladığımız döngü durmaktadır. Dolayısıyla su hayati bir öneme sahiptir. Öte yandan su, depolanmış ürünlerin bozulmasında da önemli bir rol oynamaktadır. Özellikle bozulma ve çürüme organizmaların çoğalması ve otoliz süreci için de gereken ortamı sağlamaktadır. Bu nedenle çabuk bozulmaya meyilli ürünlerin dayanıklılığının artırılması için bu ürünlerden suyun uzaklaştırılması gerekmektedir.

Liyofilizasyon kısaca, yiyecek ve biyolojik ürünlerin bozulmadan kalmasını sağlamak ve oda sıcaklığında daha kolay depolayabilmek amacıyla bu ürünlerden suyun uzaklaştırılması sürecidir. Daha teknik olarak ifade etmek gerekirse; azaltılmış basınç (vakum) altında dondurulan solüsyonlardan suyun uzaklaştırılması prensibine dayanan bir kurutma yöntemidir (Ergün, 2015).



Şekil 3.1. Liyofilizasyon aşamaları

3.2.2. Ekstraktların Protein Miktarının Saptanması

Total hücre ekstraksiyonu hazırlanan mantar örneklerinin protein miktarı Bradford Yöntemi ile tayin edilmiştir. Bunun için; liyofilize örnekler 0,5 g tartılıp 10 mL SF'de çözülmüş, filtre edilmiş ve 0,2 µm enjektör tipi filtre ile steril edilerek protein tayinine hazır hale getirilmiştir.

Bradford yöntemine göre standart protein eğrisi oluşturmak için 0,1 mg/mL Bovine serum albümin (BSA) çözeltisinden son konsantrasyonları 5 µg/mL, 10 µg/mL, 15 µg/mL, 20 µg/mL, 25 µg/mL olacak şekilde çözeltiler hazırlanmıştır. Bu amaçla;

10 mg BSA 10 mL suda çözölmüştür. Bu çözeltiden 1 mL alınıp 9 mL su ilave edilerek stok BSA çözeltisi hazırlanmıştır.

Stok çözelti uygun oranlarda distile su ile karıştırılarak, standart grafik için örnekler hazırlanmıştır (Çizelge 3.1.)

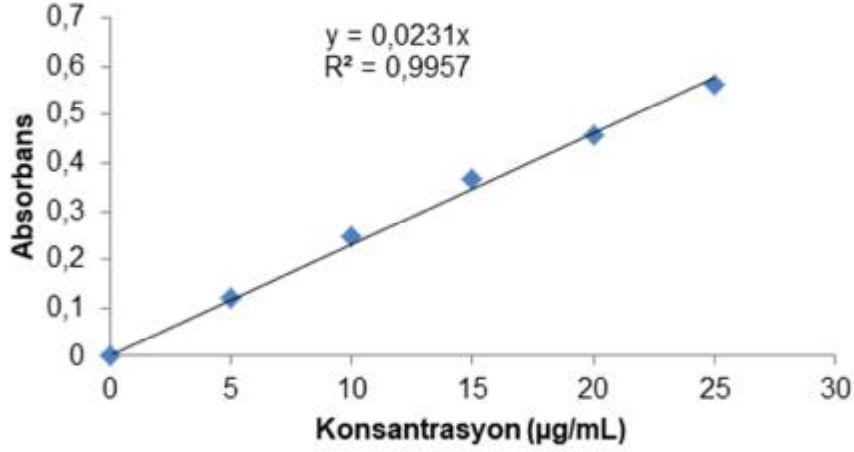
1 mL örnek ve 1 mL Coomassie protein ayırıcı (Bradford çözeltisi) deney tüpüne alınarak oda sıcaklığında 2 dk inkübe edilmiştir.

Standartlar, köre (protein çözeltisi yerine 1 mL distile su konularak hazırlanmıştır) karşı OD₅₉₅ nm’de spektrofotometrede (HITACHI-UH5300) ölçölmüştür. Çıkan absorbans değeri ve konsantrasyon değeri ile XY dağılım grafiğı (Şekil 3.1.) çizilerek R² değeri belirlenmiştir (Gallagher ve Wiley, 2008).

Çizelge 3.1. BSA Kalibrasyon Grafiğinin Hazırlanması

	Blank (Kör)	Örnek 1	Örnek 2	Örnek 3	Örnek 4	Örnek 5
dH ₂ O (mL)	2	1.9	1.8	1.7	1.6	1.5
BSA Stok çözeltisi (mL)	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
Hazırlanan çözeltinin konsantrasyonu (µg/mL)		5	10	15	20	25

(3 paralel çalışıldığı için bu miktarlar 2 katına çıkarılıp son hacim 4 mL olacak şekilde hazırlanmıştır).



Şekil 3.2. Standart Protein Eğrisi

Standart protein eğrisi çizildikten sonra mantar örneklerindeki protein miktarlarını belirlemek için yukarıdaki metod uygulanmış ve elde edilen absorbans değerlerinin ortalaması alınarak standart eğride çıkan formüle yerleştirilip protein miktarları hesaplanmıştır. Ölçümler 3'lü tekrarlar şeklinde yapılmıştır.

3.2.3. Kolon Kromatografisi

Bu çalışmada kullanılan *Cladosporium herbarum*, *Cladosporium cladosporioides* ve *Alternaria alternata* olarak tanımlanmış suşların fraksiyonlanması amacıyla her biri için ayrı ayrı kolon kromatografisi yapılmıştır. Bu amaçla “Sephadex G-100” kolonu kullanılmıştır.

3.2.3.1. Sephadex G-100 Kolonu'nun Hazırlanması

5 g Sephadex 50 mL Sodyum Fosfat tamponunda (pH 7.0) bir gece şişmesi için bekletilmiştir. Bu süre sonunda 10 mL'lik enjektörün öncelikle taban kısmına filtre kağıdı konulup, üzerine bir miktar sızmayı önlemesi için cam yünü konulmuş ve jel yavaşça damlalıkla ilave edilmiştir. Doldurma işlemi tamamlanıp jel donunca ilk etapta jeli dengelemek amacıyla 50 mL kadar tampon kolondan geçirilmiştir.

3.2.3.2. Fraksiyonlama

Kolon hazır hale geldikten sonra her bir örnek 0,5 g tartılıp 10 mL SF'de çözülüp, kaba filtreden süzülerek, 0,2 µm çaplı enjektör tipi filtre ile steril edildikten sonra 500 µl örnek kolondan geçirilmiş ve 5 mL'lik fraksiyonlar toplanmıştır.

Bu şekilde 7 tüp toplanmış ve tüplerdeki protein düzeyini saptamak amacıyla 280 nm'de spektrofotometrede protein miktarları absorbans olarak ölçülmüştür (Assis ve ark, 2007).

Kromatografi ile 10 dk'lık sürelerde ayrılan her bir fraksiyon için Bradford yöntemi ile protein miktarı tayini yapılmıştır.

3.2.4. SDS-PAGE Elektroforezi ile Moleküler Ağırlığın Belirlenmesi

Örneklerin ve fraksiyonların moleküler ağırlıklarını saptamak amacıyla %10'luk jel hazırlanarak SDS-PAGE uygulaması yapılmıştır (Rida ve ark, 2010).

3.2.4.1. Ayırıcı Jelin Hazırlanması (%10)

Sol A (6.5 mL), Sol B (5 mL) ve distile su (7.2 mL) karıştırılmış, moleküler oksijenin uzaklaştırılması için 5 dk vakum pompası ile degaz işlemi gerçekleştirilmiştir. Degaz işleminden sonra karışıma 20 µL TEMED ve 66 µL AMPS ilave edilmiştir.

Karışım önceden hazırlanmış cam plakalar arasına dökülmüştür. Jelin üst yüzeyi, atmosferik oksijenin difüzyonunu engellemek ve düzgün bir yüzey elde etmek amacıyla, ince bir su tabakasıyla kapatılmış ve jel oda sıcaklığında polimerizasyona bırakılmıştır (Bollag ve Edelstein, 1991).

3.2.4.2. Yığılma Jelin Hazırlanması (%5)

Yığılma jelin hazırlanması için 1.5 mL Sol A, 2.25 mL Sol C ve 5.25 mL distile su karıştırılıp degaz işlemi gerçekleştirilmiştir. Daha sonra karışıma 35 µL AMPS ve 15 µL TEMED eklenerek ayırma jelinin üzerine dökülmüştür.

Dengeleme jeli döküldükten sonra tarak yerleştirilip oda sıcaklığında polimerizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir (Bollag ve Edelstein, 1991).

3.2.4.3. Örneklerin Jele Yüklenmesi ve Yürütülmesi

Polimerizasyondan sonra jelde oluşan kuyucuklara örnek yükleme tamponuyla karıştırılmış 60 µL örnek yüklenmiştir. Analiz edilen örnekteki protein yapılarının moleküler ağırlıklarının saptanması için kuyucuklardan birine 10 µl marker protein yüklenmiştir (Promega, V849A).

Jele 25 mA akım uygulanarak yürütülmüştür. İzleme boyası ayırıcı jelin bitiş noktasına ulaşmadan elektroforez işlemi sonlandırılmıştır (Tanrısever, 2011).

3.2.4.4. SDS-PAGE Jelinin Boyanması

Elektroforez işlemi tamamlandıktan sonra jel cam plakalar arasından çıkarılarak boyama (staining) solüsyonu ile 2 saat boyanmıştır.

Bu süre sonunda, jele bağlanmış boyanın uzaklaştırılması için jel birkaç kez distile sudan geçirildikten sonra 1 gece boyunca destaining solüsyonunda bekletilmiştir. Şeffaflaşmış jel, bantların daha net görünmesi için %1'lik gliserol çözeltisine konulmuştur (Tanrısever, 2011).

3.2.5. Deri Delme Testinde Kullanılan Test Materyalinin Hazırlanması

Doğal izolat olan 3 küf suşundan üretilen total ekstraksiyonlar ve bunların Sephadex kolon ile ayrılan fraksiyonlarının protein içerikleri Bradford yöntemi ile saptanmıştır.

Hem total ekstraksiyonlar hem de 5'er mL'lik Sephadex kolondan geçirilmiş fraksiyonlar Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk İmmünoloji ve Alerji Hastalıkları Bilim Dalı Kliniğinde standart alerjenlere paralel olarak küf alerji tanısı konulmuş bireylere uygulanmıştır.

Liyofilize örnekler 0,5 g tartılıp 10 mL SF'de çözülmüş, filtre edilmiş ve 0,2 µm enjektör tipi filtre ile steril edilmiştir. Toplanan fraksiyonlar da filtre ile steril

edilerek örneklerin tamamı 2'şer mL olacak şekilde ayrı ayrı eppendorflara alınmıştır.

Hazırlanan test materyallerinin mikrobiyal kontaminasyonlardan korunması amacıyla %20 oranında Gliserol-Fenol karışımı (*fenol konsantrasyonu %0,4*) eklenmiştir.

Gliserol-Fenol Karışımının Hazırlanması: Öncelike kristal formdaki fenol, su banyosunda 80°C'de sıvılaştırılmıştır. Gliserol-Fenol karışımı 98:2 (v/v) oranında hazırlandıktan sonra, 2 mL test materyaline 500 µl eklenmiştir (Plunkett, 2008). Bu şekilde hazırlanmış test materyalinin raf ömrü, +4°C'de saklandığında, oda sıcaklığında saklananlara göre etkinliğini kaybetmeden uzamaktadır ve yaklaşık 18 ay kullanılabilir (Adkinson ve ark, 2009).

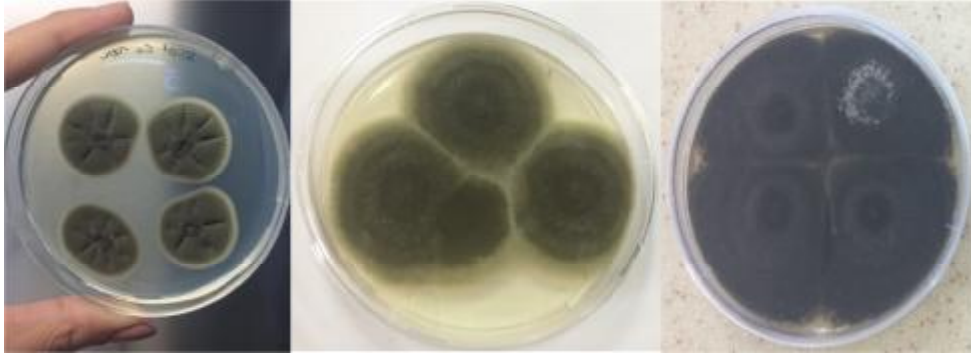
Alerji Polikliniğine gönderilmeden önce her bir örnek kanlı agar ekilmiş ve sterilite kontrolleri yapılmıştır (Al-Suwaini ve ark, 2001).

Bu çalışmaya dahil edilen bireylerden hasta onam formu alınmış ve çalışma için etik kurul onayı alınmıştır.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. *Cladosporium* ve *Alternaria* Suşlarından Küf Ekstraktlarının Hazırlanması

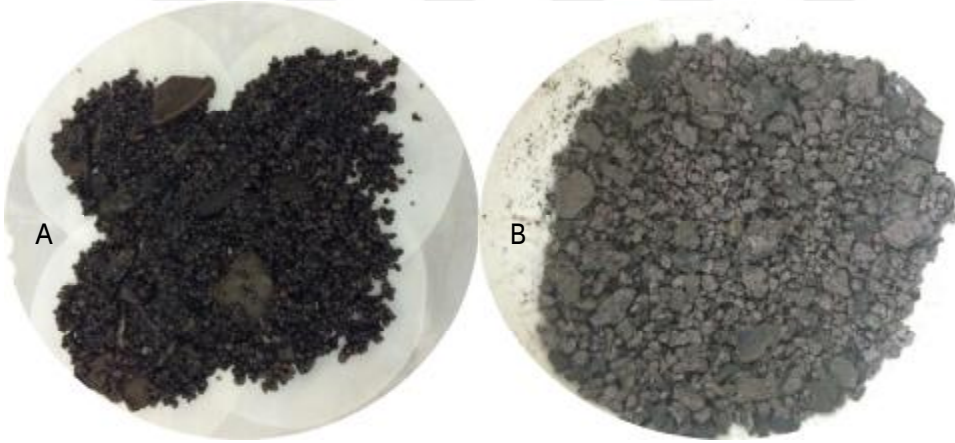
Cladosporium cladosporioides, *Cladosporium herbarum* ve *Alternaria alternata* olarak tanımlanmış küf suşları öncelikle PDA katı besiyerinde tek koloni düşecek şekilde (Şekil 4.1.) üretilmiştir. PDA'da saf kültür elde edildikten sonra her bir suş Czapek Dox sıvı besiyerinde (Şekil 4.2.) 25°C'de 14 gün süreyle üretilmiştir. Elde edilen miseller filtre kağıdı ile toplanarak (Şekil 4.3.) 1 gece kurutulup sıvı azot ile dondurup havanda ezme (Şekil 4.4.), ultra turrax ve sonikatör ile parçalama (Şekil 4.5.), dondur-çöz (freze & thaw) uygulamalarına tabi tutulmuştur. Bu işlemler sonunda elde edilen ekstrakt 1 gece -20°C'de dondurulmuş ve liyofilizatörde 0,0010 mbar basınç altında, -82°C'de, 24 saat liyofilize edilmiştir (Şekil 4.6.).



Şekil 4.1. *C. cladosporioides*, *C. herbarum* ve *A. alternata* PDA'daki Koloni Morfolojileri



Şekil 4.2. Czapek Dox Sıvı Besiyerinde Üremiş Küf Kültürleri (14 Gün)



Şekil 4.3. A. Küflerin Filtrasyon Sonrası Görüntüsü, B. Filtrasyonla Toplanan Misellerin Kurutulmuş Hali



Şekil 4.4. Sıvı Azot Tankı ve Sıvı Azot İle Parçalanmış Toz Haldeki Küf Örneği



Şekil 4.5. Ultra Turrax ve Sonikatör İle Parçalama İşlemi



Şekil 4.6. Liyofilizasyon Uygulaması (0,0010 mbar Basınç Altında, -82°C’de, 24 Saat)

Al-Suwaini ve ark (2001), Riyad atmosferinden izole ettikleri *Cladosporium* ve *Alternaria* olarak tanımladıkları örnekleri 250 mL Czapek Dox sıvı besiyerine ekmiş ve oda sıcaklığında fungusun üremesine bağlı olarak 3-10 hafta inkübasyona bırakmışlardır.

Özmay (2007), ECO MASS 100 Mikrobiyal Hava İzleme Sistemi ile Rose Bengal Streptomycine Agar’a örnekleme yapmış ve 25-27°C’de 7-14 gün inkübasyona bırakmışlardır. Üreyen koloniler PDA besiyerine inoküle edilerek 14 gün 25-27°C’de inkübe edilmiştir. Buradan da identifikasyon amacıyla Malt Ekstrakt Agar (MEA), Czapek Dox Agar (CZ), Patates Dextroz Agar (PDA) besiyerlerine inoküle edilerek 7 gün 25-27°C’de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra koloni morfolojisini mikroskopik incelemelere göre tanılamışlardır.

Pose ve ark (2009; 2010), sentetik bir besiyerinde sıcaklığın *A. alternata*’nın çimlenmesi ve üremesi üzerindeki etkisini incelemişlerdir. En kısa çimlenme

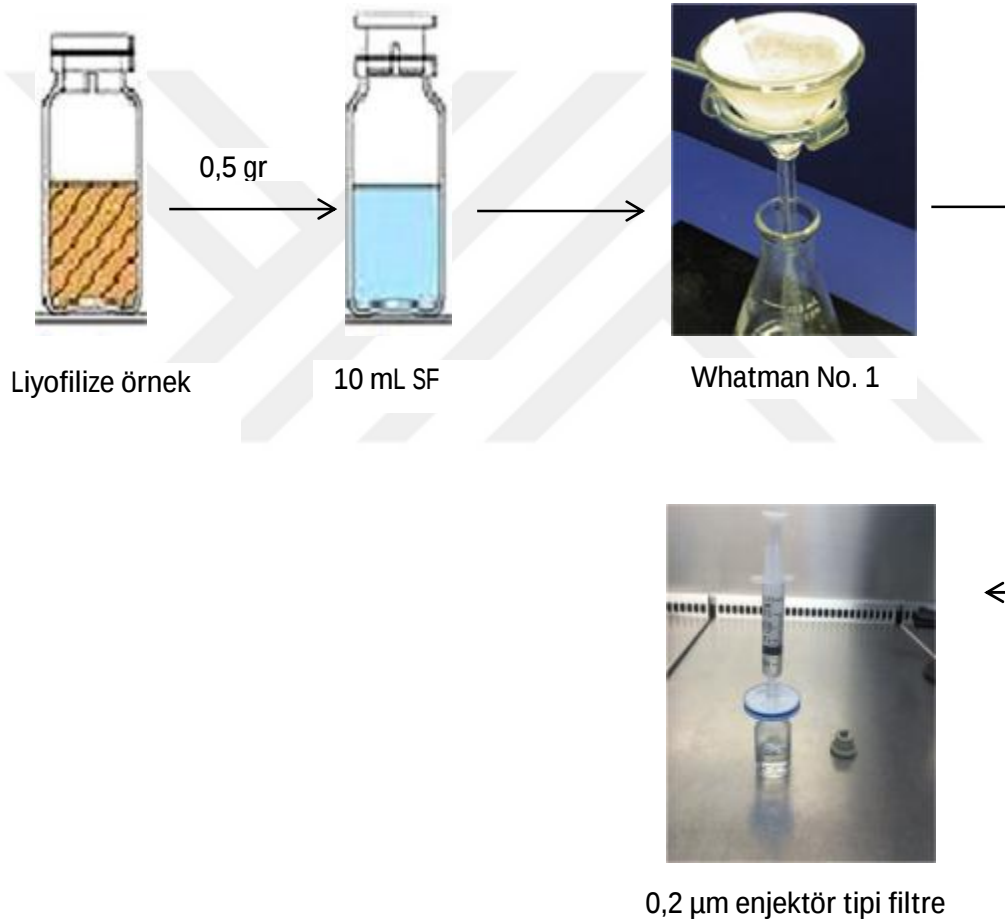
süresini 21-35°C'de, en hızlı üreme oranını ise 21°C'de kaydetmişlerdir. 6-15°C'de hiçbir gelişme veya çimlenme gözlememişlerdir. 6°C'de üreme hızlarında belirgin bir azalma olduğunu saptamışlardır.

Akdağ (2010), *Cladosporium herbarum*, *Cladosporium oxysporum*, *Alternaria tenuissima*, *Alternaria pluriseptata*, *Alternaria alternata* olarak tanımlanmış 5 küf suşunu PDA besiyerine ekerek 14 gün 25-27 °C'de inkübe etmişlerdir. Daha sonra, 250 mL Czapek Dox sıvı besiyerine inoküle ederek 14 gün süre ile 25-27 °C'de Shaker'da üretmişlerdir. Bu süre sonunda elde ettikleri miselleri 6500 rpm'de, +4 °C'de santrifüj ederek çöktürmüşlerdir. Çökeltiyi önce homojenizatör ile (Ultra-Turrax T25), sonra sıvı azot ile (dondurup-ezme) parçalamış, tam parçalanmayan partikülleri Sonikatör (Bandelin Sonopuls HD 2070 ultrasonik homojenizatör) yardımı ile homojenize etmişler ve diyaliz tüplerine alarak 48 saat süre ile distile suya karşı +4 °C'de diyaliz etmişlerdir. Diyaliz sonucunda filtrasyonla (0.2 µm, Sartorius) sterilizasyon işlemi gerçekleştirmişlerdir. Bütün ekstraktları liyofilizasyondan önce enjektör tipi filtre (0.2 µm, Sartorius) ile 2. kez steril etmişler ve örnekleri 24 saat süre ile Liyofilizatörde liyofilize etmişlerdir.

Skóra ve ark (2015), Alt a 1 alerjen proteinini üretmek için hava kaynaklı *Alternaria lini* suşu ile *Alternaria alternata* ATCC 6663 hazır suşunu karşılaştırmışlardır. Bu amaçla küfler Czapek sıvı besiyerinde (Difco), ve mineral M0 besiyerinde (glukoz 5 g, MgSO₄ × 7H₂O 5 g, (NH₄)₂SO₄ 3 g, KH₂PO₄ 1 g, maya 10 g, distile su ile 1000 mL'ye tamamlanır, pH 7.0) 27 ± 2°C'de 24 gün inkübe etmişlerdir. Ekstraksiyon amacıyla; 0,22 µm por çaplı filtre ile filtrasyon, homojenizatör (BioGen PRO 200; PROScientific, Oxford, CT, USA) ile 35,000 rpm'de 4 dk homojenizasyon, 0,22 µm por çaplı filtre ile yeniden filtrasyon, tekrar homojenizasyon, standart Whatman filtre kağıdı ile filtrasyon, ultrafiltrasyon ile diyaliz (Pellicon system, Millipore) aşamalarını gerçekleştirmişlerdir.

4.2. Liyofilize Örneklerin Deneyisel Aşamalarda Kullanılmak Üzere Hazırlanması

Liyofilize örneklerden 0,5 g tartılıp, 10 mL serum fizyolojik (SF) içerisinde çözünmüştür. Kaba filtre kağıdı (Whatman No. 1) ile süzölmüştür. Son olarak 0,2 µm çaplı enjektör tipi filtre ile steril edilerek kullanıma hazır hale getirilmiştir (Şekil 4.7.).

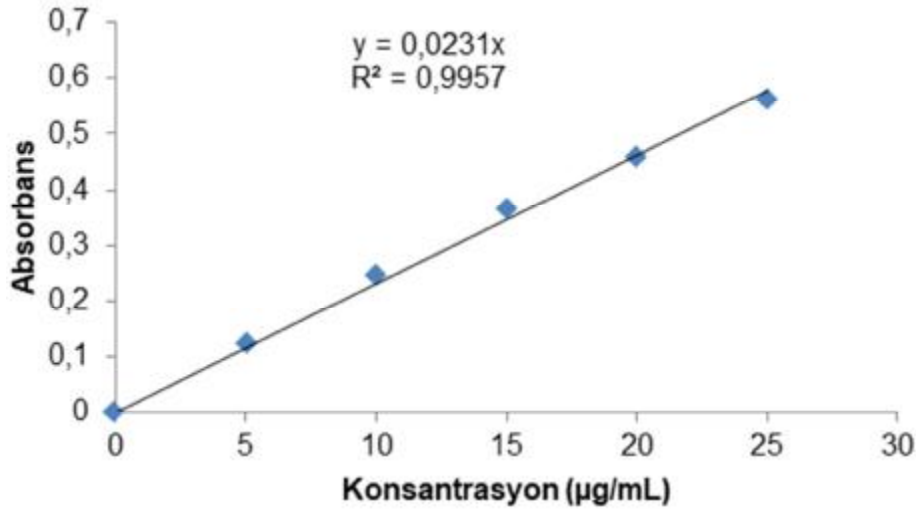


Şekil 4.7. Liyofilize Örneklerin Deneylerde Kullanılmak Üzere Hazırlanması

4.3. Alerjenlerin Protein Miktarının Saptanması

Alerjenlerin protein miktarı Bradford yöntemi ile tayin edilmiştir. 0,5 g liyofilize örnek tartılarak 10 mL SF içerisinde karıştırılıp, sırasıyla filtre kağıdından ve 0,2 µm enjektör tipi filtreden geçirildikten sonra protein tayini yapılmıştır. 1 mL örnek ve 1 mL Bradford çözeltisi karıştırılarak oda sıcaklığında 2 dk inkübe edildikten sonra spektrofotometrede (HITACHI-UH5300) OD₅₉₅ nm’de absorbans değerleri ölçülmüştür.

BSA standart protein eğrisi çizildikten sonra elde edilen formülde ($y=0,0231x$) “y” yerine OD_{ort} absorbans değeri konularak “x” yani protein konsantrasyonu bulunmuştur (Şekil 4.8.).



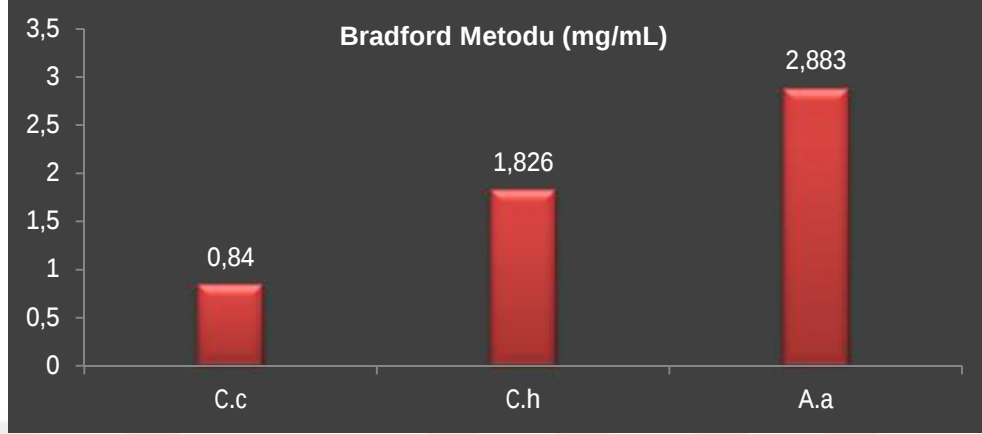
Şekil 4.8. Standart Protein Eğrisi

Buna göre örneklerin protein miktarı;

Ø *Cladosporium cladosporioides* için; 0,84 mg/mL

Ø *Cladosporium herbarum* için; 1,826 mg/mL

Ø *Alternaria alternata* için; 2,883 mg/mL olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.9.)

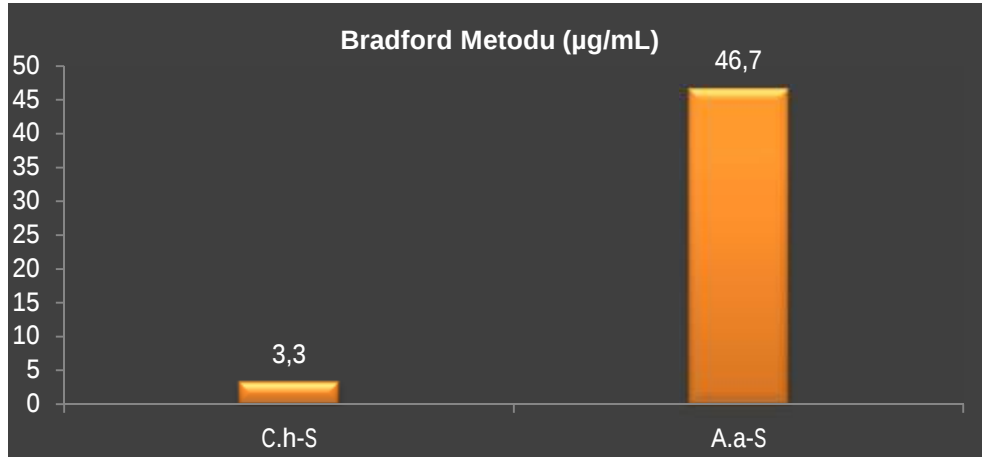


Şekil 4.9. Örneklerin Protein Miktarı

Klinikte kullanılan standart alerjenlerden (Allergopharma) de protein miktarı tayini yapılmış ve sonuçlar;

Ø *Cladosporium herbarum* için: 3,3 µg/mL

Ø *Alternaria alternata* için: 46,7 µg/mL olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.10.)



Şekil 4.10. Standartların Protein Miktarı

Al-Suwaini ve ark (2001), Riyad atmosferinden izole ettikleri funguslardan hazırladıkları ekstraktlardan COBAS-BIO tekniği ile protein miktarı tayini

yapmışlardır. Buna göre; *Cladosporium*'un protein içeriğini 0,9 mg/mL, *Alternaria*'nın protein içeriğini 1,9 mg/mL olarak saptamışlardır.

Esch (2004), farklı üretici firmaların standart alerjenleri ile yaptığı araştırmada her bir firmanın hazırladığı antijenin içeriğindeki *Alternaria alternata* protein miktarını sırasıyla; Greer için 1,85 µg/mL, Hollister-Stier için 2,75 µg/mL, ALK-Abello için 0,04 µg/mL, Allergy Labs için 0,05 µg/mL, Allermed için 0,05 µg/mL, Nelco Labs için 2,04 µg/mL, Antigen Labs için 0,09 µg/mL olarak bildirmiştir.

Kespohl ve ark (2016), farklı firmaların üretmiş olduğu alerjenlerin antijen içeriğini *Cladosporium herbarum* ve *Alternaria alternata* için sırasıyla; Allergopharma; 8 µg/mL ve 124 µg/mL, ALK-Abello; 20 µg/mL ve 79 µg/mL, Lofarma; 13 µg/mL ve 2 µg/mL olarak saptamışlardır. HAL firmasına ait *Alternaria alternata*'nın protein içeriğini ise 8 µg/mL olarak saptamışlardır.

Akdağ (2010), total ekstraksiyon ile ürettiği test materyallerinin protein miktarını; *Cladosporium herbarum* için 1,57 mg/mL, *Cladosporium oxysporum* için 2,60 mg/mL, *Alternaria tenuissima* için 2,44 mg/mL, *Alternaria pluriseptata* için 1,96 mg/mL, *Alternaria alternata* için 2,46 mg/mL, bütün suşların karışımından hazırladığı Mix için 3,01 mg/mL olarak saptamıştır. Klinikte kullanılan standart alerjenler için de protein miktarı tayini yapmış ve *Alternaria* standardını 20,6 mg/mL, *Cladosporium* standardını 15,2 mg/mL, Mix 1 alerjenini 29,1 mg/mL, Mix 2 alerjenini 35,9 mg/mL olarak bulmuştur.

Bu araştırmada elde edilen protein miktarları söz konusu literatür sonuçları ile yaklaşık değerlerde olup üretilen ekstraktların test materyali olarak etkin kullanılabileceğinin göstergesidir.

Alerjenlerin standardizasyonu özellikle mikroorganizma temelli çalışmalarda son derece zordur. Çünkü her bir üretim aşamasında tüm koşulları ve inokülasyon miktarını sabit tutmak, üretimde standart oranda protein elde edilmesini mümkün kılamamaktadır (Adkinson ve ark, 2009).

4.4. Kolon Kromatografisi

Bu amaçla hazırladığımız Sephadex G-100 kolonundan (Şekil 4.11.) 3 örnek sırasıyla geçirilmiştir. Örnekler 0,5 g tartılıp 10 mL SF'de çözülüp, kaba filtreden ve 0,2 µm enjektör tipi filtreden geçirilip hazır hale getirilmiştir. Her bir örnek için 5'er mL'lik fraksiyonlar toplam 7 tüpte toplanmış ve 280 nm'de spektrofotometrede protein miktarları absorbans olarak ölçülmüştür. Böylece kaç tüpün protein içerdiği saptanmıştır.



Şekil 4.11. Sephadex G-100 Kolon Kromatografisi

Çizelge 4.1., 4.2. ve 4.3.'te sırasıyla *Cladosporium cladosporioides*, *Cladosporium herbarum* ve *Alternaria alternata* için fraksiyonlama sonuçları verilmiştir.

Çizelge 4.1. *C. cladosporioides* Fraksiyon Sonuçları

C.c 1 no'lu tüp (5mL)	0,027	4 fraksiyonda protein olduğunu gösterir.
C.c 2 no'lu tüp (5mL)	0,090	
C.c 3 no'lu tüp (5mL)	0,043	
C.c 4 no'lu tüp (5mL)	0,004	
C.c 5 no'lu tüp (5mL)	0	
C.c 6 no'lu tüp (5mL)	0	
C.c 7 no'lu tüp (5mL)	0	

Çizelge 4.2. *C. herbarum* Fraksiyon Sonuçları

C.h 1 no'lu tüp (5mL)	0,060	4 fraksiyonda protein olduğunu gösterir.
C.h 2 no'lu tüp (5mL)	0,174	
C.h 3 no'lu tüp (5mL)	0,036	
C.h 4 no'lu tüp (5mL)	0,002	
C.h 5 no'lu tüp (5mL)	0	
C.h 6 no'lu tüp (5mL)	0	
C.h 7 no'lu tüp (5mL)	0	

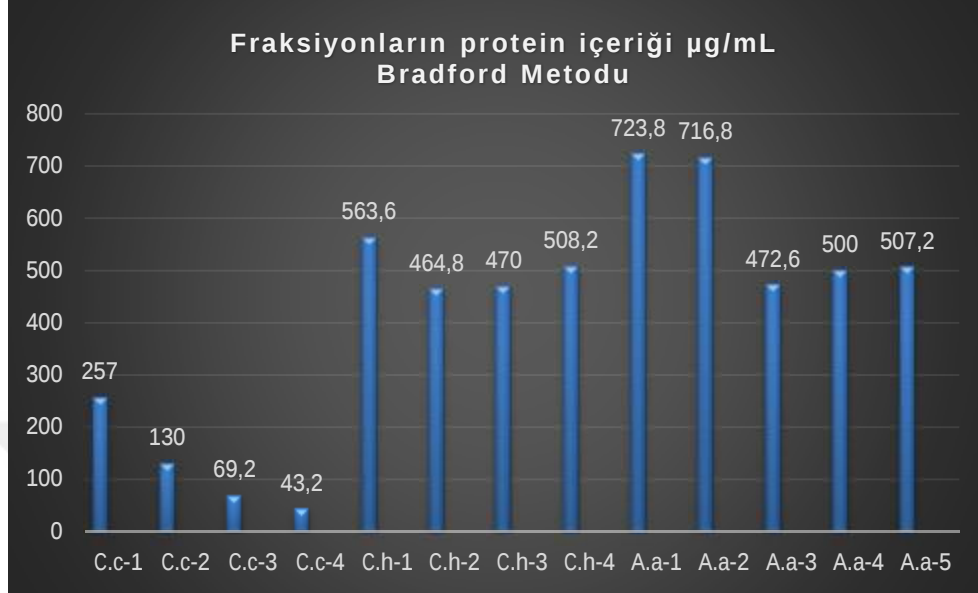
Çizelge 4.3. *A. alternata* Fraksiyon Sonuçları

A.a 1 no'lu tüp (5mL)	0,108	5 fraksiyonda protein olduğunu gösterir.
A.a 2 no'lu tüp (5mL)	0,540	
A.a 3 no'lu tüp (5mL)	0,326	
A.a 4 no'lu tüp (5mL)	0,021	
A.a 5 no'lu tüp (5mL)	0,021	
A.a 6 no'lu tüp (5mL)	0	
A.a 7 no'lu tüp (5mL)	0	

Assis ve ark (2007), yaptıkları çalışmada *Malpighia glabra*'dan izole ettikleri pektinmetilesteraz (PME)'ı saflaştırmak için Sephadex G-100 kolonu kullanmışlardır. Öncelikle Borat-Asetat tamponu ile dengelenmiş Sephadex G-100 kolonuna örnekleri yüklemişlerdir ve 4 mL'lik fraksiyonlar toplayarak PME aktivitesine bakmışlardır.

4.5. Fraksiyonların Protein Miktarının Saptanması

10 mL SF'de 0,5 g çözölen liyofilize örnekler kaba filtre kağıdından süzölmüş ve ardından 0,2 µm enjektör tipi filtre ile steril edilmiştir. Bu şekilde hazırlanan örneklerin protein miktarı Bradford yöntemi ile saptanmıştır (Şekil 4.12.)



Şekil 4.12. Fraksiyonların Protein Miktarı (µg/mL)

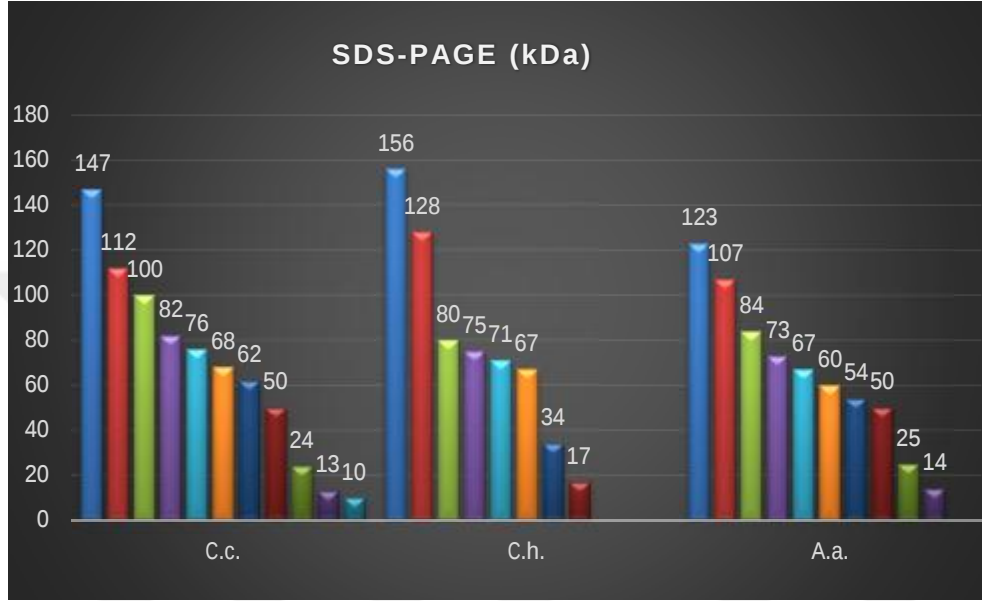
Fraksiyonların protein miktarına bakıldığında; C.c-1'in 257 µg/mL, C.c-2'nin 130 µg/mL, C.c-3'ün 69,2 µg/mL, C.c-4'ün 43,2 µg/mL, C.h-1'in 563,6 µg/mL, C.h-2'nin 464,8 µg/mL, C.h-3'ün 470 µg/mL, C.h-4'ün 508,2 µg/mL, A.a-1'in 723,8 µg/mL, A.a-2'nin 716,8 µg/mL, A.a-3'ün 472,6 µg/mL, A.a-4'ün 500 µg/mL, A.a-5'in 507,2 µg/mL olarak bulunmuştur.

4.6. SDS-PAGE Elektroforezi ile Moleküler Ağırlığın Belirlenmesi

Cladosporium cladosporioides, *Cladosporium herbarum*, *Alternaria alternata* örneklerinin ve bunların fraksiyonlarının moleküler ağırlıklarını saptamak amacıyla SDS-PAGE analizi %10'luk akrilamid jelde gerçekleştirilmiştir. Tüm örnekler ait bantlar marker protein (Promega, V849A, 225, 150, 100, 75, 50, 35, 25, 15, 10 kDa) ile kıyaslanarak moleküler ağırlıkları hesaplanmıştır (Şekil 4.15., 4.16, 4.17.).

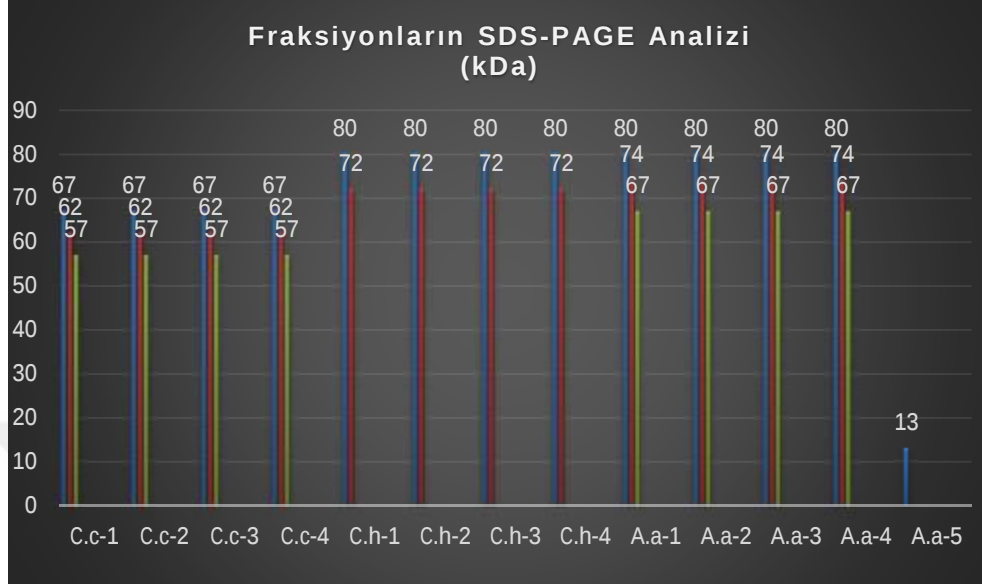
Sonuçlara göre *Cladosporium cladosporioides*'e ait 11, *Cladosporium herbarum*'a ait 8, *Alternaria alternata*'ya ait 10 farklı moleküler büyüklüğe sahip

bant olduğu saptanmıştır (Şekil 4.13.). Fraksiyonların moleküler ağırlıkları Şekil 4.14.'te görülmektedir.



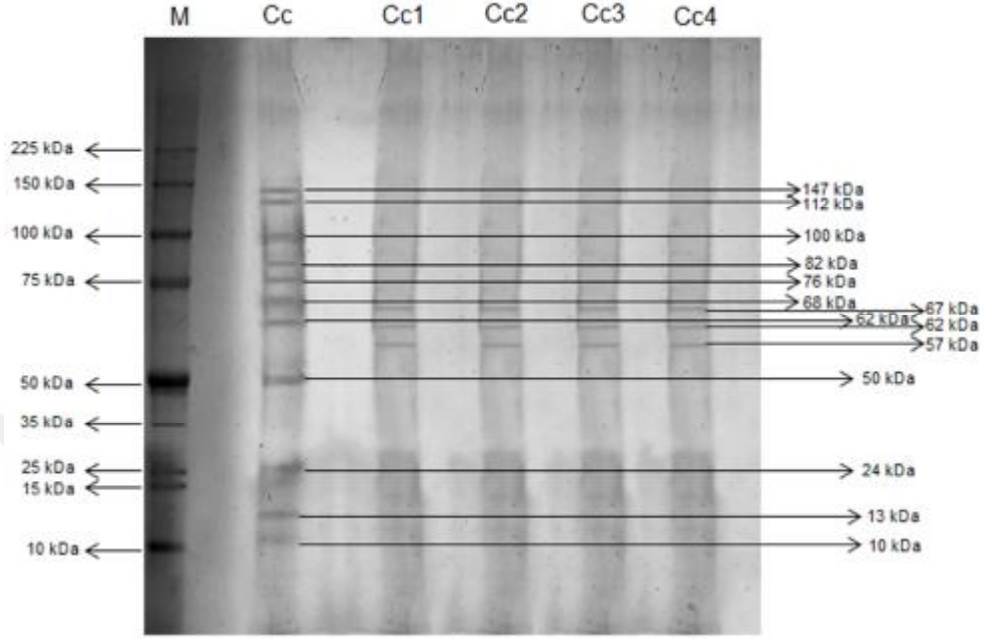
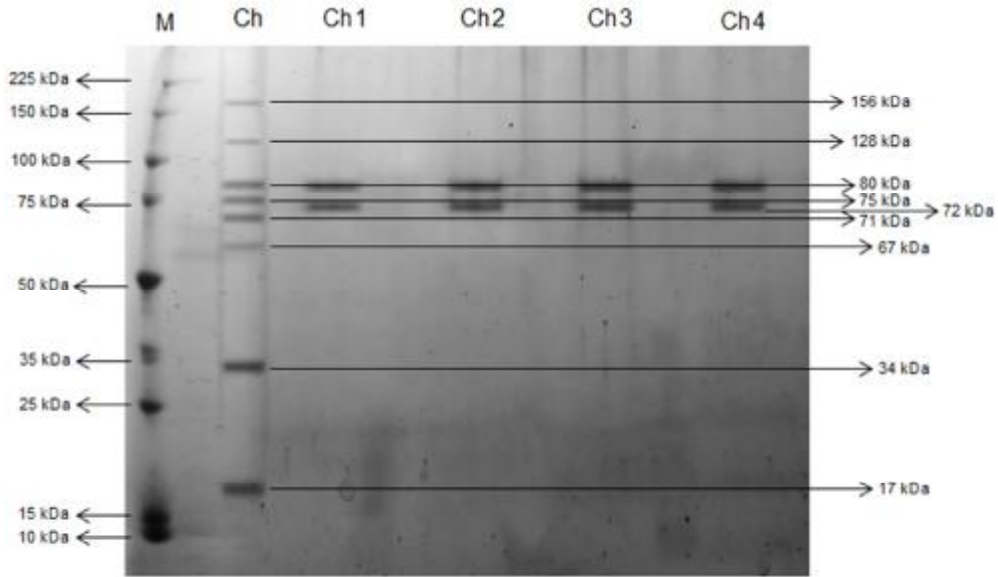
Şekil 4.13. *C. cladosporioides*, *C. herbarum* ve *A. alternata*'nın SDS-PAGE Sonucu Moleküler Ağırlıkları

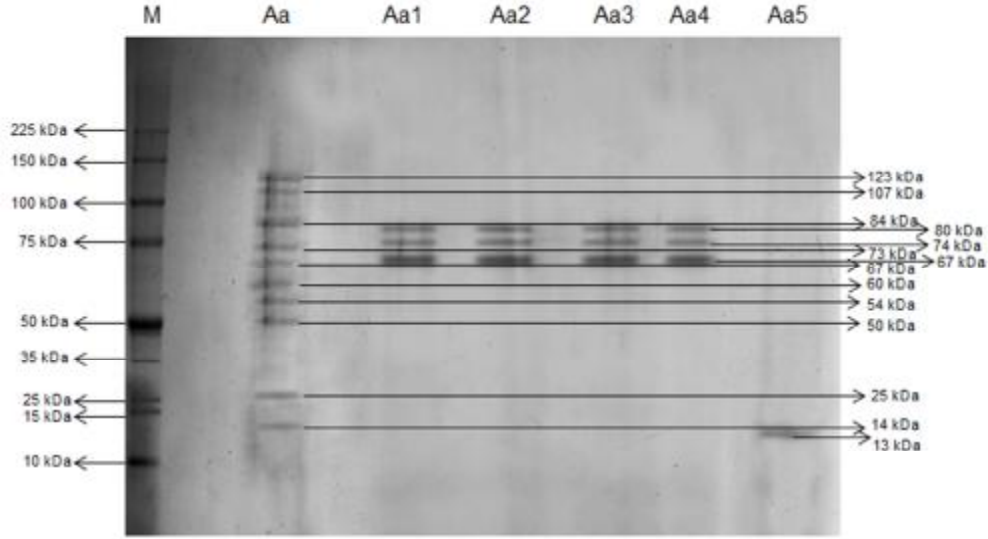
Total test materyallerinin moleküler ağırlıklarına bakıldığında; C.c örneğinin 147, 112, 110, 82, 76, 68, 62, 50, 24, 13 ve 10 kDa ağırlığında 11 banda, C.h örneğinin 156, 128, 80, 75, 71, 67, 34 ve 17 kDa ağırlığında 8 banda, A.a örneğinin 123, 107, 84, 73, 67, 60, 54, 50, 25 ve 14 kDa ağırlığında 10 banda sahip olduğu görülmüştür.



Şekil 4.14. *C. cladosporioides*, *C. herbarum* ve *A. alternata*'nın Fraksiyonlarının SDS-PAGE Sonucu Moleküler Ağırlıkları

Fraksiyonların moleküler ağırlıklarına bakıldığında; C.c-1, C.c-2, C.c-3 ve C.c-4 örneklerinin 67, 62 ve 57 kDa ağırlığında 3 banda, C.h-1, C.h-2, C.h-3 ve C.h-4 örneklerinin 80 ve 72 kDa ağırlığında 2 banda, A.a-1, A.a-2, A.a-3, A.a-4 örneklerinin 80, 74, 67 kDa ağırlığında 3 banda, A.a-5 örneğinin 13 kDa ağırlığında 1 banda sahip olduğu bulunmuştur.

Şekil 4.15. *C.cladosporioides*'e Ait Jel GörüntüsüŞekil 4.16. *C. herbarum*'a Ait Jel Görüntüsü



Şekil 4.17. *A. alternata*'ya Ait Jel Görüntüsü

Crameri (2015), yaptığı çalışmada *Alternaria*'nın en temel alerjeni olan Alt a 1'in moleküler ağırlığını 30 kDa olarak bulmuş ve 16.4, 15.3 kDa'luk iki alt üniteden oluştuğunu göstermiştir.

Rid ve ark, (2010), izolasyonunu ve karakterizasyonu yaptıkları *Cladosporium herbarum*'un moleküler ağırlığını 29.9 kDa olarak bulmuşlardır.

Al-Suwaini ve ark (2001), Riyad atmosferinden izole ettikleri hava kaynaklı mantarların alergen ve antijenik özellikleri üzerine yaptıkları çalışmada SDS-PAGE elektroforezi sonucu *Alternaria*'nın 13-79 kDa aralığında bir çok bant, *Cladosporium*'un 34-79 kDa aralığında 4 bant verdiğini saptamışlardır.

4.7. Kanlı Agarda Sterilite Kontrolü

Üretilen test materyallerinin mikroorganizma ile kontamine olması, materyalin bozunmasına neden olacağı gibi, deri testinde uygulandığında lokal enfeksiyon riski de taşıyabilir. Bu nedenle test materyali kullanılmadan önce kanlı agara ekilerek sterilite kontrolü yapılmıştır.

Deri delme testinde kullanılmak üzere %0,4 fenol ihtiva edecek şekilde

hazırlanmış test materyalleri Çukurova Üniversitesi Çocuk İmmünoloji ve Alerji Hastalıkları Bilim Dalı, Alerji Polikliniği'ne gönderilmeden önce her biri Kanlı Agar'a ekilmiş ve sterilit kontrolleri yapılmıştır. Şekil 4.18.'de görüldüğü gibi hiçbir örnekte üreme olmamıştır.



Şekil 4.18. Tüm örnekler için Kanlı Agar'da Sterilite Kontrol Sonuçları

Al-Suwaini ve ark (2001), hazırladıkları mantar ekstraktlarını liyofilize ettikten sonra 0,22 µm filtre ile steril etmişler ve kanlı agarda sterilit kontrolü yapmışlardır. Daha sonra her bir antijene %50 gliserin ekleyerek King Saud Üniversitesi, King Khalid Hastanesi'nde deri testinde kullanmışlardır.

Akdağ (2010), hazırladığı liyofilize mantar ekstraktlarını alerji testlerinde

kullanılmadan önce steril serum fizyolojik (%0.9 NaCl) içerisinde çözerek örnekleri kanlı agara ekip sterilite kontrollerini yapmıştır.

4.8. Deri Delme Testi (Skin Prick Test)

3 küf suşundan elde edilen total test materyalleri ve Sephadex kolondan geçirilen 13 fraksiyon örnekleri özel damlalıklı şişelere alınmıştır (Şekil 4.19.). Ç.Ü. Tıp Fakültesi Çocuk İmmünoloji ve Alerji Hastalıkları Bilim Dalı Anabilim Dalı'nda küf alerjisi tanısı almış hastalara klinikte kullanılan alerjenlere paralel olarak uygulanmıştır. Hastaların en az bir hafta boyunca antihistaminik ilaç almamış olmaları gerekir. Aksi taktirde test hatalı sonuç verebilir. Test bireylerin ön kol yüzeyine uygulanmıştır. Bu amaçla kolun ön yüzü alkol ile temizlendikten sonra 2-3 cm aralıklarla 20 µL test materyali damlatılarak lanset yardımı ile deride kanamaya neden olmadan küçük delik açılmıştır.

Test sonucunun değerlendirilmesi amacıyla pozitif kontrol olarak histamin, negatif kontrol olarak serum fizyolojik (SF) deriye uygulanmış, 15 dakika bekledikten sonra deride meydana gelen kızarıklık (hiperemi) ve kabarıklık/şişlik (endürasyon) cetvel ile ölçülerek değerlendirme yapılmıştır (Şekil 4.19.). Pozitif kontrol için deriye uygulanan histamin cevabına göre, bireylerde değerlendirme yapılmıştır (Rasool ve ark, 2013). Kaynaklara göre hiperemi ve kabarıklık 2 mm ve üzeri olduğunda test sonucu pozitif olarak değerlendirilmektedir (Çizelge 4.4., 4.5., 4.6., 4.7., 4.8., 4.9.).

Çalışmaya toplam 37 küf alerjili hasta ve 20 kontrol grubu katılmıştır.



Şekil 4.19. Hazırlanan Total Hücre Ekstraktları ve Fraksiyonları



Şekil 4.20. Deri Testi Sonucu Hastada Oluşan Endürasyon ve Hiperemi Görüntüleri (2 Hasta Örneği)

Çizelge 4.4. *Cladosporium cladosporioides* Deri Testi Sonuçları (Kontrol Grubu)

Hasta No	SF	His	Standart Alerjen	Mantar Ekstraktı				
			<i>Cladosporium</i>	Cc	Cc1	Cc2	Cc3	Cc4
1	Neg	5x5	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
	Neg	20x30	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
2	Neg	3x3	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
	Neg	15x25	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
3	Neg	4x4	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
	Neg	20x25	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
4	Neg	4x4	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
	Neg	30x30	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
5	Neg	2x2	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
	Neg	8x10	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
6	Neg	3x3	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
	Neg	15x20	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
7	Neg	5x5	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
	Neg	35x45	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
8	Neg	4x4	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
	Neg	20x20	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
9	Neg	4x4	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
	Neg	20x25	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
10	Neg	3x3	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
	Neg	20x20	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
11	Neg	5x5	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
	Neg	30x35	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
12	Neg	4x4	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
	Neg	25x30	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
13	Neg	4x4	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
	Neg	15x20	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
14	Neg	5x5	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
	Neg	35x40	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
15	Neg	2x2	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
	Neg	10x10	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
16	Neg	3x3	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
	Neg	25x35	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
17	Neg	4x4	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
	Neg	20x20	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
18	Neg	5x5	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
	Neg	30x30	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
19	Neg	3x3	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
	Neg	15x25	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
20	Neg	4x4	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
	Neg	25x25	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg

Çizelge 4.5. *Cladosporium cladosporioides* Deri Testi Sonuçları (Hasta Grubu)

Hasta No	SF	His	Standart Alerjen	Mantar Ekstraktı				
			<i>Cladosporium</i>	Cc	Cc1	Cc2	Cc3	Cc4
1	Neg	3x3	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
	Neg	30x35	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
2	Neg	4x4	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
	Neg	25x30	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
3	Neg	5x5	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
	Neg	45x45	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
4	Neg	5x5	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
	Neg	30x30	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
5	Neg	5x5	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
	Neg	40x40	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
6	Neg	3x3	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
	Neg	15x15	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
7	Neg	5x5	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
	Neg	30x30	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
8	Neg	5x5	3x3	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
	Neg	20x20	12x17	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
9	Neg	4x4	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
	Neg	20x18	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
10	Neg	4x4	2x2	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
	Neg	20x20	7x10	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
11	Neg	4x4	3x3	2x2	Neg	Neg	Neg	Neg
	Neg	20x20	20x22	3x3	Neg	Neg	Neg	Neg
12	Neg	3x3	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
	Neg	10x15	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
13	Neg	3x3	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
	Neg	20x20	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
14	Neg	4x4	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
	Neg	20x20	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
15	Neg	5x5	3x3	2x2	Neg	Neg	Neg	Neg
	Neg	22x30	12x17	3x3	Neg	Neg	Neg	Neg
16	Neg	5x5	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
	Neg	20x30	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
17	Neg	5x5	2x2	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
	Neg	25x30	11x15	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
18	Neg	3x3	2x2	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
	Neg	20x20	10x10	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
19	Neg	4x4	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
	Neg	20x20	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
20	Neg	2x2	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
	Neg	4x4	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg

Çizelge 4.5 Devamı

Hasta No	SF	His	Standart Alerjen	Mantar Ekstraktı				
			<i>Cladosporium</i>	Cc	Cc1	Cc2	Cc3	Cc4
21	Neg	5x5	2x2	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
	Neg	30x30	3x3	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
22	Neg	5x5	4x4	3x3	2x2	2x2	2x2	Neg
	Neg	30x30	20x20	17x15	10x10	5x5	Neg	Neg
23	Neg	5x5	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
	Neg	30x30	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
24	Neg	3x3	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
	Neg	30x20	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
25	Neg	3x3	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
	Neg	15x20	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
26	Neg	4x4	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
	Neg	15x18	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
27	Neg	3x3	2x2	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
	Neg	20x20	7x10	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
28	Neg	5x5	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
	Neg	35x35	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
29	Neg	4x4	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
	Neg	20x20	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
30	Neg	4x4	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
	Neg	15x15	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
31	Neg	3x3	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
	Neg	25x25	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
32	Neg	5x5	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
	Neg	25x20	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
33	Neg	3x3	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
	Neg	15x15	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
34	Neg	4x5	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
	Neg	22x25	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
35	Neg	5x5	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
	Neg	25x25	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
36	Neg	5x5	2x2	2x2	2x2	Neg	Neg	Neg
	Neg	32x35	7x7	3x3	Neg	Neg	Neg	Neg
37	Neg	5x5	4x4	2x2	2x2	Neg	Neg	Neg
	Neg	20x20	20x15	10x10	Neg	Neg	Neg	Neg

Çizelge 4.6. *Cladosporium herbarum* Deri Testi Sonuçları (Kontrol Grubu)

Hasta No	SF	His	Standart Alerjen	Mantar Ekstraktı				
			<i>Cladosporium</i>	Ch	Ch1	Ch2	Ch3	Ch4
1	Neg	5x5	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
	Neg	20x30	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
2	Neg	3x3	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
	Neg	15x25	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
3	Neg	4x4	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
	Neg	20x25	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
4	Neg	4x4	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
	Neg	30x30	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
5	Neg	2x2	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
	Neg	8x10	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
6	Neg	3x3	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
	Neg	15x20	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
7	Neg	5x5	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
	Neg	35x45	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
8	Neg	4x4	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
	Neg	20x20	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
9	Neg	4x4	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
	Neg	20x25	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
10	Neg	3x3	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
	Neg	20x20	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
11	Neg	5x5	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
	Neg	30x35	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
12	Neg	4x4	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
	Neg	25x30	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
13	Neg	4x4	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
	Neg	15x20	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
14	Neg	5x5	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
	Neg	35x40	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
15	Neg	2x2	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
	Neg	10x10	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
16	Neg	3x3	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
	Neg	25x35	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
17	Neg	4x4	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
	Neg	20x20	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
18	Neg	5x5	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
	Neg	30x30	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
19	Neg	3x3	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
	Neg	15x25	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
20	Neg	4x4	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
	Neg	25x25	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg

Çizelge 4.7. *Cladosporium herbarum* Deri Testi Sonuçları (Hasta Grubu)

Hasta No	SF	His	Standart Alerjen	Mantar Ekstraktı				
			<i>Cladosporium</i>	Ch	Ch1	Ch2	Ch3	Ch4
1	Neg Neg	3x3 30x35	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg
2	Neg Neg	4x4 25x30	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg
3	Neg Neg	5x5 45x45	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg
4	Neg Neg	5x5 30x30	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg
5	Neg Neg	5x5 40x40	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg
6	Neg Neg	3x3 15x15	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg
7	Neg Neg	5x5 30x30	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg
8	Neg Neg	5x5 20x20	3x3 12x17	2x2 3x3	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg
9	Neg Neg	4x4 20x18	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg
10	Neg Neg	4x4 20x20	2x2 7x10	2x2 3x3	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg
11	Neg Neg	4x4 20x20	3x3 20x22	2x2 5x5	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg
12	Neg Neg	3x3 10x15	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg
13	Neg Neg	3x3 20x20	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg
14	Neg Neg	4x4 20x20	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg
15	Neg Neg	5x5 22x30	3x3 12x17	2x2 8x8	2x2 3x3	2x2 Neg	Neg Neg	Neg Neg
16	Neg Neg	5x5 20x30	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg
17	Neg Neg	5x5 25x30	2x2 11x15	2x2 5x5	2x2 Neg	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg
18	Neg Neg	3x3 20x20	2x2 10x10	2x2 4x4	2x2 Neg	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg
19	Neg Neg	4x4 20x20	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg
20	Neg Neg	2x2 4x4	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg

Çizelge 4.7 Devamı

Hasta No	SF	His	Standart Alerjen	Mantar Ekstraktı				
			<i>Cladosporium</i>	Ch	Ch1	Ch2	Ch3	Ch4
21	Neg	5x5	2x2	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
	Neg	30x30	3x3	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
22	Neg	5x5	4x4	2x2	Neg	Neg	Neg	Neg
	Neg	30x30	20x20	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
23	Neg	5x5	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
	Neg	30x30	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
24	Neg	3x3	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
	Neg	30x20	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
25	Neg	3x3	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
	Neg	15x20	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
26	Neg	4x4	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
	Neg	15x18	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
27	Neg	3x3	2x2	2x2	Neg	Neg	Neg	Neg
	Neg	20x20	7x10	3x3	Neg	Neg	Neg	Neg
28	Neg	5x5	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
	Neg	35x35	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
29	Neg	4x4	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
	Neg	20x20	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
30	Neg	4x4	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
	Neg	15x15	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
31	Neg	3x3	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
	Neg	25x25	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
32	Neg	5x5	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
	Neg	25x20	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
33	Neg	3x3	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
	Neg	15x15	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
34	Neg	4x5	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
	Neg	22x25	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
35	Neg	5x5	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
	Neg	25x25	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
36	Neg	5x5	2x2	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
	Neg	32x35	7x7	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
37	Neg	5x5	4x4	2x2	2x2	Neg	Neg	Neg
	Neg	20x20	20x15	7x7	Neg	Neg	Neg	Neg

Çizelge 4.8. *Alternaria alternata* Deri Testi Sonuçları (Kontrol Grubu)

Hasta No	SF	His	Standart Alerjen	Mantar Ekstraktı					
			<i>Alternaria</i>	Aa	Aa1	Aa2	Aa3	Aa4	Aa5
1	Neg Neg	5x5 20x30	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg
2	Neg Neg	3x3 15x25	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg
3	Neg Neg	4x4 20x25	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg
4	Neg Neg	4x4 30x30	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg
5	Neg Neg	2x2 8x10	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg
6	Neg Neg	3x3 15x20	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg
7	Neg Neg	5x5 35x45	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg
8	Neg Neg	4x4 20x20	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg
9	Neg Neg	4x4 20x25	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg
10	Neg Neg	3x3 20x20	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg
11	Neg Neg	5x5 30x35	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg
12	Neg Neg	4x4 25x30	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg
13	Neg Neg	4x4 15x20	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg
14	Neg Neg	5x5 35x40	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg
15	Neg Neg	2x2 10x10	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg
16	Neg Neg	3x3 25x35	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg
17	Neg Neg	4x4 20x20	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg
18	Neg Neg	5x5 30x30	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg
19	Neg Neg	3x3 15x25	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg
20	Neg Neg	4x4 25x25	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg

Çizelge 4.9. *Alternaria alternata* Deri Testi Sonuçları (Hasta Grubu)

Hasta No	SF	His	Standart Alerjen	Mantar Ekstraktı					
			<i>Alternaria</i>	Aa	Aa1	Aa2	Aa3	Aa4	Aa5
1	Neg	3x3	2x2	2x2	Neg	2x2	Neg	Neg	Neg
	Neg	30x35	20x20	10x10	Neg	3x3	Neg	Neg	Neg
2	Neg	4x4	3x3	2x2	2x2	2x2	Neg	Neg	Neg
	Neg	25x30	20x20	12x9	3x3	Neg	Neg	Neg	Neg
3	Neg	5x5	7x7	4x4	3x3	2x2	2x2	Neg	Neg
	Neg	45x45	30x30	16x27	15x15	10x10	Neg	Neg	Neg
4	Neg	5x5	5x5	3x3	2x2	2x2	Neg	Neg	Neg
	Neg	30x30	25x30	17x22	10x10	5x5	Neg	Neg	Neg
5	Neg	5x5	7x6	4x4	2x2	Neg	Neg	Neg	Neg
	Neg	40x40	30x35	20x20	10x5	Neg	Neg	Neg	Neg
6	Neg	3x3	2x2	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
	Neg	15x15	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	2x2	Neg
7	Neg	5x5	3x3	2x2	2x2	2x2	Neg	Neg	Neg
	Neg	30x30	20x20	17x10	5x5	Neg	Neg	Neg	Neg
8	Neg	5x5	6x7	4x4	3x3	2x2	2x2	Neg	Neg
	Neg	20x20	25x20	20x20	7x12	5x5	Neg	Neg	Neg
9	Neg	4x4	4x4	2x2	2x2	2x2	2x2	Neg	Neg
	Neg	20x18	25x25	5x5	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
10	Neg	4x4	3x3	2x2	2x2	2x2	Neg	Neg	Neg
	Neg	20x20	20x20	10x15	5x5	Neg	Neg	Neg	Neg
11	Neg	4x4	5x5	3x3	2x2	2x2	Neg	Neg	Neg
	Neg	20x20	35x35	15x20	3x3	Neg	Neg	Neg	Neg
12	Neg	3x3	2x2	2x2	2x2	Neg	Neg	Neg	Neg
	Neg	10x15	10x10	7x7	3x3	Neg	Neg	Neg	Neg
13	Neg	3x3	3x3	2x2	2x2	2x2	Neg	Neg	Neg
	Neg	20x20	15x15	7x7	3x3	Neg	Neg	Neg	Neg
14	Neg	4x4	3x3	2x2	2x2	2x2	Neg	Neg	Neg
	Neg	20x20	20x20	10x12	7x5	Neg	Neg	Neg	Neg
15	Neg	5x5	5x5	3x3	2x2	2x2	Neg	Neg	Neg
	Neg	22x30	28x25	17x20	5x5	3x3	Neg	Neg	Neg
16	Neg	5x5	5x5	4x4	3x3	2x2	Neg	Neg	Neg
	Neg	20x30	30x30	10x10	5x5	Neg	Neg	Neg	Neg
17	Neg	5x5	4x4	3x3	2x2	2x2	Neg	Neg	Neg
	Neg	25x30	22x20	13x10	3x3	Neg	Neg	Neg	Neg
18	Neg	3x3	4x4	4x4	2x2	2x2	Neg	Neg	Neg
	Neg	20x20	25x25	7x7	4x4	Neg	Neg	Neg	Neg
19	Neg	4x4	3x3	2x2	2x2	Neg	Neg	Neg	Neg
	Neg	20x20	15x15	7x7	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
20	Neg	2x2	2x2	2x2	2x2	Neg	Neg	Neg	Neg
	Neg	4x4	4x4	5x5	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg

Çizelge 4.9 Devamı

Hasta No	SF	His	Standart Alerjen	Mantar Ekstraktı					
			<i>Alternaria</i>	Aa	Aa1	Aa2	Aa3	Aa4	Aa5
21	Neg Neg	5x5 30x30	10x8 30x30	5x5 20x20	2x2 5x5	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg
22	Neg Neg	5x5 30x30	3x3 25x25	4x4 20x25	3x3 10x10	3x3 10x5	2x2 Neg	2x2 Neg	Neg Neg
23	Neg Neg	5x5 30x30	5x5 25x20	3x3 20x20	2x2 Neg	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg
24	Neg Neg	3x3 30x20	8x3 35x35	2x2 7x7	2x2 3x3	2x2 Neg	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg
25	Neg Neg	3x3 15x20	3x3 20x20	2x2 7x10	2x2 Neg	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg
26	Neg Neg	4x4 15x18	4x3 12x15	2x2 10x10	2x2 Neg	2x2 Neg	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg
27	Neg Neg	3x3 20x20	3x3 20x20	2x2 10x10	2x2 Neg	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg
28	Neg Neg	5x5 35x35	7x7 30x30	3x3 12x10	2x2 Neg	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg
29	Neg Neg	4x4 20x20	8x4 30x20	5x5 20x17	3x3 10x10	2x2 Neg	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg
30	Neg Neg	4x4 15x15	4x4 20x20	3x3 15x20	2x2 10x10	2x2 4x4	2x2 Neg	Neg Neg	Neg Neg
31	Neg Neg	3x3 25x25	3x3 22x25	Neg 2x2	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg
32	Neg Neg	5x5 25x20	2x2 3x3	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg
33	Neg Neg	3x3 15x15	3x3 15x10	2x2 10x12	2x2 5x5	2x2 Neg	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg
34	Neg Neg	4x5 22x25	3x3 15x15	2x2 15x10	2x2 5x5	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg
35	Neg Neg	5x5 25x25	6x6 40x40	5x5 20x25	2x2 15x5	2x2 5x5	2x2 Neg	Neg Neg	Neg Neg
36	Neg Neg	5x5 32x35	3x3 20x20	2x2 10x10	2x2 3x3	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg	Neg Neg
37	Neg Neg	5x5 20x20	15x7 35x35	5x5 20x12	3x3 10x10	2x2 5x5	2x2 Neg	Neg Neg	Neg Neg

Bu sonuçlara göre standart alerjenler ile pozitif sonuç veren hastaların;

- Ø %50'si C.c ile,
- Ø %81'i C.h ile,
- Ø %94'ü A.a ile pozitif sonuç vermiştir.

Bunlar içerisinde fraksiyonların oranına baktığımızda;

- Ø C.c ile pozitif sonuç veren hastaların; %60'ı C.c1'e, %20'si C.c2'ye, %20'si C.c3'e karşı pozitif sonuç vermiştir.
- Ø C.h ile pozitif sonuç veren hastaların; %44'ü C.h1'e, %11'i C.h2'ye karşı pozitif sonuç vermiştir.
- Ø A.a ile pozitif sonuç veren hastaların; %94'ü A.a1'e, %65'i A.a2'ye, %20'si A.a3'e, %5'i A.a4'e karşı pozitif sonuç vermiştir.

Chatterjee ve ark (2006), balık duyarlılığı ile yaptıkları çalışmada Kolkata Alerji ve Astım Araştırma Kliniği'nde uzman bir klinik teknisyen ile kliniğin direktörü Dr. Arijit'in öncülüğünde, 4 balık türünün (pomfret, hilsa, bhetki ve mackerel) çiğ, haşlanmış ve kızartılmış ekstraktı ile deri delme testi uygulamışlardır. Ekstraktı PBS-Gliserol (1:20 w/v) içerisinde hazırlamış ve 0,22 µm millipore filtre ile steril etmişlerdir. Enjektör iğnesi ile ekstraktan bir damla (10 µl) ön kola damlatarak deriyi çizmişlerdir. Deri reaksiyonunu 20 dk sonra ölçmüş ve çapı 3 mm ve üzerinde olan kızarıklık pozitif olarak değerlendirmişlerdir. Negatif kontrol olarak içerisinde %50 gliserol bulunan PBS, pozitif kontrol olarak histamin (1 mg/mL) kullanmışlardır. 161 hastanın 110'unun (%68,32) 1 veya daha fazla balık ekstraktına pozitif sonuç verdiğini gözlemlemişlerdir. Bunların 92'sinin (%83,63) 4 balık ekstraktına da pozitif sonuç verdiğini saptamışlardır. Bu 92 hasta içerisinde 50 tanesine çiğ balıklar ile deri testi uygulamışlar ve 50'sinde de pozitif sonuç almışlardır. 50 hasta içerisinde 12

tanesine haşlanmış ve kızartılmış balıklar ile test gerçekleştirmişler ve 12'sinin de pozitif sonuç verdiğini görmüşlerdir.

Hidir ve ark (2008), 56 yaygın aeroalerjen kullanarak deri delme testi gerçekleştirmişlerdir. Bu amaçla kolun yan kısmına 0,2 mL standart alerjen solüsyonlarından (*Candida albicans*, *Alternaria alternata*, *Cladosporium herbarum*, *Penicillium notatum*, *Aspergillus fumigatus*) intradermal olarak uygulanmıştır. Reaksiyon sonuçları 15 dk sonra değerlendirilmiştir. Pozitif kontrol histamin pozitif ve negatif kontrol serum fizyolojik negatif ise; kızarıklık ve kabarıklık çapı 3 mm nin üzerinde olan sonuçlar pozitif olarak değerlendirilmiştir.

Rasool ve ark (2013), yaşları 6-65 arasında değişen, 248'i ürtiker, 108'i alerjik rinit, 44'ü astım hastası olmak üzere toplam 400 hasta ile yaptıkları çalışmada, deri delme testi sonucunda astım hastalarının 1 tanesinde ve alerjik rinitli hastaların 1 tanesinde küf alerjisini pozitif bulmuşlar, ürtikerli hastalarda küf alerjisi saptamamışlardır.

Mishra ve ark (2016), hastalara bir pozitif kontrol (gliserol: histamin asit fosfat [1: 100]) ve bir negatif kontrol (gliserol tamponu) ile birlikte altmış iki alerjen uygulamışlardır. İki alerjen arasında yaklaşık 2 cm'lik bir mesafe tutarak sol ön kola 32 alerjen (üç sıra halinde), aynı şekilde sağ ön kola 32 alerjen uygulamışlardır. Bir damla alerjeni (konsantrasyon 1:10) ön kol yüzeyine koyarak 26-ölçerli bir hipodermik iğneyi, intradermal olarak 0,5 mm kadar geçirip alerjeni deriye uygulamışlardır. Bir kabarıklık olarak ortaya çıkan deri reaksiyonunu, 15 dakika sonra ölçmüş ve cilt reaksiyonu 2+ ve üstü olanları güçlü pozitif olarak kabul etmişlerdir.

Kespohl ve ark (2016), farklı firmaların üretmiş olduğu alerjenler ile 168 hastaya deri delme testi uygulamışlardır. *Cladosporium herbarum* (Allergopharma, ALK-Abello, Lofarma) ve *Alternaria alternata* (Allergopharma ALK-Abello, HAL, Lofarma) sonuçlarına bakıldığında; sol kola uygulanan test sonuçlarına göre Allergopharma *Cladosporium herbarum* için 4 pozitif, *Alternaria alternata* için 1 pozitif, ALK-Abello *Cladosporium herbarum* için 3 pozitif, *Alternaria alternata*

için 3 pozitif; Lofarma *Cladosporium herbarum* için 2 pozitif, *Alternaria alternata* için 2 pozitif; HAL *Alternaria alternata* için 2 pozitif sonuç elde etmişlerdir.

Topal ve ark (2017), deri delme testi sonuçlarının testi uygulayan kişiye ve kullanılan alete (lanset/iğne) göre farklılıklar gösterebileceğini belirtmişlerdir.

Erel ve ark (2017), 4223 alerjik rinit ve bronşiyal astımlı hasta ile gerçekleştirdikleri çalışmada, 302 hastaya uyguladıkları *Alternaria tenuis* deri testi ile 6 hastada pozitif sonuç almışlardır. Bu sonuca göre hastaların %1,9'unda pozitif sonuç almışlardır. *Cladosporium herbarum* antijenini ise 224 hastaya uygulamış ve bunların 7'sinin pozitif olduğunu saptamışlardır. Bu sonuca göre de hastaların %3,1'inin pozitif olduğunu bildirmişlerdir.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Hava kirliliği ve kötü hava koşulları dünyamızdaki önemli bir problemdir.

Özellikle mesleki akciğer hastalıkları (*havadaki kirleticilerle ilişkili mesleğe spesifik*) ve solunum sistemi kanserleri (*radona maruziyet, dış ortam kirleticileri ve sigara dumanına maruziyet*) kötü hava koşulları ile ilişkili solunum yolu hastalıklarıdır. Bununla birlikte dış ortam kirleticilerine maruz kalma diğer sağlık sorunlarına da neden olmaktadır. Kötü hava koşulları/havadaki kirleticilerin yoğunluğu astımlı hastalarda astım atak şiddetlenmesine (akut/kronik solunum yolu hastalığı) veya KOAH hastalarının hastaneye yatış sebebi olabilmektedir. Alerjik bireyler hava kirleticilerinin etkisine karşı özellikle hassastırlar (Adkinson ve ark, 2009).

Karbonmonoksit, kurşun, kükürt dioksit, azot oksitleri, ozon, partiküler madde ve biyolojik ajanlar da dahil olmak üzere iç ve dış mekanlarda çeşitli hava kirleticileri bulunmaktadır. Biyolojik ajanlar içerisinde özellikle alerjiye neden olan küfler ve polenler hafif/şiddetli alerjik reaksiyonlara neden olan önemli ajanlardır.

İnsanlar aktivitelerinin yaklaşık %90'ını kapalı mekanlarda gerçekleştirdikleri için iç ortam hava kalitesi de en az dış ortam hava kalitesi kadar önem arz etmektedir. Dış ortam havasındaki kirleticilerin bir çoğu, hava akışıyla iç ortamlara taşınmaktadır. Özellikle iç ortam ve dış ortam küf çeşitliliği ve bazen konsantrasyonu korelasyon göstermektedir. Yapılan bilimsel araştırmalar, küflerin özellikle iç ortamlarda (*in door*) önemli alerji kaynağı olduğunu göstermektedir. (Akdağ, 2010; Asan ve ark, 2010; Żukiewicz-Sobczak ve ark, 2013).

Küf sporları, genellikle fazla ciddiye alınmasa da, alerjik duyarlılığın ve akut solunum yetmezliği gibi mevsimsel alerjik semptomların önemli bir nedenidir. Dolayısıyla, küf konsantrasyonlarının bilinmesi, alerjilerin klinik tedavisinde oldukça önemlidir (Sindt ve ark, 2016).

Küfler, farklı alerjik hastalıkların etiyolojik ajanlarını belirlemek için önemlidir, fakat saptanması zordur. Bu nedenle, küflerle alakalı yaygın alerjik

semptomlar ile ilişkisi olduğundan şüphelenilen hastalar için, hastalığı önceden önlemek oldukça önemlidir (Żukiewicz-Sobczak ve ark, 2013).

Günümüzde hala mantar sporlarının üretimi, dağılımı ve alerjen içeriğindeki değişiklikler hakkında bölgeye ve türe özgü olabilecek bilinmezlikler mevcuttur. Halk sağlığı açısından etkisi olabilecek bazı polen türlerinin artan veya azalan seviyelerinin araştırılması için daha uzun aerobiyojik izleme dönemleri ve mantar verilerini kaydeden daha fazla bölgeye ihtiyaç duyulmaktadır (Sindt ve ark, 2016).

Diğer yaygın çevresel alerjik kaynaklarla karşılaştırıldığında, mantarlar ikinci plana atılmıştır. *A. alternata* alerjileri artmaya devam ettikçe, özellikle astımda bu mantar türü ve alerjik bileşenlerinin rolü üzerine araştırma yapmayı düşünmek son derece mantıklıdır. *A. alternata* maruziyeti ve alerjik semptomlarla ilişkilendirilmesi hala bir sorun olmaya devam etmektedir. *A. alternata* ve alerjenlerine maruz kalma eğilimlerini doğru bir şekilde değerlendirmek ve sağlığa potansiyel etkilerini belirlemek için hem epidemiyolojik hem de moleküler araçlar kullanarak yapılacak çok disiplinli bir yaklaşımı benimsemek oldukça önemlidir (Gabriel ve ark, 2016).

Kespohl ve ark (2016), 168 hastadan 166'sında saptanan solunum ile ilgili belirtilerin yüksek ihtimalle küf kaynaklı olduğunu bildirmişler, fakat alerjik belirtilerin sebebinin tek bir küf cinsinden mi yoksa genel olarak küflere maruz kalmaktan mı kaynaklandığının belli olmadığını ifade etmişlerdir.

Adana atmosferinin küf izlem çalışmalarından elde edilen verilere göre (Özmay, 2007; Gelişken, 2008; Akdağ, 2010) Adana atmosferinde en baskın cins *Cladosporium*'dur. *Alternaria* baskın tür olmamakla birlikte, spor boyutu büyük olduğundan en alerjik küf cinslerindendir. Bu sonuçlardan yola çıkılarak, Adana atmosferinden izole edilmiş ve tanımlanmış; *Cladosporium cladosporioides*, *Cladosporium herbarum*, *Alternaria alternata* 3 küf saf olarak üretilerek total ekstraksiyonlar hazırlanmıştır. Total ekstraksiyonlar Sephadex G-100 kolonundan geçirilerek kısmi saflaştırma işlemine tabi tutularak 5'er mL'lik 13 fraksiyon hazırlanmıştır.

Hem fraksiyonlar hem de ana örneklerle birlikte toplam 16 örneğin protein miktarı tayini yapılmıştır.

Örneklerin protein miktarları;

Cladosporium cladosporioides için; 0,84 mg/mL

Cladosporium herbarum için; 1,826 mg/mL

Alternaria alternata için; 2,883 mg/mL olarak hesaplanmıştır.

Fraksiyonların protein miktarları;

Cladosporium cladosporioides fraksiyonları:

C.c1: 257 µg/mL, C.c2: 130 µg/mL, C.c3: 69,2 µg/mL, C.c4: 43,2 µg/mL

Cladosporium herbarum fraksiyonları:

C.h1: 563,6 µg/mL, C.h2: 464,8 µg/mL, C.h3: 470 µg/mL, C.h4: 508,2 µg/mL

Alternaria alternata fraksiyonları:

A.a1: 723,8 µg/mL, A.a2: 716,8 µg/mL, A.a3: 472,6 µg/mL, A.a4: 500 µg/mL, A.a5: 507,2 µg/mL olarak hesaplanmıştır.

Klinikte kullanılan standart alerjenlerin (Allergopharma) protein miktarı tayini yapılmış ve sonuçlar;

Ø *Cladosporium herbarum* için: 3,3 µg/mL

Ø *Alternaria alternata* için: 46,7 µg/mL olarak hesaplanmıştır.

Akdağ (2010), ürettiği total hücre ekstraktlarının ve standart alerjenlerin protein miktarını Lowry metoduyla saptamıştır. Standart alerjenlerin sonuçlarını; Mix 1: 29,1 mg/mL, Mix 2: 35,9 mg/mL, *Alternaria*: 20,6 mg/mL, *Cladosporium*: 15,2 mg/mL olarak saptamıştır. Protein ekstraktları sonuçlarını ise; *Cladosporium herbarum*: 1,57 mg/mL, *Cladosporium oxysporum*: 2,60 mg/mL, *Alternaria tenuissima*: 2,44 mg/mL, *Alternaria pluriseptata*: 1,96 mg/mL, *Alternaria alternata*: 2,46 mg/mL, 5 suşun karışımı (mix): 3,01 mg/mL olarak saptamıştır.

Tüm örnekler için SDS-PAGE analizi yapılmış ve *Cladosporium cladosporioides*'e ait 147-10 kDa aralığında 11 bant, *Cladosporium herbarum*'a ait 156-17 kDa aralığında 8 bant, *Alternaria alternata*'ya ait 123-14 kDa aralığında 10 bant elde edilmiştir.

Bush ve ark (2004), saflaştırılmış *Alternaria* alerjenlerinin moleküler ağırlıklarını; Alt a 1 için 29-31 kDa, Alt a 2 için 24 kDa, Alt a 3 için 20 kDa, Alt a 4 için 57 kDa, Alt a 6 için 11 kDa, Alt a 7 için 22 kDa, Alt a 10 için 53 kDa, Alt a 11 için 46-48 kDa, Alt a 12 için 12 kDa, GP70 için 70 kDa olarak saptamışlardır.

Fukutomi ve ark (2015), *Alternaria*'nın 12 alerjen proteininin moleküler ağırlıklarını 58-15,3 kDa, *Cladosporium*'un 10 alerjeni için ise 53-11 kDa olarak vermişlerdir.

Örneklerin içerisine koruyucu olarak fenol-gliserol (98:2) karışımı ilave edilmiş ve deri delme testinde kullanılmak üzere kliniğe gönderilmeden önce Kanlı Agar'da sterilit kontrolü yapılmıştır.

Gliserin ve sükröz gibi yüksek konsantrasyonda şeker ile stabilitenin desteklenmesinin sebebi büyük olasılıkla alerjen proteinlerin denatüre olmasını ve aktif IgE bağlantı noktalarındaki modifikasyona sebep olan enzimatik aktiviteyi engellemesidir (Plunkett, 2008).

Üretilen test materyalleri Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk İmmünoloji ve Alerji Hastalıkları Bilim Dalı Kliniğinde 37 hastaya uygulanmıştır. *Cladosporium cladosporioides* için 5 hastada hem standart hem de üretilen test materyali ile test sonucu pozitif, 5 hastada test materyali ile negatif, *Cladosporium herbarum* için 9 hastada hem standart hem de üretilen test materyali ile test sonucu pozitif, 2 hastada test materyali ile negatif, *Alternaria alternata* için 35 hastada hem standart hem de üretilen test materyali ile test sonucu pozitif, 2 hastada test materyali ile negatif sonuçlar alınmıştır. Fraksiyonlarda ise *Cladosporium* örneklerinde genellikle negatif, *Alternaria*'da ise daha çok ilk iki fraksiyonda pozitif sonuçlar saptanmıştır.

Avrupa ülkelerinde *Alternaria alternata* duyarlılığı %3-30 arasında

değişmektedir. Bu oran İtalya'da solunum yolu rahatsızlığı yaşayan hastaların %2-29'unda görülmektedir. Portekiz'de hastaların %11,2'si pozitif deri testi sonucu verirken İspanya'da bu mantara karşı %20 pozitif deri testi sonucu görülmüştür. Türkiye'de *Alternaria alternata*'ya karşı duyarlılık insidansı %11,9'dur. İskandinav ülkelerinde yapılan bir çalışmada %4 pozitif deri testi sonucu görülmüştür. Birleşmiş Milletler'de *Alternaria alternata* hassasiyeti 12-17 yaş aralığındaki çocuklarda %3 iken 18-24 yaş aralığındaki gençlerde %7,5 civarındadır.

Sonuçlardaki bu farklılıkların sebebinin; küf alerjen ekstraktlarının standardizasyonundaki veya deri testi tekniklerindeki farklılık, çalışma dizaynı ve teşhis kriterlerindeki farklılık ya da çevresel faktörler ve şartlardaki farklılıktan dolayı olduğu söylenebilir. İşte bu da her ülkede hatta aynı ülkedeki farklı bölgelerde epidemiyolojik çalışmalar yapılmasına ne kadar ihtiyaç duyulduğunu göstermektedir (Katotomichelakis ve ark, 2012).

Bulgulara göre üretilen test materyallerinin klinikte teşhis amaçlı kullanılabileceği önerilebilir.

Çalışmanın sonuçlarına bakıldığı zaman, üretilen test materyallerinin protein miktarı literatürde saptanan ve bizim tespit ettiğimiz standart alerjenlerin protein miktarından daha fazla olmasına rağmen deri testi sonuçlarında daha düşük oranlarda pozitif reaksiyon görülmüştür. Bunun sebebi muhtemelen solüsyon içerisinde alerjen proteinler dışında diğer proteinlerin de var olmasıdır.

Standart alerjenlerin içeriği bilinmemektedir. Dolayısıyla kendi ürettiğimiz alerjenlerle birebir kıyaslamak doğru değildir. Her ne kadar standartlardan düşük kalsa da, üretilen alerjenler ve fraksiyonları ile mantar alerjisi olan hastalarda pozitif sonuçlar alınmıştır.

Satışa sunulmuş alerjenlerin standardizasyonu bilinmediğinden, bu çalışmadan sonraki basamak, test materyallerinin konsantrasyonunu arttırarak, ülkemizde bölgesel hava kaynaklı küfler, gıdalar ve diğer alerjenlerden test materyali üreterek klinik kullanıma sunmak olacaktır.



KAYNAKLAR

- Adhikari, A., Reponen, T., Grinshpun, S.A., Martuzevicius, D., Lemasters, G., 2006. Correlation of Ambient Inhalable Bioaerosols With Particulate Matter and Ozon: A Two-Year Study. *Environ Pollut*, 140:16-28.
- Adkinson Jr, N.F., Bochner, B.S., Busse, W.W., Holgate, S.T., Lemanske Jr, R.F., Simons, F.E.R., 2009. *Aerobiology of Outdoor Allergens*. Middleton's Allergy: Principles&Practice, 7th Edition, Mosby, China, s.509-537.
- Akdağ, P., 2010. Adana'da *Cladosporium* ve *Alternaria* Spor Konsantrasyonlarının Saptanması ve Deri Testinde Kullanılacak Mantar Ekstraktlarının Hazırlanması. Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi.
- Al-Suwaini, A.S., Bahkali, A.H., Hasnain, S.M., 2001. Airborne Viable Fungi in Riyadh and Allergic Response of Their Extracts. *Mycoses*, 44:401-406.
- Alexopoulos, C J., and Mims, C.W., 1979. *Intro-Ductory Mycology*. John Wiley and Sons, Newyork, 632s.
- Anonymous., 1978. *Mikrobiyologisches Handbuch*, E. Merck, Darmstadt.
- Aringoli, E.E., Basilico, M.L.Z., Altahus, R.F., Basilico, J.C., 2008. Multivariate Analysis of Fungal Associations in The Indoor Air of Argentinean Houses. *Internation Biodeter & Biodegad*, 62:281-286.
- Asan, A., Ökten, S.S., Sen B., 2010. Airborne and Soilborne Microfungi in the Vicinity Hamitabat Thermic Power Plant In Kırklareli City (Turkey), Their Seasonal Distributions And Relations With Climatological Factors. *Environ Monit Assess*, 164:221-231.
- Assis, S.A., Martins, A.B.G., Faria Oliveira, O.M.M., 2007. Purification and Characterization of Pectin Methylesterase from Acerola (*Malpighia glabra* L.). *Journal of the Science of Food and Agriculture J Sci Food Agric*, 87:1845-1849.

- Bavbek, S., Erkeköl, F.Ö., Çeter, T., Mungan, D., Özer, F., Pınar, N.M, Mısırlıgil, Z., 2006. Sensitization to *Alternaria* and *Cladosporium* in Patients With Respiratory Allergy and Outdoor Counts of Mold Spores in Ankara Atmosphere. Turkey Journal of Asthma, 43(6):421-6.
- Bensch, K., Groenewald, J.Z., Braun, U., Dijksterhuis, J., Yanez-Morales, M.J., Crous, P.W., 2015. Common but different: The expanding realm of *Cladosporium*. Studies in Mycology, 82:23-74.
- Bhattacharjee, K., Sarma, G.C., Kalita, S., 2012. Aero Mycological Study in a Bus Terminus in Guwahati City, Assam. Asian J Exp Biol Sci, 3(2):311-319.
- Bollag, D.M., Rozycki, M.D., Edelstein, S.J., 1996. Protein Methods, 2nd Edition, Wiley-Liss Press, USA, 414s.
- Bollag, D.M., Edelstein S.J., 1991. Proteins Methods. Wiley-Liss Press, USA, 180s.
- Bonetta, SA, Bonetta, SI, Mosso, S, Sampo, S, Carraro, E., 2010. Assessment of microbiological indoor air quality in an Italian office building equipped with an HVAC system. Environ Monit Assess, 161(1):473-483.
- Boyacıoğlu, H., Haliki, A., Ateş, M., Güvensen, A., Abacı, Ö., 2007. The Statistical Investigation on Airborne Fungi and Pollen Gains of Atmosphere in İzmir-Turkey. Environ Monitor Assess, 135:324-334.
- Bozek, A., and Pyrkosz, K., 2017. Immunotherapy of Mold Allergy: A review, Human Vaccines&Immunotherapeutics. Human&Immunotherapeutics, 0:1-5.
- Breitenbach, M., Simon-Nobbe, B., 2002. The Allergens of *Cladosporium herbarum* and *Alternaria alternata*. Chem Immunol, 81:48-72.
- Bush, R.K., and Prochnau, J.J., 2004. *Alternaria*-Induced Asthma. J Allergy Clin Immunol, 113:227-34.
- Campbell, N.A., and Reece, J.B., 2010. Mantarlar (E. Gündüz, A. Demirsoy, İ. Türkan, editör). Biyoloji, 6. Baskı, Özkan Matbaacılık, Ankara, s.616-632.

- Chatterjee, U., Mondal, G., Chakraborti P., Patra, H.K., Chatterjee, B.P., 2006. Changes in the Allergenicity During Different Preparations of Pomfret, Hilsa, Bhetki and Mackerel Fish as Illustrated by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and Immunoblotting. *Int Arch Allergy Immunol*, 141:1-10.
- Codina, R., Fox, R. W., Lockey, R. F., Demarco, P., Bagg, A., 2008. Typical Levels of Airborne Fungal Spores in Houses Without Obvious Moisture Problems During A Rainy Season in Florida, USA. *J Invest Allergol Clin Immunol*, 18:156-162.
- Cramer, R., 2015. Structural Aspects of Fungal Allergens. *Semin Immunopathol*, 37:117-121.
- Çeter, T. 2008. Kastamonu İli (Merkez) Atmosferi Polen ve Sporları ve Bunların Meteorolojik Faktörlerle Değişimi Ocak 2006-Aralık 2007. Doktora Tezi. Ankara Üniversitesi, Ankara, 279s.
- Çeter, T., Pınar, N.M., 2009. 2003 Yılında Ankara Atmosferi Mantar Sporları Konsantrasyonu ve Meteorolojik Faktörlerin Etkisi. *Mikrobiyol Bült*, 43:627-638.
- Çetinkaya, Z., Fidan, F., Ünlü, M., Hasenekoğlu, İ., Tetik, L., Demirel, R., 2005. Afyon Atmosferinde Alerjen Fungus Sporları. *Akciğer Arşivi*, 6:140-4.
- Dallongeville, A., Cann, P.L., Zmirou-Navier, D., Chevrier, C., Costet, N., Annesi-Maesano, I., Blanchard, O., 2015. Concentration and Determinants of Molds and Allergens in Indoor Air and House Dust of French Dwellings. *Science of the Total Environment*, 536:964-972.
- Dang, H., Pryor, B., Peever, T., Lawrence, C.B., 2015. The *Alternaria* Genomes Database: A Comprehensive Resource for a Fungal Genus Comprised of Saprophytes, Plant Pathogens, and Allergenic Species. *BMC Genomics*, 16:239.
- Dickerson, P.J.K., and Li, J., 1998. Effects of Damp and Mould in The Home on Respiratory Health: A Review of The Literature. *Allergy*, 53(2):120-8.

- Docampo, S., Trigo, M.M., Recio, M., Melgar, M., Garcia-Sanchez, J., Calderon-Ezquerro, M.C., Cabezudo, B., 2010. High Incidence of *Aspergillus* and *Penicillium* Spores in The Atmosphere of The Cave of Nerja, (Malaga, Southern Spain). *Aerobiologia*, 26:89-98.
- Dreborg, S., 2015. Allergen Skin Prick Test Should Be Adjusted by The Histamine Reactivity. *Int Arch Allergy Immunol*, 166:77-80.
- Edmondson, D.A., Nordness, M.E., Zacharisen, M.C., Kurup, V.P., Fink, J.N., 2005. Allergy and Toxic Mold Syndrome. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 9:234-239.
- Ellis, M.B., 1971. *Dematiaceous hyphomycetes*. The Eastern Pres Ltd., London and Reading. Common Wealth Mycological Institute Kew, Surrey, UK, 608s.
- Ellis, M.B., and Ellis, J.P., 1997. Microfungi on land plants. An Identification handbook. Enlarged Ed. The Richmond Publishing Co. Ltd. Slough, UK, 868s.
- Erel, F., Sarioglu, N., Kose, M., Kaymakci, M., Gokcen, M., Kepekci, A.H., Arslan, M., 2017. Intradermal Skin Testing in Allergic Rhinitis and Asthma with Negative Skin Prick Tests. *Iran J Allergy Asthma Immunol*, 16(3):193-197.
- Ergün, Z., 2015. *Etlik Vet Mikrobiyol Derg*, 26(1):35-40.
- Esch, R.E., 2004. Manufacturing and Standardizing Fungal Allergen Products. *J. Allergy Clin Immunol*, 113:210–215.
- Fang, Z.G., Ouyang, Z.Y., Hu, L.F., Wang, X.K., Lin, X.Q., 2005. Community Structure and Ecological Distribution Of Airborne Microbes in Summer in Beijing. *Acta Ecolo Sin*, 25:83-88.
- Fukutomi, Y., and Taniguchi, M., 2015. Sensitization to Fungal Allergens: Resolved and Unresolved Issues. *Allergology International* 64:321-331.
- Gabriel, M.F., Postigo, I., Tomaz, C.T., Martínez, J., 2016. *Alternaria alternata* Allergens: Markers of Exposure, Phylogeny and Risk of Fungi-Induced Respiratory Allergy. *Environment International*, 89-90:71-80.

- Galante, D., Hartung De Capriles, C., Mata-Essayag, S., Conesa, A., Cordova, Y., Trejo, E., Tassinari, P., 2006. Respiratory Allergies in Venezuela: Are Fungi Responsible? *Mycoses*, 49:493-498.
- Gallagher S. R., and Wiley E. A., 2008. Current Protocols in Essential Laboratory Techniques. Unit. 2.2: Quantification of Nucleic Acids and Proteins, 2.2.1-2.2.29.
- Gelişken R., 2008. Adana'daki Ev İçi Mantarlardan Protein Ekstraktlarının Hazırlanması ve Alerjik Taramada Yararlanılan Deri Testinde Kullanılabilirliği. Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi.
- Giorgio C., Krempff A., Guiraud H., Binder P., Tired C., Dumenil G., 1996. Atmospheric Pollution by Airborne Microorganisms in the City of Marseilles. *Atmospheric Environment*, 30:155-160.
- Gofron, G.A., Strzelczak, A., Wolski, T., 2011. The Relationship Between Air Pollutants, Meteorological Parameters and Concentration of Airborne Fungal Spores. *Environmental Pollution*, 159:602-608.
- Gofron, A.G., Strzelczak, A., Stepalska, D., Myszkowska, D., 2016. A 10-Year Study of *Alternaria* and *Cladosporium* in Two Polish Cities (Szczecin and Cracow) and Relationship With The Meteorological Parameters. *Aerobiologia*, 32:83-94.
- Graham, L.E., Graham, J.M., Wilcox, L.W., 2008. Bitki Biyolojisi. Palme Yayıncılık, 608s.
- Haleem Khan, A.A., Mohan, S., Manoharachary, C., Kunwar, I.K., Waghay, S., 2009. Isolation, Identification and Testing for Allergenicity of Fungi from Air-Conditioned Indoor Environments. *Aerobiologia*, 25:119-123.
- Hidir, Y., Tosun, F., Saracli, M.A., Gunal, A., Gulec, M., Sertac Yetiser, S., 2008. Rate of Allergic Fungal Etiology of Chronic Rhinosinusitis in Turkish Population. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 265:415-419.

- Hoo, S.J., Park, J.W., Lee, B.H., 2001. Characterization of Human IgE and Mouse IgG1 Responses to Allergens in Three Mosquito Species by Immunoblotting and ELISA. *Int Arch Allergy Immunol*, 126:206-212.
- İnal, A., Altıntaş, D.U., Güvenmez, H.K., Yılmaz, M., Kendirli S.G., 2006. Life-Threatening Facial Edema Due to Pine Caterpillar Mimicking an Allergic Event. *Allergol et Immunopathol*, 34(4):171-3.
- İnal, A., Karakoç, G.B., Altıntaş, D.U., Pınar, M., Çeter, T., Yılmaz, M., Kendirli, S.G. 2008. Effect of Outdoor Fungus Concentrations On Symptom Severity of Children With Asthma and/or Rhinitis Monosensitized to Molds. *Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology*, 26(1):11-7.
- Jacqueline, A.P., O'Connor, P.T., Muilenberg, M.L., Vaughn, B., Gold, D.R., Kattan, M., Morgan, W.J., Gruchalla, R.S., Smartt, E., Mitchell, E.H., 2010. Differential Effects of Outdoor Versus Indoor Fungal Spores on Asthma Morbidity in Inner-City Children. *J Allergy Clin Immunol*, 125:593-9.
- Jones, A.M., and Harrison, R.M., 2004. The Effects of Meteorological Factors on Atmospheric Bioaerosol Concentrations-A Review. *Sci Total Environ* 326:151-180.
- Jong, N.W., Steen, J.J.M., Smeekens, C.C., Blacquièrè, T., Mulder, P.G.H., Wijk, R.G., Groot, H., 2006. Honeybee Interference as a Novel Aid to Reduce Pollen Exposure and Nasal Symptoms among Greenhouse Workers Allergic to Sweet Bell Pepper (*Capsicum annuum*) Pollen. *Int Arch Allergy Immunol*, 141:390-395.
- Kalyoncu, F., 2010. Relationship Between Airborne Fungal Allergens and Meteorological Factors in Manisa City, Turkey. *Environ Monit Assess*, 165:553-558.
- Kasprzyk I., 2008. Main Research Fields of Interest During The Last 25 Years. *Ann Agricult Environ Med*, 15:1-7.

- Kasprzyk, I., Rodinkova, V., Šaulienė, I., Ritenberga, O., Grinn-Gofron, A., Nowak, M., Sulborska, A., Kaczmarek, J., Weryszko-Chmielewska, E., Bilous, E., Jedryczka, M., 2015. Air Pollution by Allergenic Spores of The Genus *Alternaria* in The Air of Central and Eastern Europe. *Environ Sci Pollut Res*, 22:9260-9274.
- Katotomichelakis, M., Anastassakis, K., Gouveris, H., Tripsianis, G., Paraskakis, E., Maroudias, N., Danielides, V., 2012. Clinical Significance of *Alternaria Alternata* Sensitization in Patients with Allergic Rhinitis. *American Journal of Otolaryngology-Head and Neck Medicine and Surgery* 33:232-238.
- Katotomichelakis, M., Nikolaidis, C., Makris, M., Proimos, E., Aggelides, X., Constantinidis, T.C., Papadakis, C.E, Danielides, V., 2016. *Alternaria* and *Cladosporium* Calendar of Western Thrace: Relationship with Allergic Rhinitis Symptoms. *The Laryngoscope*, 126(2):51-6.
- Kespohl, S., Maryska, S., Bünger, J., Hagemeyer, O., Jakob, T., Joest, M., Knecht, R., Koschel, D., Kotschy-Lang, N., Merget, R., Mülleneisen, N.K., Rabe, U., Röeler, S., Sander, I., Stollewerk, D., Straube, H., Ulmer, H.M., Kampen, V., Walusiak-Skorupa, J., Wiszniewska, M., Wurpts, G., Brüning, T., Raulf, M., 2016. How to Diagnose Mould Allergy? Comparison of Skin Prick Tests With Specific Ige Results. *Clinical & Experimental Allergy*, 46:981-991.
- Kılıç, M., Altıntaş, D.U., Yılmaz, M., Kendirli, S.G., Karakoç, G.B, Taşkın, E., Çeter, T., Pınar, N.M., 2010. The Effects of Meteorological Factors and *Alternaria* Spore Concentrations on Children Sensitised to *Alternaria*. *Allergol Immunopathol*, 38(3):122-128.
- Kim, K.Y., Kim, Y.S., Kim, D., 2010. Distribution Characteristics of Airborne Bacteria and Fungi in The General Hospitals of Korea. *Industrial Health*, 48:236-243.

- Kochar, S., Ahlawat, M., Dahiya, P., Chaudhary, D., 2014. Assessment of Allergenicity to Fungal Allergens of Rohtak City, Haryana, India. *Allergy Rhinol*, 5(2):56-65.
- Kuna, P., Kaczmarek, J., Kupczyk, M., 2011. Efficacy and Safety of Immunotherapy for Allergies to *Alternaria alternata* in Children, *J Allergy Clin Immunol*, 127(2):502-508.
- Kustrzeba-Wójcicka, I., Siwak, E., Terlecki, G., Wolańczyk-Mędrala, A., Mędrala, W., 2014. *Alternaria alternata* and It's Allergens: A Comprehensive Review. *Clinic Rev Allerg Immunol*, 47:354-365.
- Levac, S.A., 2011. Isolation, Purification and Characterization of Proteins From Indoor Strains of *Eurotium amstelodami*, *Eurotium rubrum* and *Eurotium herbariorum* That Are Antigenic to Humans. Carleton University, Department of Chemistry, Master of Science.
- Levetin, E., Horner, W.E., Scott, J.A., 2016. Taxonomy Of Allergenic Fungi. *J Allergy Clin Immunol Pract*, 4:375-85.
- Liang, B., 2005. The Fungi Kingdom: Common Characteristics of Fungi. [Http://www.wisc-online.com](http://www.wisc-online.com) (Erişim Tarihi:05.06.2017).
- Madigan, M.T., and Martinko, J.M., 2010. Mikroorganizmaların Biyolojisi. Özkan Matbaacılık, Ankara, 992s.
- Miao, Z., Chai, T., Qi, C., Cai, Y., Liu, J., Yuan, W., Yao, M., 2009. Composition and Variability of Airborne Fungi in an Enclosed Rabbit House in China. *Aerobiologia*, 26:135-140.
- Mishra, V.D., Mahmood, T., Mishra, J.K., 2016. Identification of Common Allergens for United Airway Disease by Skin Prick Test. *Indian J Allergy Asthma Immunol*, 30:76-9.
- O'Gorman, C.M., Fuller, H.T., 2008. Prevalence of Culturable Airborne Spores of Selected Allergenic and Pathogenic Fungi in Outdoor Air. *Atmospheric Environment*, 42:4355-4368.

- Özmay, Y.A., 2007. Adana'daki Ev Dışı (Outdoor) Fungusların İzolasyonu, İdentifikasyonu, Mevsimsel Dağılımı ve Alerjik Hastalıklarla İlişkilendirilmesi. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi.
- Özyaral, O., Keskin, Y., Başkaya, R., Lüleci, E., Dumrul, G., 2007. Şeker ve Şeker Katkılı Besin Maddelerinde Kserofilik-Kserotoleran Küfler. Türk Mikrobiyol Cem Derg, 37:43-50.
- Pakpour, S., Li, D.W., Klironomos, J., 2015. Relationships of Fungal Spore Concentrations in The Air and Meteorological Factors. Fungal Ecology 13:130-134.
- Palacin, A., Bartra, J., Muñoz, R., Diaz-Perales, A., Valero, A., Salcedo, G., 2010. Anaphylaxis to Wheat Flour-Derived Foodstuffs and the Lipid Transfer Protein Syndrome: A Potential Role of Wheat Lipid Transfer Protein Tri a 14. Int Arch Allergy Immunol, 152:178-183.
- Patiwael, J.A., Vullings, L.G.J., Jong, N.W., Toorenenbergen, A.W., Wijk, G.R., Groot, H., 2010. Occupational Allergy in Strawberry Greenhouse Workers. Int Arch Allergy Immunol, 152:58-65.
- Pavon Moreno, M.A., Gonzalez Alonso, I., Demartin Santos, R., Garcia, L.T., 2012. The Importance of Genus *Alternaria* in Mycotoxins Production and Human Diseases. Nutr Hosp, 27:1772-1781.
- Peden, D., and Reed, E.C., 2010. Environmental And Occupational Allergies. J Allergy Clin Immunol, 125:150-160.
- Plunkett G., 2008. Stability of Allergen Extracts Used in Skin Testing and Immunotherapy. Current Opinion in Otolaryngology & Head and Neck Surgery, 16:285-291.
- Pose, G., Patriarca, A., Kyanko, V., Pardo, A., Fernández Pinto, V., 2009. Effect of Water Activity and Temperature on Growth of *Alternaria alternata* on a Synthetic Tomato Medium. Int J Foodmicrobiol, 135:60-63.

- Pose, G., Patriarca, A., Kyanko, V., Pardo, A., Fernández Pinto, V., 2010. Water Activity and Temperature Effects on Mycotoxin Production by *Alternaria alternata* on A Synthetic Tomato Medium. *Int J Food Microbiol*, 142:348-353.
- Rasool, R., Shera, I.A., Nissar, S., Shah, Z.A., Nayak, N., Siddiqi, M.A, Sameer, A.S., 2013. Study of Allergic Disorders in Kashmiri Population. *Indian Journal of Dermatology*. 58(1):12-17.
- Reddy, M.K., and Srinivas, T., 2017. Mold Allergens in Indoor Play School Environment. *Energy Procedia*, 109:27-33.
- Ren, P., Jankun, T.M., Belanger, K., Bracken, M.B., Leaderer, B.P., 2001. The Relation Between Fungal Propagules in Indoor Air and Home Characteristics. *Allergy*, 56:419-24.
- Reyes, E.S., Cruz, D.R., Merino, E.S., Sánchez, J.S., 2009. Meteorological and Agricultural Effects on Airborne *Alternaria* and *Cladosporium* Spores and Clinical Aspects in Valladolid (Spain). *Ann Agric Environ Med*, 16:53-61.
- Rid, R., Önder, K., Hawranek, T., Laimer, M., Bauer, J.W., Holler, C., Simon-Nobbe, B., Breitenbach, M., 2010. Isolation and Immunological Characterization of a Novel *Cladosporium herbarum* Allergen Structurally Homologous to the A/B Hydrolase Fold Superfamily. *Molecular Immunology*, 47:1366-1377.
- Rida, R., Önder, K., Hawranek, T., Laimer, M., Bauer, J.W., Hollera, C., Simon-Nobbe, B., Breitenbach, M., 2010. Isolation and immunological characterization of a novel *Cladosporium herbarum* allergen structurally homologous to the hydrolase fold superfamily. *Molecular Immunology* 47:1366-1377.
- Rodriguez-Rajo F.J., Iglesias I., Jato V., 2005. Variation Assessment of Airborne *Alternaria* and *Cladosporium* Spores at Different Bioclimatical Conditions. *Mycol Res*, 109(4):497-507.

- Simon-Nobbe, B., Denk, U., Poell, V., Rid, R., Breitenbach, M., 2008. The Spectrum of Fungal Allergy. *Int Arch Allergy Immunol*, 145:58-86.
- Sindt, C., Besancenot, J.P., Thibaudon, M., 2016. Airborne *Cladosporium* Fungal Spores and Climate Change in France. *Aerobiologia*, 32:53-68.
- Skóra, J., Otlewska, A., Gutarowska, B., Leszczyńska, J., Majak, I., Stępień, Ł. 2015. Production of The Allergenic Protein Alt A 1 by *Alternaria* Isolates From Working Environments. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 12(2):2164-2183.
- Song, Y.Y., Zeng, R.S., Xu, J.F., Li, J., Shen, X., Yihdego, W.G., 2010. Interplant Communication of Tomato Plants through Underground Common Mycorrhizal Networks. *Plos One*, 5(10):13324.
- Stepalska, D., and Wolek J., 2009. Intradiurnal Periodicty of Fungal Concentrations (*Alternaria*, *Botrytis*, *Didymella*, *Ganoderma*) in Cracow, Poland. *Aerobiologia*, 25(4):333-340.
- Şen, B., and Asan, A., 2009. Fungal Flora in Indoor and Outdoor Air of Different Residential Houses in Tekirdağ City (Turkey): Seasonal Distribution and Relationship with Climatic Factors. *Environ Monit Assess*, 151:209-219.
- Tamer, Ü., Gücin, F., Solak, M.H., 2008. Fungi Alemine Giriş ve İnsanlar İçin Önemi. *Mikolojiye Giriş*. Nadir Kitapevi, Manisa, 207s.
- Tanrısever, D., 2011. *Bacillus subtilis*'ten Termostabil Lipaz Üretimi ve Karakterizasyonu. Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi.
- Tham, R., Vicendese, D., Dharmage, S.C., Hyndman, R.J., Newbiggin, E., Lewis, E., O'Sullivan, M., Lowe, A.J., Taylor, P., Bardin, P., Tang, M.L.K., Abramson, M.J., Erbas, B., 2017. Associations Between Outdoor Fungal Spores and Childhood and Adolescent Asthma Hospitalizations. *J Allergy Clin Immunol*, 139:1140-7.

- Topal, S.G., Karaman, B.F., Aksungur, V.L., 2017. Variables Affecting Interpretation of Skin Prick Test Results. *Indian J Dermatol Venereol Leprol*, 83:200-4.
- Torpy, F.R., Irga, P.J., Brennan, J., Burchett, M.D., 2013. Do Indoor Plants Contribute to The Aeromycota In City Buildings? *Aerobiologia*, 29(3):321-331.
- Uztan, A.H., Ateş, M., Abacı, Ö., Gülbahar, O., Erdem, N., Çiftçi, Ö., Boyacıoğlu, H., 2010. Determination of Potential Allergenic Fungal Flora and its Clinical Reflection in Suburban Elementary Schools in Izmir. *Environ Monit Assess*, 168:691-702.
- Yükselen, Ü.A., Akdağ, P., Güvenmez, H.K., Çeter, T., Yılmaz, M., Karakoç, G.B., Pınar, N.M., Altıntaş, D.U., 2013. Adana Atmosferindeki Fungal Spor Konsantrasyonlarının Meteorolojik Faktörlerle Değişimi ve Elde Edilen Fungal Ekstrelerin Deri Prik Testinde Kullanımı. *Asthma Allergy Immunol*, 11:103-111.
- Zhang, B., Sun, Z.W., Jiang, D.D., Niu, T.G., 2009. Isolation and Purification of Alkaline Keratinase from *Bacillus* sp. 50-3. *African Journal of Biotechnology*, 8(11):2598-2603.
- Żukiewicz-Sobczak, W., Sobczak, P., Krasowska, E., Zwoliński, J., Chmielewska-Badora, J., Galińska, E.M., 2013. Allergenic Potential of Moulds Isolated from Buildings. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 20(3):500-503.

ÖZGEÇMİŞ

01.01.1987 yılında Adana’da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Adana Özel Çukurova Bilfen Okulları’nda tamamladı. 2004 yılında başladığı Çukurova Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü’nden 2008 yılında mezun oldu ve aynı yıl Biyoteknoloji Anabilim Dalı’nda yüksek lisans eğitimine başladı. 2010 yılında yüksek lisans eğitiminin bir dönemini Erasmus Programı ile İspanya Universitat de Girona’da tamamladı. 2011 yılında yüksek lisans eğitimini tamamlayarak aynı yıl Biyoloji Bölümü’nde doktora eğitimine başladı.



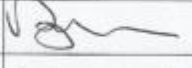
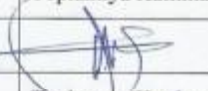
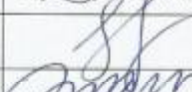
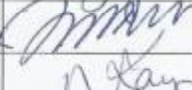
EKLER



**T.C. ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ GİRİŞİMSSEL OLMAYAN
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU**

Toplantı Sayısı		Tarih
36		7 Kasım 2014

KARAR NO 1- Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı'nın bilimsel işbirliğiyle, Prof. Dr. Hatice Korkmaz Güvenmez yönetiminde, Prof. Dr. Derya Ufuk Altıntaş'ın, Prof. Dr. Mustafa Yılmaz'ın katkılarıyla, Deniz Tanrısever tarafından yürütülmesi öngörülen, "Adana Atmosferinden İzole Edilen Küf Mantarlarından Alerjen Üretimi" başlıklı doktora tez projesi araştırma etiği yönünden değerlendirildi. Toplantıya katılan üyelerin oybirliğiyle uygun olduğuna karar verildi.

BAŞKAN	Doç Dr Selim Kadioğlu Tıp Tarihi ve Etik Anabilim Dalı	
ÜYELER	Prof Dr Mülkiye Kasap Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı	Toplantıya Katılmadı
	Prof Dr Dinçer Yıldızdaş Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	
	Prof Dr Mehmet Kanadaş Kardiyoloji Anabilim Dalı	Toplantıya Katılmadı
	Prof Dr Gülşah Seydaoğlu Biyostatistik Anabilim Dalı	
	Prof Dr Gürhan Sakman Genel Cerrahi Anabilim Dalı	Toplantıya Katılmadı
	Doç Dr Suat Gezer Göğüs Cerrahisi Anabilim Dalı	
	Av. Zehra Bulut Hukukçu Üye	
	Dr Neşe Kayrın Kurum Dışı Üye	

Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlık Binası, Balcalı 01330 Adana
Telefon: 0322 338 60 60 dahili 3465, Faks: 0322 338 67 22

AYDINLATILMIŞ ONAM FORMU

(Çalışmanın Adı)

Adana Atmosferinden İzole Edilen Küf Mantarlarından Alerjen Üretimi

(Hekimin Açıklaması)

Size veya çocuğunuza Adana atmosferinden izole edilen ve alerjen olduğu tespit edilen ve steril koşullarda elde edilmiş mantar alerjenleri deriye damlatılarak deri delme testi yapılacaktır. Söz konusu araştırma, Adana atmosferinden izole edilen küflerin alerjenlerini test edecek bir çalışma olduğundan, klinikte uygulanan standart alerji testine paralel (ek) olarak uygulanacaktır. Test 15 dakika sonra oluşacak kızamık ve kabartı boyutları ile değerlendirilecektir. Test materyalinin ticari olanlardan bir farklılığı yoktur ve yan etkileri de benzer olacaktır (delme esnasında ağrı, kaşıntı, urtiker, burun akıntısı, hisiltılı solunum ve nefes darlığı). Eğer bu yan etkiler gözlemlenirse test sonlandırılıp gerekli müdahaleler için gerekli malzemeler hazır bulundurulacaktır.

Sonuçlar öncelikle bilimsel amaçla kullanılacak, kişisel bilgileriniz gizli tutulacak, sorun saptanması halinde durum size bildirilecek ve alınması gereken önlemler konusunda ayrıntılı bilgilendirme yapılacaktır. Parasal bir bedel ödemenizi gerektirmeyen ve size de bir ödeme yapılması söz konusu olmayan bu çalışmaya katılmama ve katıldıktan sonra çekilme hakkınız bulunmaktadır. Ek bilgi talebiniz olursa sözlü olarak karşılanacaktır.

Araştırmamıza katılmayı kabul ediyorsanız, lütfen aşağıdaki bölüme adınızı-soyadınızı yazıp tarih ve imza atınız. Teşekkür ederiz.

YUKARIDA BELİRTİLEN KOŞULLARI OKUDUM VE ANLADIM. SÖZ KONUSU ARAŞTIRMAYA HİÇBİR BASKI VE ZORLAMA OLMAKSIZIN KENDİ RIZAMLA ÇOCUĞUMUN KATILMASINI KABUL EDİYORUM.

Katılımcı

Adı, soyadı: Elif San
Adres:
Tel. 05054054720
İmza: 

Katılımcının annesi

Adı, soyadı: Hacer San
Adres: Toros man. 2/6 Tolga Ap kat: 2/6 Çukurova - Adana
Tel. 05533556969
İmza: Hacer

Katılımcının babası

Adı, soyadı:
Adres:
Tel.
İmza:

Katılımcı ile görüşen hekim

Adı soyadı, unvanı:
Adres: Uzm. Dr. Mahir SERİS
Tel. Ç.U. Balıkcı Hastanesi
İmza: Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları A.D.
Çocuk Alerji ve Asma Uzmanı Dr. D.
Dip. No: 119252
Dip. Tesc. No: 119252