

TRICHOPHYTON MENTAGROPHYTES SUŞLARININ ANTİFUNGAL MADDELERE DUYARLILIKLARI

Muammer KİRAZ¹, Ömer KASIMOĞLU², Gülşen AKTAN², Dilek KAYA²

ÖZET

Dermatomikoz ön tanısı ile 80 hastadan alınan saç, deri kazıntısı ve tırnak örneklerinden etken olarak izole edilen 37 dermatofit suşundan 25'inin *T. mentagrophytes* olduğu belirlenmiştir. Bu suşların antifungal maddelere duyarlılık deneyi mikrodilüsyon yöntemi uygulanarak yapılmış ve tolnaftat, klotrimazol ve tiyokonazole hepsi duyarlı; isokonazole 24'ü, sulkonazol ve oksikonazole 22'si; mikonazole 21'i; bifonazol ve ketokonazole 18'i ve griseofulvine 14'ü duyarlı sonuç vermiştir.

SUMMARY

Susceptibility of Trichophyton mentagrophytes strains to antifungal agents.

Totally 80 specimens including hair, nail and skin scarpings were examined and twenty five of thirty three dermatophyte strains were identified as *T. mentagrophytes*. Susceptibility of these strains to antifungal agents were determined by microdilution method, and all of the strains were found susceptible to tolnaftate, clotrimazole and thioconazole whereas 24 were susceptible to isokonazole, 22 to sulconazole and oxiconazole, 21 to miconazole, 18 to bifonazole and ketoconazole and 14 to griseofulvine.

GİRİŞ

Antimikrobiyal maddelerin *in vivo* etkinliğinde konak ile mikroorganizma arasındaki bir yapısal farklılık gözönüne alınır. Konağın ökaryot, bakterinin prokaryot olması nedeniyle yapısal farklılık geniş boyutludur. Bu nedenle çok sayıda ve çeşitli antibakteriyel madde geliştirilmiştir. Mantar infeksiyonlarında kullanılacak antifungal madde sayısı sınırlıdır. Çünkü hem konak hem de mantar hücresi ökaryot olup benzer yapısal özellik göstermektedir.

Son yıllarda fırsatçı mantar infeksiyonları giderek artan sıklıkta ortaya çıkmakta, bu infeksiyonlarda alışımlı mantar türlerinin dışındaki türler de etken olmaktadır. Daha sık ve çoğunlukla gelişigüzel antifungal uygulanmasına bağlı olarak mantar suşlarında direnç olduğu çeşitli araştırmalarda belirlenmiştir. Gerek yeni elde edilen antifungal maddelerin etkinliğinin belirlenmesi ve gerekse de suşlardaki direnç durumunun araştırılması amacıyla *in vivo* ve *in vitro* koşullarda yoğun çalışmalar sürdürülmektedir.

Antifungal maddelerin etkinliği *in vitro* koşullarda MIC değeri ile saptanmaktadır. Bu değer, mantar suşuna antifungal maddenin fungostatik etki gösterdiği en düşük konsantrasyondur. *In vivo* koşullarda etkinlik için break point değeri geçerlidir. Bir populasyon içindeki suşların çoğunluğu ile elde edilen MIC değeri endpoint olarak tanımlanmaktadır. Breakpoint değeri ise antifungal maddenin endpoint değeri, doku konsantrasyonu ve *in vivo* yanıtta etkili faktörlerin birarada değerlendirilmesi ile elde edilmektedir.

1 - İstanbul Tıp Fakültesi, Mikroorganizma Kültür Koleksiyonları Araştırma ve Uygulama Merkezi (KÜ-KENS), Çapa, İstanbul.

2 - İstanbul Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Çapa, İstanbul.

Mantar suşlarına karşı yapılan duyarlılık deneyleri prensip olarak antibakteriyel duyarlılık deneylerine benzemektedir. Ancak mantarların yapısal özellikleri, gösterdikleri yapısal değişkenlikler ve kültür koşulları farklılıkları standardizasyonu güçleştirmektedir. Mantar suşlarıyla yapılan duyarlılık deneylerindeki değişken faktörleri standartlaştırmayı amaçlayan çalışmalar sürdürülmektedir; ancak çalışma gruplarında henüz birlik sağlanamamıştır. Bu konuda çalışan araştırmacıların en azından şimdilik kendi laboratuvarları için bir standart oluşturması ve periyodik olarak standart suşlar kullanarak bu standardizasyonu doğrulamaları gerekmektedir (1, 9, 14, 21, 23).

GEREÇ VE YÖNTEM

Denenen suşlar: Bu çalışmada deri kazıntısı, saç ve tırnak örneğinden izole edilen dermatofit suşlarının % 67'sini oluşturan 25 *T.mentagrophytes* suşunun eğri Sabouraud dekstroz agardaki saf kültürleri kullanılmıştır.

Standart dermatofit suşları: DM201 *M.nanum*, NCPF 246 *M.gypseum* suşları ile deney koşulları kontrol edilmiştir.

Antifungal maddeler: Bifonazol, griseofulvin, isokonazol, ketokonazol, klotrimazol, mikonazol, oksikonazol, sulkonazol, tiyokonazol ve tolnaftat denenmiştir. Bu maddeler ham madde olarak kullanılmıştır.

Antifungal madde çözeltileri: Mikrodilüsyon duyarlılık deneyi nutrient broth (NB) besiyerinde yapılmıştır. Antifungal maddelerin ana çözeltileri stok solüsyon olarak hazırlanmıştır. Bu maddelerin tümü, ketokonazol hariç, DMSO'da 400 µg/ml oranında çözündürülmüş, ketokonazol için 0.4 veya 0.2 N HCl solüsyonu çözücü olarak kullanılmıştır. Ana çözeltiler önce DMSO ile dilüe edilerek sulandırım oranı 100 µg/ml düzeyine düşürülmüş ve sonra nutrient broth kullanılarak son konsantrasyonları mikropleytlerde elde edilmiştir.

Suşların homojenizasyonu:

Saf kültürlerden içinde 15 ml NB bulunan 100 ml'lik burgulu kapaklı şişelere (Schott) aktarılmıştır. Kültürler 25-32°C'de 3-5 gün üremenin aktif olduğu faza ulaşmaya kadar inkübe edilmiştir. İnkübasyon sırasında sporlaşmayı önlemek için oksijenlenmeyi sağlamak üzere kültürler hergün birkaç kez çalkalanmıştır. Üreme yeterli düzeye eriştiğinde, santrifüj edilmek üzere 20 ml'lik burgulu kapaklı şişelere aktarılmış, 20 dakika 5000 devir/dakikada santrifüj edilerek üst sıvıları dökülmüştür. Çökelti hâlindeki kültürlerin üzerine 15 ml distile su ilâve edilerek santrifüj işlemi 2 defa tekrarlanmıştır. Üst sıvı son defa döküldükten sonra şişelerde kalan kültürlere 3-4 ml NB ilâve edilmiştir.

Burgulu kapaklı şişelerde hazırlanmış olan kültür süspansiyonlarına aseptik şartlarda, kırılmaya dayanıklı steril cam parçaları ilâve edilmiş, vorteks (IKA-VF) yardımı ile kültürlerin gözle görülen mantar kümeleri yok oluncaya kadar 4-5 dakika çalkalanmıştır. Homojen bir süspansiyon haline getirilmiş olan kültürler spektrofotometrede (Pharmacia LKB) 450 nm'de 0.600 absorbans verecek şekilde NB ile ayarlanmıştır (6, 7, 8).

Duyarlılık deneyi:

İlk aşamada mikropleytin (8x12= 96 çukurlu, disposable, U tipi) tüm çukurlarına mikropipet yardımı ile (50-200 µl-Socorex) 100 µl NB konmuştur. Antifungal maddelerin ilave edildiği ikinci aşamada 100 µg/ml'lik çözeltiden 100 µl miktarlarda, çok kanallı mikropipet yardımı ile ilk sıradaki 10 çukura ilâve edilmiş, gargara yaptırılarak karıştırılmıştır (2-3 kez). Bu karışımdan 100 µl alınarak 2'inci, 3'üncü, ... 10'uncu sıradaki çukurlara geçirilmiştir. Üçüncü aşamada bütün çukurlara 100 µl NB besiyeri konularak 25-0.2 µg/ml arasındaki son dilüasyonlar elde edilmiştir. Son aşamada denenecek olan suşlar çok kanallı

mikropipet yardımı ile (5-50 µl-Socorex) 10 µl'lik hacimlerde ilave edilmiştir. Mikropleyette boş kalan 11. sıradaki çukurlar antimikotik madde içermeyip yalnız suş ekimi yapılarak pozitif kontrol, 12. çukurlar ise yalnız NB ile doldurularak negatif kontrol olarak inkübe edilmiştir.

Mikropleytlerin üzeri steril cam plaklar ile hava almayacak şekilde seloteyle kapatılmış, 26°C'de inkübe edilmiştir. Altı gün süren inkübasyon süresince çukurlardaki üreme (üreme odakları halinde) konkav bir ayna ile gözlenerek saptanmıştır. Üremenin olmadığı en düşük dilüsyon antifungal maddenin MIC değeri olarak kabul edilmiştir.

BULGULAR

25 *T.mentagrophytes* suşu ile yapılan duyarlılık deneyinde suşların tümünün (% 100) tolnaftat, klotrimazol ve tiyokonazole, 24'ünün (% 96) isokonazole, 22'sinin (% 88) sulkonazol ve oksikonazole, 21'inin (% 84) mikonazole, 18'inin (% 72) bifonazol ve ketokonazole ve 14'ünün ise (% 56) griseofulvine duyarlı olduğu saptanmıştır (Tablo).

Tablo. *T.mentagrophytes* suşlarının antifungallere duyarlılığı.

Suş	Antifungal madde	Duyarlı suş sayısı
<i>T.mentagrophytes</i> (n=25)	Tolnaftat	25
	Klotrimazol	25
	Tiyokonazol	25
	İsokonazol	24
	Sulkonazol	22
	Oksikonazol	22
	Mikonazol	21
	Bifonazol	18
	Ketokonazol	18
	Griseofulvin	14

TARTIŞMA

1970'li yıllardan bu yana antifungal maddelerde sağlanan gelişmeler kapsamında çeşitli imidazol ve triazol (klotrimazol, mikonazol, isokonazol, ketokonazol, itrakonazol ve terkonazol gibi) kullanıma girmiştir. Geniş spektrumlu olan bu bileşiklerin hücre membran düzeyinde etkin olduğu bildirilmiştir. Birçoğu ergosterol biyosentezini inhibe etmektedirler. Klinik olarak maya ve dermatofitlere bağlı yüzeysel mantar infeksiyonlarında başarı ile kullanılmaktadırlar (12, 13).

Azol antifungal maddeler invitro olarak çoğunlukla etkindirler. Ancak çeşitli çalışmalarda invitro direnç sonuçları da bildirilmiştir. Yöntemlerdeki farklılıklar ve mantar suşlarına bağlı yapısal farklılıklar nedeniyle standart sonuçlar alınamaması ve invitro etkinlik farkları suşların duyarlılığının yorumlanmasına güçlük getirmektedir (9, 22).

Çalışmamızda duyarlılık deneyi standardize sıvı dilüsyon tekniği ile yapılmıştır. Deneyde griseofulvin ve tolnaftatın yanısıra, sekiz farklı azol kökenli antifungal madde kullanılmıştır. Bu maddeler 25 *T.mentagrophytes* suşuna karşı invitro şartlarda denenmiş, elde edilen sonuçlar endpoint değerleri gözönüne alınarak değerlendirilmiştir.

Yüzeysel dermatomikoz olgularında topikal uygulanan azollerden olan tol-naftat, klotrimazol ve tiyokonazole karşı denenen suşların tümü çalışmada du-yarlı bulunmuştur. Bu sonuçlar tol-naftat ile ilgili Robinson ve Raskin (23), Plempele ve Bartman (19) ve Waitz ve arkadaşlarının (29) verileri ile (0.1-0.5 µl/ml) uyum göstermektedir.

Tiyokonazol ile ilgili diğer çalışmalardaki bulgular 0.5-1.5 µg/ml MIC ara-lığında değişen konsantrasyon değerleri ortaya koymaktadır. Çalışmaları yıllara göre incelediğimizde duyarlılığının ilk yıllarda yüksek olduğu, ancak suşların giderek direnç kazandıkları görülmektedir(13).

Çalışmamızın mikonazol ile yapılan deneylerinde 4 suş (% 16) dirençli bu-lunmuştur. Bu sonuç Van Custem'in (28) çalışması ile uyum göstermemektedir. İsokonazolde 1 suş (% 4) dirençli olup Tauber'in (27) çalışması ile uyumlu gö-rülmektedir. Bifonazolde ise 7 suş (% 28) dirençli bulunmuştur.

Dermatofitlerin sağaltımında oral olarak kullanılan ilk örnek olan griseoful-vinle yapılan çalışmalarda dokuda gerçekleşebilen ilaç yararlılığı seviyesinin 3 µg/ml olduğu, enzim aktivitesi nedeni ile bu seviyenin üstünde maddenin etkin-liğini gösteremediği araştırmalarla belirlenmiştir(9). Çalışmada bu barajı aşan 11 suş (% 44) bulunmuştur. Holmber (9) ve Granade ve Artis'in (6, 7) araştı-rmalarında bunu doğrulayan veriler daha düşük oranlarda gerçekleşmiştir.

Oral olarak kullanılabilen ve bir azol türevidir olan ketokonazolun yüzeysel dermatomikozların etkili oldukları bölgelerde oluşturabildiği doku seviyesi 6 µg/ml sınırdadır (4, 16).

Ketokonazol oral olarak kullanıldığında serumda eriştiği ortalama düzey ile doku düzeyinin yaklaşık olduğu belirlenmiş ve bu değer duyarlı/dirençli kriteri olarak kabul edilmiştir. Normal uygulama dozu günde 2x200 mg olan ketoko-nazolun verilmiş dozu azaltıldığında dirençli suş sayısında artış olacağı açıktır. Buna göre doz uygulanmasında özen gösterilmesi gerektiği bir kez daha an-laşılmaktadır.

Ketokonazol için 5-6 µg/ml, klotrimazol için 0.5-1 µg/ml ve diğer azoller için 2-3 µg/ml kriter olarak alınmış, bundan yüksek MIC değerlerindeki suşlar dirençli olarak yorumlanmıştır (2, 3, 5, 10, 11, 17, 18, 19, 20, 21, 24, 25, 26, 27).

KAYNAKLAR

- 1- American Medical Association Department of Drugs: *AMA Drug Evaluations*, 3. bas-kı, Publ Sci Group Inc, Littleton (1977).
- 2- Blank H : Griseofulvine and dermatophytes, *Arch Dermatol* 81: 649 (1960).
- 3- Custem JV: The antifungal activity of ketoconazole, *Am J Med* 24: 9 (1983).
- 4- Daneshmend TK, Warnock DW, Turner A: Pharmacokinetics of ketoconazole in nor-mal subject, *J Antimicrob Chemother* 8: 299 (1981).
- 5- Duhm VB, Maul W, Medenwald H: Pharmakokinetik nach topischer Anwendung von bisphenyl-(2 chlorphenyl) -1- imidazolyl-methan (¹⁴ C), *Arzneim -Forsch (Drug Res)* 22: 1276 (1972).
- 6- Granade T C, Artis W M: Antimycotic susceptibility testing of dermatophytes in mic-rocultures with a standardized fragmented mycelial inoculum, *Antimicrob Agents Chemother* 17: 725 (1980).
- 7- Granade T C, Artis W M: Factors effecting griseofulvine susceptibility of *T. rubrum* in microcultures, *J Microbiol* 16: 1043 (1982).
- 8- Granade T C, Shead M A, Artis W M: Lyophilized microculture susceptibility test for ketoconazole, miconazole, clotrimazole and griseofulvine against dermatophytes, *J Clin Microbiol* 18: 10 (1983).

- 9- Holmber K: Invitro assessment of antifungal drug resistance, *Acta Derm Venerol (Suppl) 121*: 131 (1986).
- 10- Holt R C: Laboratory and clinical studies with clotrimazole, *Postgrad Med J (July Suppl)*: 24 (1974).
- 11- Holt R J, Newman R L: Laboratory assessment of the antimycotic drug clotrimazole, *J Clin Pathol 25*: 1089 (1972).
- 12- Jones H E: Consensus of the role and positioning of the imidazoles in the treatment of dermatophytosis, *Acta Derm Venerol (Suppl) 121*: 139 (1986).
- 13- Mc Ginnis M R, Rinaldi M G: Antifungal drug: Mechanism of action, drug resistance, susceptibility testing and assay of activity in biological fluids, "V Lorian (ed): *Antibiotics in Laboratory Medicine*, 3. baski" kitabında s.198, Williams and Wilkins, Baltimore (1991).
- 14- Moore G S, Jaciow D M: *Mycology for the Clinical Laboratory*, Publish Co, Reston (1979).
- 15- Odds F C: Laboratory evaluation of antifungal agents, *J Antimicrob Chemother 6*: 749 (1980).
- 16- Odds F C, Milne L R J, Gentles J C, Ball E H: The activity in vitro and in vivo of a new imidazole antifungal, ketoconazole, *J Antimicrob Chemother 6*: 97 (1980).
- 17- Osumi M, Yamada N, Okada J: The effect of bifonazole on the structure of Trichophyton, *Arzneim -Forsch (Drug Res) 33*: 1484 (1983).
- 18- Patzscke K, Ritter W, Siefert H M: Pharmacokinetic studies following systemic and topical administration of (¹⁴ C) bifonazole in man, *Arzneim-Forsch (Drug Res) 33*: 745 (1983).
- 19- Plempel V M, Bartman K: Experimentelle untersuchungen zur antimykotischen wirkung von clotrimazol in vivo und bei lokaler applikation in vivo, *Arzneim -Forsch (Drug Res) 22*: 1280 (1972).
- 20- Plempel M, Regel E, Büchel H: Antimycotic efficacy of bifonazole in vitro and in vivo, *Arzneim-Forsch (Drug Res) 33*: 617 (1983).
- 21- Polak A: Oxiconazole, a new imidazole derivative, *Arzneim-Forsch (Drug Res) 32*: 17 (1982).
- 22- Rippon J W: *Medical Mycology*, 2. baski, W B Saunders Co, Philadelphia (1982).
- 23- Robinson H M, Raskin J: Tolnaftate, a potent topical antifungal agent, *Arch Dermat 91*: 372 (1965).
- 24- Sande M A, Mandel G L: Antimicrobial agent, "A G Gilman, L S Goodman, T W Rall (eds): *The Pharmacological Basic of Therapeutics*, 7. baski" kitabında, Mac Millan Publ Co, Newyork (1985).
- 25- Shadomy S, Paxton L, Espinel-Ingroff A, Shadomy H J: In vitro studies with miconazole and miconazole nitrat, *J Animicrob Chemother 3*: 147 (1977).
- 26- Shadomy S: In vitro antifungal activity of clotrimazole (Bay b 5097), *Infect Immun 4*: 143 (1971).
- 27- Tauber A, Rzadkiewicz: Bioavailability of isoconazole in the skin, *Mycosen 22 (6)*: 201 (1979).
- 28- Van Custem J M, Thienport D: Miconazole, a broad-spectrum antimycotic agent with antibacterial activity, *Chemother 17*: 392 (1972).
- 29- Waitz J A, Moss E L, Weinstein M J: Chemotherapeutic evaluation of clotrimazole (Bay b 5097), 1 (0-choloro-a-a-Diphenylbenzyl) imidazole, *Appl Microbiol 22*: 891 (1971).