

## DERMATOFİT SUŞLARININ ANTİFUNGAL MADDELERE DUYARLILIĞI

Dilek KAYA<sup>1</sup>, Ömer KASIMOĞLU<sup>1</sup>, Muammer KİRAZ<sup>2</sup>

### ÖZET

İzole edilen 48 dermatofit suşunun 10 antifungal maddeye duyarlılıkları mikrodilüsyon yöntemiyle araştırılmıştır. Suşların tamamı tolnaftata duyarlı bulunurken, klotrimazole % 98, tiyokonazole % 90, isokonazole % 88, oksikonazole % 85, sulkonazole % 81, mikonazole % 79, bifonazole % 75, ketokonazole % 67 ve griseofulvine % 50 oranında duyarlılık saptanmıştır.

### SUMMARY

*Susceptibility of dermatophyte strains to antifungal agents.*

The susceptibility of 48 dermatophyte strains to ten antifungal agents was tested by microdilution technique. All of the strains were susceptible to tolnaftate (100 %), whereas clotrimazole (98 %), tioconazole (90 %), isoconazole (88 %), oxiconazole (85 %) and sulconazole (81 %) were found more effective than miconazole (79 %), bifonazole (75 %), ketoconazole (67 %) and griseofulvine (50 %).

### GİRİŞ

Mantar hastalıklarının tedavisinde kullanılan antifungal maddelerin sayısı son yıllara kadar oldukça sınırlı iken, günümüzde yeni maddelerin bulunması konusunda yoğun çalışmalar yapılmakta, yeni ürünler kullanım alanına girmektedir. Mantar hastalıklarının tedavisinde önceleri daha çok topikal ilaçlar kullanılırken, günümüzde sistemik etki gösteren, oral ve intravenöz olarak kullanılabilen ürünler uygulamaya sunulmaktadır.

Mantarlar ve yerleştikleri konağın hücrelerinin ökaryot olmasından dolayı mantarlara karşı kullanılan antifungal maddelerin konak üzerinde gösterdikleri yan etkiler oldukça fazladır.

Geçmiş yıllarda sınırlı sayıda olan antifungal maddelerin sık ve gelişigüzel kullanımları sonucunda, infeksiyon etkeni olan mantar suşlarında direnç gelişimi görüldüğünü bildiren çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. Antifungal maddelere karşı gelişen bu direnç primer ya da sekonder olarak ortaya çıkabilmektedir. Antifungal maddelerin duyarlılıkları makro ve mikrodilüsyon, agar dilüsyon ya da disk diffüzyon metodları ile belirlenebilmektedir. Ancak yapılan in-vitro çalışmalarda kullanılan metodlarda bir standardizasyon sağlanamadığı için duyarlılık konusunda çalışmalar yapan farklı laboratuvarlardan farklı sonuçlar alınabilmektedir. Ayrıca klinik laboratuvar işbirliği ile yapılan çalışmalardan alınan sonuçlara göre duyarlılık konusunda, in-vitro, in-vivo uygulamalarda da farklı yanıtlar alındığı bildirilmektedir. Bu nedenle de günümüzde deney hayvanlarında yapılan in-vivo çalışmalarla, klinik çalışmalara fazlaca önem verilmektedir. Mantarlardaki morfolojik çeşitlilik, optimal üreme koşulları, üreme hızındaki farklılık duyarlılık metodlarının standartlığını etkilemektedir. Antifun-

1 - İstanbul Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Mikoloji Bilim Dalı, Çapa, İstanbul.

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

gal maddelerin in-vitro koşullarda etkinliği MIC değeri ile belirlenmektedir. MIC değeri antifungal maddenin, bir mantar suşuna fungostatik etki gösterdiği en küçük konsantrasyon olarak ifade edilir.

Antifungal maddelerin yan etkilerinin yüksek olması ve etkinliklerinin cinslere ve hatta türlere göre farklılık göstermesinden dolayı tedavide öncelikle infeksiyon etkeninin belirlenmesi ve antifungal maddelere duyarlılığının saptanması gereklidir. Elde edilen bu sonuçlara göre uygulanan tedavide klinik şifa oranı daha yüksek olacaktır ve böylece konağın, toksitesi yüksek olan ilacı gereksiz yere kullanımı engellenecektir (7, 9, 15, 16, 27).

## GEREÇ VE YÖNTEM

Denenen suşlar: İstanbul Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Miko-  
loji Bilim Dalı laboratuvarına mikolojik tetkik için gönderilen çeşitli muayene  
maddelerinden izole edilen 48 dermatofit suşu çalışma kapsamına alınmıştır. Bu  
suşların 27'sinin *T.mentagrophytes*, 12'sinin *T.rubrum*, 4'ünün *T.tonsurans*, 1'inin  
*T.soudanense*, 3'ünün *M.audouinii*, 1'inin *M.canis* olduğu belirlenmiştir.

Standart dermatofit suşları: NCPF 637 *Microsporium canis* ve NCPF 419  
*Trichophyton rubrum* suşları ile deney koşullarının uygunluğu kontrol edilmiş-  
tir.

Besiyeri: İlk izolasyon besiyeri olarak Sabouraud besiyeri, duyarlılık dene-  
yinde ise buyyon (Nutrient broth, NB) besiyeri kullanılmıştır.

Antifungal maddeler: Bifonazol, griseofulvin, isokonazol, ketokonazol, klotrimazol, mikonazol, oksikonazol, sulkonazol, tiyokonazol ve tolnaftat ham  
madde olarak kullanılmıştır. Ketokonazol dışındaki tüm antifungal maddeler  
DMSO'de 400 µg/ml oranında stok solüsyon olarak hazırlanmıştır. Ketokonazol  
ise 0.2 N HCl içerisinde 400 µg/ml olarak çözündürülmüştür (8, 26).

Yöntem: Antifungal duyarlılık deneyinde mikrodilüsyon yöntemi, dermato-  
fit suşlarının süspansiyon ayarında ise spektrofotometrik yöntem kullanılmıştır  
(8).

Suşların hazırlanması: Sabouraud'un eğri besiyerinde üreyen dermatofit suş-  
larından, içerisinde 3-5 ml NB bulunan tüplere saf kültür alınmış ve 25°C'de  
3-5 gün inkübe edilmiştir. Sıvı besiyerinde üreyen suşlar daha sonra 15 ml NB  
içeren 100 ml'lik burgulu kapaklı şişelere (Schott) aktarılarak üremenin aktif  
fazına erişmeleri için 25°C'de 2-3 gün inkübe edilmiş, bu süre içerisinde günde  
2-3 kez çalkalanarak oksijenlenmeleri sağlanmış, böylece sporlaşmaları engel-  
lenmiştir. İnkübasyon süresi sonunda suşlar 50 ml'lik santrifüj tüplerine aktarı-  
larak 4500 devir/dk'da 20 dakika santrifüjde çevrilmiştir. Bu suşların üst sıvıları  
dökülerek üzerlerine 15 ml distile su ilave edilmiş ve tekrar santrifüjde çevril-  
miştir (yıkama işlemi). Bu işlem 2 kez tekrarlanmıştır. Son santrifüj işleminden  
sonra dipte çökelti halindeki suşların üzerine 10 ml NB ilave edilmiştir. Suşlar,  
içerisinde steril boncuklar bulunan burgulu kapaklı şişelere aktarılmıştır. Bu şi-  
şeler vortekste (IKA-VF) 4-5 dakika süre ile gözle görülen mantar kümeleri  
yok oluncaya kadar çalkalanmıştır. Homojen hale gelen kültürlerin süspansiyon-  
ları spektrofotometrede (Pharmacia LKB) 450 nm'de 0.6'lık absorbans değerine  
göre ayarlanmıştır(8).

Duyarlılık deneyi: 96 çukurlu (8x12) disposable U tipi mikropleyt kullanılı-  
mıştır. Tüm çukurlara mikropipet ile (50-200 µl-Socorex) 50 µl NB konmuştur.  
Herbir suş için bir mikropleyt kullanılmıştır. Denenen antifungal maddelerin  
stok solüsyonları (400 µg/ml) 1:1 oranında dilüe edilerek 200 µg/ml'lik çözelti  
elde edilmiştir. Her bir antifungal maddeden 50 µl alınarak ilk üst 10 sıraya  
konmuş, yukarıdan aşağıya doğru seri dilüsyon uygulanmıştır. Mikropleytin tüm

çukurlarına 150 µl NB ilave edilmek suretiyle antifungallerin mikropleytte yukarıdan aşağıya doğru 25-0.2 µg/ml'lik seri dilüsyonları elde edilmiştir.

Spektrofotometrede süspansiyon ayarı yapılmış olan suş, 10 µl'lik hacimlerde 12. sütun haricindeki tüm çukurlara konmuştur. 11. çukur antifungal madde içermeyip pozitif kontrol, 12. çukur ise suş ve antifungal madde içermeyip negatif kontrol olarak bırakılmıştır. Mikropleytin üzeri steril cam ile kapatılarak, selofan band ile izole edilmiş ve 26°C'de 5-6 gün inkübasyona bırakılmıştır.

İnkübasyon süresi sonunda mikropleyt çukurlarındaki üreme, alttan konkav bir ayna ile bakılarak belirlenmiş ve üremenin olmadığı en düşük dilüsyon MIC değeri olarak saptanmıştır.

Duyarlılık deneyinde belirlenen MIC değerleri ve antifungal maddelerin koriumdaki doku düzeyleri gözönüne alınarak duyarlılıkları belirlenmiştir.

Antifungallerin koriumdaki düzeyleri ketokonazol için 5-6 µg/ml, klotrimazol için 0.5-1 µg/ml, mikonazol için 3 µg/ml, diğer azoller için 2-3 µg/ml, tol-naftat için 3 µg/ml, griseofulvin için 3 µg/ml olarak kabul edilmiştir. Bu değerlere eşit veya daha düşük olan MIC'ler duyarlı, yüksek olan MIC'ler ise dirençli olarak yorumlanmıştır (2, 3, 4, 9, 10, 11, 18, 19, 20, 21, 22, 24, 25, 26, 28).

## BULGULAR

Çalışmamızda antifungal maddelere duyarlılıkları araştırılan dermatofit türleri ve duyarlılık sonuçları tablo 1'de belirtilmiştir. Buna göre 48 dermatofit suşu ile yapılan duyarlılık deneyinde suşların tamamı (% 100) tol-naftata, 47'si (% 98) klotrimazole, 43'ü (% 90) tiyokonazole, 42'si (% 88) isokonazole, 41'i (% 85) oksikonazole, 39'u (% 81) sulkonazole, 38'i (% 79) mikonazole, 36'sı (% 75) bifonazole, 32'si (% 67) ketokonazole, 24'ü (% 50) griseofulvine duyarlı bulunmuştur (Tablo 1).

## TARTIŞMA

Son yıllarda muayene maddelerinden etken olarak izole edilen dermatofit suşlarında çeşitli antifungal maddelere direnç gelişimi olduğu bildirilmektedir (1, 5, 6, 12, 13, 14, 25, 30).

Erbakan ve Aksungur (6) dermatofit türlerinin griseofulvine direnç gelişimini incelemiş ve çeşitli türlerin in-vitro koşullarda bu antifungal maddeye karşı direnç oluşturduğunu bildirmişlerdir.

Ekmen ve arkadaşları (5) saçlı derinin mantar infeksiyonlarından izole ettikleri *T.schoenleini*, *T.mentagrophytes* ve *M.canis* suşlarında, griseofulvin ile belirli bir tedavi süresinden sonra direnç geliştiğini bildirmişlerdir.

Kiraz (13) griseofulvine karşı *Trichophyton* cinsinde % 22'lik, *Microsporum* cinsinde ise % 50'lik bir direnç oranı saptamıştır.

Yücel ve arkadaşları (30) griseofulvine karşı *T.mentagrophytes* suşlarında (n:21) % 4.7 oranında, *M.canis* (n:4) suşlarında ise % 25 oranında direnç saptamışlardır.

Korting ve Rosenkranz (14) griseofulvine karşı 16 *T.mentagrophytes* suşundan 4'ünün (% 25) MIC değerini 3 µg/ml olarak belirlemişler ve bu değeri dirençli olarak bildirmişlerdir.

Shadomy'e (25) göre izole edilen 18 *Trichophyton* cinsinden yalnızca 6'sında (% 33) griseofulvinle 0.78 µg/ml altında MIC değeri elde edilmiş ve duyarlı olarak kabul edilmiştir. Diğer suşlar (% 66) ise 3 µg/ml'lik MIC değerini aştığı için griseofulvine dirençli olarak kabul edilmiştir.

Tablo 1. Dermatofit türlerinin çeşitli antifungal maddelere duyarlılıkları.

Dermatofit	Bifonazol	Grisofulvin	İsokonazol	Ketokonazol	Klotrimazol	Mikonazol	Oksikonazol	Sulikonazol	Tiyokonazol	Tolnaftat
<i>T.mentagrophytes</i> (n:27)	19	14	24	18	27	22	22	22	25	27
<i>T.rubrum</i> (n:12)	8	4	10	9	11	9	11	11	11	12
<i>T.tonsurans</i> (n:4)	4	1	3	1	4	3	3	2	3	4
<i>T.soudanense</i> (n:1)	1	1	1	-	1	1	1	1	1	1
<i>M.audouinii</i> (n:3)	3	3	3	3	3	2	3	2	2	3
<i>M.canis</i> (n:1)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<b>Toplam</b> (n:48)	<b>36</b>	<b>24</b>	<b>42</b>	<b>32</b>	<b>47</b>	<b>38</b>	<b>41</b>	<b>39</b>	<b>43</b>	<b>48</b>

Çalışmamızda griseofulvine karşı toplam 48 dermatofit suşundan 24'ü (% 50) direnç göstermiştir. *Trichophyton* cinsinde griseofulvine dirençli oranı % 55 iken, *Microsporum* cinsinde tüm suşlar duyarlı bulunmuştur. Çalışmamızda, Erbakan, Aksungur, Ekmen, Kiraz, Yücel, Korting, Resenkranz ve Shadomy'nin sonuçlarına uygun olarak direnç saptanmıştır. Ancak griseofulvine karşı dirençlilik oranı konusunda tam bir birlik söz konusu değildir. Bu direnç oranı farklılığının kullanılan yöntemlerin farklı olmasından da kaynaklandığı düşünülmektedir.

Kasımoğlu ve Anđ (12) *Trichophyton* türlerinde klotrimazole karşı % 3.3, *Microsporum* cinsinde ise % 9.6 oranında direnç saptamışlardır.

Arat (1) klotrimazole karşı *Trichophyton* cinsinde % 17, *Microsporum* cinsinde % 10.3 oranında dirençlilik bildirmiştir.

Kiraz (13) klotrimazole karşı *Trichophyton* ve *Microsporum* cinslerinin tamamının duyarlı olduğunu bildirmiştir.

Waitz (29) klotrimazolün aktivitesinin filamentoz mantarlara karşı geniş spektrumlu olduğunu, in-vitro aktivitesinin tolnaftattan daha az, buna karşılık pekçok olguda griseofulvinden daha fazla olduğunu saptamıştır.

Çalışmamızda klotrimazole karşı *Trichophyton* cinsinde % 2.3 oranında direnç saptanmıştır. *Microsporum* cinsinde ise tüm suşlar duyarlı bulunmuştur. Çalışmamız Kasımoğlu, Arat ve Waitz'in çalışmalarıyla uyum göstermektedir. Ancak *Microsporum* cinsinden suşların sonuçlarıyla uyum göstermemektedir. Böyle bir sonucun, çalışmamızdaki *Microsporum* cinsi suşlarının azlığından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Kasımoğlu ve Anđ (12) mikonazole karşı *Trichophyton* cinsinde % 3 oranında, *Microsporum* cinsinde % 8.5 oranında direnç bildirmiştir.

Korting ve Rosenkranz (14) *Trichophyton* cinsinden dermatofitlere mikonazolün ketokonazolden daha etkili olduğunu bildirmişlerdir.

Yücel ve arkadaşları (30) *Trichophyton* ve *Microsporum* cinsinden suşların tümünü ketokonazole ve mikonazole duyarlı bulmuşlardır.

Kiraz (13) mikonazole karşı *Trichophyton* ve *Microsporum* türlerinin duyarlı olduğunu bildirmiştir.

Odds (17) yaptığı in-vitro çalışmada mikonazol ve tiyokonazolün diğer imidazollerden daha etkili olduğunu bildirmiştir.

Cutsem (3) ketokonazolün in-vitro aktivitesinin yüksek olduğunu, ancak bu aktivitenin deneyde kullanılan besiyerine ve deney koşullarına göre değişebileceğini ifade etmiştir. Ayrıca ketokonazolün mikonazolden sonra gelen en aktif antifungal madde olduğunu bildirmiştir.

Çalışmamızda ketokonazole karşı *Trichophyton* cinsinde % 36 oranında, mikonazole karşı % 20 oranında direnç saptanmıştır. Sonuçlarımız Kasımoğlu, Korting ve Rosenkranz'ın çalışmaları ile uyum göstermekte, Yücel, Kiraz, Odds ve Cutsem'in sonuçları ile uygunluk göstermemektedir.

Sağıroğlu ve Yuluğ (23) *Trichophyton* ve *Microsporum* türlerinin bifonazol ile oksikonazole duyarlılıklarını araştırmışlar ve suşların tümünün bu antifungal maddelere duyarlı olduğunu bildirmişlerdir.

Çalışmamızda *Trichophyton* ve *Microsporum* türlerinin bifonazole karşı % 25 oranında, oksikonazole karşı % 15 oranında dirençli olduğu saptanmıştır. Sonuçlarımız Sağıroğlu ve Yuluğ'un çalışması ile uyum göstermemektedir.

Mantarlardaki morfolojik çeşitlilik, optimal üreme koşulları, üreme hızındaki farklılık gibi faktörler, antifungal duyarlılık metodlarının standartlığını etkilemektedir. Bu nedenle çalışmalardan farklı sonuçlar alınabilmektedir. NCCLS tarafından, çeşitli laboratuvarlar arasında tam bir birlik sağlanıncaya kadar araş-

tırmacıların şimdilik kendi laboratuvarları içinde bir standart oluşturması gerektiği önerilmektedir.

#### KAYNAKLAR

- 1- Arat L: Bazı mantar türlerinin clotrimazole hassasiyet durumu, *Uzmanlık Tezi, İst Tıp Fakültesi, Deri Hastalıkları ve Frengi Kliniği* (1975).
- 2- Blank H: Griseofulvin and dermatophytes, *Arch Dermatol* 81: 649 (1960).
- 3- Cutsem JV: The antifungal activity of ketoconazole, *Am J Med* 24: 9 (1983).
- 4- Duhm VB, Maul W, Medenwald H: Pharmakokinetik nach topischer Anwendung von Bisphenyl - (2-chlorphenyl) - 1 - imidazolyl - methan (<sup>14</sup>C), *Arzneim Forsch (Drug Res)* 22: 1276 (1972).
- 5- Ekmen H, Yapar Ö, Dalkılıç E: Saçlı deri infeksiyonlarında griseofulvine karşı dirençlilik teşekkülü, *Türk Hij Tec Biyol Derg* 30: 122 (1970).
- 6- Erbakan N, Aksungur L: A study of the development of resistance in vitro to griseofulvin by dermatophytes in Turkey, *Acta Med Turcia* 3: 99 (1966).
- 7- Espinel - Ingroff A, Shadomy S: In vitro and in vivo evaluation of antifungal agents, *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 8: 352 (1989).
- 8- Granade T C, Artis W M: Antimycotic susceptibility testing of dermatophytes in microcultures with a standardized fragmented mycelial inoculum, *Antimicrob Agents Chemother* 17: 725 (1980).
- 9- Holmberg K: In vitro assessment of antifungal drug resistance, *Acta Derm Venereol* 121: 131 (1986).
- 10- Hold R J: Laboratory and clinical studies with clotrimazole, *Postgrad Med J (July)*: 24 (1974).
- 11- Holt R J, Newman R L: Laboratory assessment of the antimycotic drug clotrimazole, *J Clin Pathol* 25: 1089 (1972).
- 12- Kasımoğlu Ö, Açı Ö: Çeşitli kadida ve dermatofit suşlarının mikonazole hassasiyetleri, *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 4: 101 (1974).
- 13- Kiraz M: Dermatofitlerin tür tanısı ve antibiyotiklere duyarlılıkları, *Doktora tezi, İstanbul Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı* (1988).
- 14- Korting H C, Rosenkranz S: In vitro susceptibility of dermatophytes from Munich to griseofulvine, miconazole and ketoconazole, *Mycoses* 33: 136 (1989).
- 15- Kwon - Chung K J, Bennett J E: Principles of antifungal therapy, *Medical Mycology*, s: 81, Lea and Febiger, London (1992).
- 16- Mc Ginnis M R, Rinaldi M G: Antifungal drugs: Mechanisms of action, drug resistance, susceptibility testing, and assays of activity in biological fluids "V Lorian (ed): *Antibiotics in Laboratory Medicine*, 3. baskı" kitabında s. 198, William and Wilkins, London (1991).
- 17- Odds F C: Laboratory evaluation of antifungal agents: A comparative study of five imidazole derivatives of clinical importance, *J Antimicrob Chemother* 6: 749 (1980).
- 18- Osumi M, Yamada N, Okada J: The effect of bifonazole on the structure of Trichophyton, *Arzneim - Forsch (Drug Res)* 33: 1484 (1983).
- 19- Patzsche K, Ritter W, Siefert H M: Pharmacokinetic studies following systemic and topical administration of (<sup>14</sup>C) bifonazole in man, *Arzneim Forsch (Drug Res)* 33: 745 (1983).
- 20- Plempel V M, Bartman K: Experimentelle Untersuchungen zur antimykotischen Wirkung von clotrimazol in vitro und bei lokaler Applikation in vivo, *Arzneim - Forsch (Drug Res)* 22: 1280 (1972).
- 21- Plempel V M, Regel E, Büchel H: Antimycotic efficacy of bifonazole in vitro and in vivo, *Arzneim - Forsch (Drug Res)* 33: 617 (1983).
- 22- Polak A: Oxiconazole, a new imidazole derivative, *Arzneim - Forsch (Drug Res)* 32: 17 (1982).
- 23- Sağıroğlu M, Yuluğ N: Dermatofit suşlarının imidazol türevlerine karşı duyarlılıkları, *Derma* 6: 5 (1987).

- 24- Sande M A, Mandel G L: Antimicrobial agents, "A G Gilman, L S Goodman, T W Rall (eds): *The Pharmacological Basic of Therapeutics*, 7. baskı", Mac Millan Publ Co, New York (1985).
- 25- Shadomy S: In vitro antifungal activity of clotrimazole (Bay b 5097). *Infec Immun* 4: 143 (1971).
- 26- Shadomy S, Pfaller M A: Laboratory studies with antifungal agents susceptibility test and quantitation in body fluids "A Balows, W J Hausler, K L Herrmann, H D Isenberg, H J Shadomy (eds): *Manual of Clinical Microbiology*, 5. baskı" kitabında s.1173, Am Soc Microbiol, Washington (1991).
- 27- Shadomy S, Paxton L, Espinel - Ingroff A, Shadomy H J: In vitro studies with miconazole and miconazole nitrate, *J Antimicrob Chemother* 3: 147 (1977).
- 28- Tauber A, Rzedkiweicz: Bioavailability of isoconazole in the skin, *Mycosen* 22: 201 (1979).
- 29- Waitz J A, Moss E L, Weinstein M J: Chemotherapeutic evaluation of clotrimazole (Bay b 5097, 1 (o-chloro-Diphenylbenzyl) imidazole), *Appl Microbiol* 22: 891 (1971).
- 30- Yücel A, Öztürk R, Kaymaz H, Eroğlu C: Çeşitli dermatofit ve mayaların bazı antifungal maddelere duyarlılıklarının denenmesi ve sonuçları etkileyen bir kısım faktörlerin araştırılması, *Türk Parazitol Derg* 17: 46 (1993).