

DERMATOFİTLERİN DOĞADAN SOYUTLANMASI

Çağrı ERGİN

Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Denizli, (cagri@pamukkale.edu.tr)

Evrin esnasında su yaşamından kara yaşamına geçen canlılarda keratin adı verilen özelleşmiş protein yapılar ortaya çıkmıştır. Keratin yapısının pek çok dış etkene karşı dayanıklı olması nedeniyle doğada keratini parçalayabilen ve kullanabilen çok az sayıda organizma vardır. Az sayıda böcek, bakteri, aktinomiçet ve bazı mantarlarda keratinofilik ve keratinolitik aktivite bulunmaktadır. Mantarların keratinofilik ve/veya keratinolitik olmaları anamorf/telemorf yapılarına, mikrokonidik/artrokonidik yapılarına veya kolonizasyon özelliklerine göre değişmektedir. Dermatofitler ekolojik olarak antropofilik, zoofilik ve jeofilik olarak adlandırılmakla birlikte, keratin dokuya afiniteleri nedeni ile keratinofilik mantarlar olarak kabul edilirler. İnsanda hastalık etkeni olarak soyutlanan mantar etkenleri arasında en büyük keratinofilik grup dermatofitlerdir. Keratinolitik aktivite dermatofit infeksiyonlarının patogeneğinde önemli rol oynar (1, 2).

Dermatofitlerin yeryüzünde yayılışlarında toplumların genetik özellikleri ve sosyokültürel aktiviteleri yanında çevresel ortamın fiziksel ve kimyasal yapısı da önemlidir. Bu durum dermatofitlerin çevrede varlıklarını ve ekolojilerini etkileyen faktörleri sorgulama ihtiyacını oluşturmuştur. Çok farklı nedenlerle (dermatofitoz etkenlerine duyarlı grupların saptanması, farklı yaş gruplarında ve mesleki risk gruplarında araştırılması, insan ve hayvan artıkları kaynaklı çevresel kirliliğin denetimi, özellikle turizm potansiyeli olan bölgelerde varlıklarının ve yoğunluklarının taranması vb.) yapılan çevresel dermatofitlerin varlığı araştırma çalışmaları son 30 yıl içinde giderek artan şekilde literatürde yerini almaya başlamıştır (3-9). Yapılan taramalar genellikle tropik ve subtropik iklimlerde yoğunlaşmıştır. Elde edilen sonuçlar insan sağlığını doğrudan etkilememektedir, ancak koruyucu hekimlik ve dermatofitlerin ekolojilerinin aydınlatılması yönünden önemlidir (10).

Keratinolitik mantarların çevreden varlıklarının taranmasının diğer bir nedeni de özellikle dericilik ve tekstil sektöründe depolama esnasında meydana getirdiği ekonomik kayıplardır. Bu nedenle deri işleme ve tekstil sektörü depolama ve kullanım esnasında karşılaşılan çevresel keratinolitik mantarların kolonizasyonunun engellenmesi amacı ile işlemlerinde dezenfeksiyon amaçlı kimyasallar kullanılmaktadır. Aynı zamanda bu ürünleri kullanan insanlar için de bu keratinofilik mantarların tinea riski oluşturabilecekleri belirtilmektedir (11-13).

Dermatofitlerin saprofitik formlarının doğal ortamlarında taranması ile ilgili ilk fikirlerin 1910'lu yıllarda Sabouraud tarafından bildirildiği belirtilmektedir (1). Keratinofilik/keratinolitik mantarların çevresel örneklerden varlığının araştırılmasında doğrudan besiyerine ekim (yüzey toprağı seyreltme ekimi), saç tuzağı ile yakalama ve moleküler yöntemler bulunmaktadır. Genellikle seyrelterek ekim toprağın içindeki mikobiyotanın saptanması sık kullanılan bir yöntem olmakla birlikte, keratinofilik mantarlar için modifikasyonlar gerektirmektedir. Besiyerine seçiciliği kazandırmak için yüksek oranda sikloheksimit ilavesi gereklidir (13-16). Doğrudan ekim tekniklerinin uygulaması ortamda bulunan mantarların yoğunluğuna, ekim yapılan besiyerinin seçiciliğine ve inkübasyon özelliklerine göre önemli farklılıklar gösterir. Çevresel ortamlardan alınan örnekler için moleküler yöntemlerin uygulama zorlukları, özgül yöntemlerin seçimi ve maliyet sorunları, özellikle aranan bir tür yok ise tercih edilmemek-

tedir. Nannizzi'nin 1927'de *Microsporum gypseum*'un seksüel formunu saptamak amacı ile kullandığı yöntem temel alınarak Vanbreuseghem tarafından tanımlanan edilen saç tuzağı yöntemi (1952) keratinofilik dermatofitlerin saptanmasında sıklıkla kullanılmaktadır. Yöntem bazı değişiklikler ile ToKaVa (Toma-Karling- Vanbreuseghem, 1962) ve Orr (1969) yöntemleri olarak geliştirilmiştir (1, 16-19).

Çevresel ortamdan toplanan örnekler dermatofit izolasyonu için laboratuvara ulaştıktan sonra hemen incelenmesi uygundur. Ancak 0-4° C'da veya oda ısısında da bekletilebilir. Verimli bahçe toprağı ("loam soil": uygun oranda kum, alüvyon ve kil içeren toprak) içinde dermatofitlerin uzun süre canlı (1-4 yıl) kaldığı gösterilmiştir. Bu toprak steril edildikten sonra dermatofitleri stoklama amacı için de kullanılabilir (1, 20).

Vanbreuseghem'in saç tuzağı tekniği: Çoğunlukla katı, sıvı içinde süspansiyon olabilen, içeriğinde mantarların çoğalabilmesi için gerektiği kadar besi maddesi bulundurabilen ortamlarda keratinofilik mantarlar için kullanılabilir (1, 20).

- İncelenecek örnek steril spatula/kaşık ile polistren torba içine alınır.
- Geniş Petri plakları seçilerek yaklaşık yarısına kadar incelenecek örnek ile doldurulur. Örneğin steril bir alet ile (örn: havan) ince toz hale gelmesi sağlanmalıdır.
- Kısa kesildikten (2-3 cm'lik) sonra steril hale getirilen saç parçacıkları steril penset yardımı tüm örneklerin üzerine bırakılır. Saç sterilizasyonu keratin yapısının bozulmaması için 24 saat süre ile dietileter veya kloroform/metanol (1:1) içinde bekletilerek yapılmalıdır. Sterilizasyon sonrasında saç örnekleri 4-5 defa steril distile sudan geçirilir ve havada kurutulur. Otoklavda sterilizasyon da yapılabilir, ancak keratin yapısında bozulmalara yol açabileceği için tercih edilmemektedir.
- Örneklerin üst seviyesine gelecek kadar steril su ilave edilir. Steril su içine antiyotik (örneğin, kloramfenikol %1) ilave edilebilir.
- Oda ısısında (20-28° C) 4-6 hafta süre ile inkübasyon sürdürülür.
- Saç örneklerinin üzerinde miçelyum varlığı göz ile (uygunsa stereobioküler mikroskop yardımı ile) periyodik olarak incelenir.
- Üremenin olduğu yerden steril penset ile alınan mantarlı saç örneği Sabouraud'un glukozlu dektroz agar besiyerine pasajlanır. Hedef alınan grup dermatofitler ise besiyeri içerisinde en az %0.05-2 sikloheksimit ilave edilmelidir.

Dermatofitlerin farklı keratin yapılarına afinitelerinden dolayı insan saçı yerine farklı keratin kaynakları da kullanılabilir (21). En sık olarak tavuk tüyü, at yelesi, koyun yünü, kirpi diken, kobay kılı veya farklı canlıların keratin yapılarını içeren karışım yöntemleri tanımlanmıştır (1).

Genel olarak dermatofitlerin de içinde bulunduğu keratinolitik mantarlar grubu saç tuzağı ile yakalanabilmektedir. Keratinolitik tanımı keratini yıkan enzim olan keratinaz varlığını göstermektedir. Ancak bazı raporlar keratinolitik aktivite gösteriminin gerçek keratinaz olmadığını, keratin yıkımının öncelikli olarak proteinazlarla bağlı olduğunu belirtmektedir. Bu sorun keratinolitik mantarlarda olmayan sulfitolizisin varlığının gösterimi ile açıklanmaktadır. Keratin içinde bulunan dermatofitlerin doğal kaynaklarının (sistin, sistein, glutatyon, sisteik sistinsülfonik asit vb.) disülfid bağlantıları keratinofilik mantarlar tarafından parçalanabilmektedir. Farklı taksonomik ve ekolojik gruplar içinde sulfitoliz yapan, çevresel çalışmalarda çok sıklıkla karşılaşılan 30 nonkeratinofilik mantar varlığı belirtilmektedir (2, 22). Bu keratinofilik mantarların saptanmasında ve keratinolitik aktivitelerinin ayırımında mantarın morfolojik değerlendirimi ve biyokimyasal aktivite ölçümü yer alır. Sikloheksimit içeren besiyerinde üreyen mantarların keratinolitik aktivitesi (dermatofitler dahil) tanımlama için

kullanılabilir. Keratin azur boyasının indirgenmesi ve kıl delme deneyi dermatofitlerin keratinolitik aktivitelerinin ortaya konmasında kullanılan yöntemlerdir (2). Çevresel ortamlardan dermatofit izolasyonu yapılması esnasında dermatofitler dışında kontaminant küflerin üremesi keratin yıkım ürünleri varlığında üreyebilen küflerin olması ve düşük oranda sikloheksimit içeren besiyerlerinde kısmi üreyebilmeleri izolasyonda zorluklar yaratmaktadır. Bu sulfitoliz de yapabilen nondermatofitik filamentöz keratinofilik mantarlar sıklıkla bitki patojenleri olmakla birlikte, aralarında insan patojeni olanları da vardır. Bu grup içinde en sık *Chrysosporium*, *Fusarium*, *Aspergillus*, *Scopuloriopsis*, *Curvularia*, *Alternea*, *Geotrichium*, *Onychocola*, *Microascus*, *Aphanoascus*, *Chaetomium*, *Nattrassia*, *Scytalidium*, *Ctenomyces*, *Gymnoascus*, *Phoma*, *Auxarthron* ve *Hortaea* cinsleri rastlanmaktadır (1, 23). Sikloheksimit oranının artırılması ile bu saprofitik küflerin çoğunun üremesi baskılansa da primer dermatofit izolasyonu güçleşmektedir. Bu nedenle farklı besiyerlerine aynı ortamdan pasaj yapılabilmektedir.

Yapılan çevresel çalışmaların raporlanmasında genel eğilim dermatofitler ile birlikte dermatofitlerin ekolojine benzer, sikloheksimide dirençli ancak saprofitik patojen kabul edilen mantarları birlikte rapor etmektedir. Bu gruplar çoğunlukla seksüel ve aseksüel formları (*Chrysosporium*, *Aphanoascus*, *Auxarthron*, *Ctenomyces*, *Arthroderma*, *Malbranchea* vb.) içermektedir. Ülkemizde araştırılabilen literatürde çevresel dermatofitik florasını araştıran çalışmalar bulunamamakla birlikte, çalışmalara yan veri olarak bilgi sağlayan çevresel dermatofit izolasyonlarının yapıldığı görülmektedir (24-27). Ülkemizin farklı ortamlarında ve risk grubu olduğu düşünülen çevresel koşullarda dermatofitik florasının incelenmesi gerekmektedir.

Kaynaklar

1. Simpanya MF. Dermatophytes: Their taxonomy, ecology and pathogenity. In: Kushwaha RKS, Guarro J, eds. *Biology of Dermatophytes and Other Keratinophilic Fungi*. Rev Iberoam Micol (Bilbao) 2000: 1-12.
2. Sharma R, Rajak RC. Keratinophilic fungi: Nature's keratin degrading machines! *Resonance* 2003; 8: 28-40.
3. Mercantini R, Marsella R, Prignano G, et al. Isolation of keratinophilic fungi from the dust of ferry boats and trains in Italy. *Mycoses* 1989; 32: 590-594.
4. Ali-Shtayeh MS, Khaleel TKM, Jamous RM. Ecology of dermatophytes and other keratinophilic fungi in swimming pools and polluted and unpolluted streams. *Mycopathologia* 2003; 156: 193-205.
5. Vidyasagar GM, Hosmani N, SHIVkumar D. Keratinophilic fungi isolated from hospital dust and soils of public places at Gulbarga, India. *Mycopathologia* 2005; 159: 13-21.
6. Ali-Shtayeh MS. Keratinophilic fungi of school playgrounds in the Nablus area, West Bank of Jordan. *Mycopathologia* 1989; 106: 103-108.
7. Filipello Marchisio, V. Keratinolytic and keratinophilic fungi of children's sandpits in the city of Turin. *Mycopathologia* 1986; 94: 163-172.
8. Ramesh VM, Hilda A. Incidence of keratinophilic fungi in the soil of primary schools and public parks of Madras City, India. *Mycopathologia* 1998; 143: 139-145.
9. Ulfing K. The occurrence of keratinolytic fungi in waste and waste-contaminated habitats. In: Kushwaha RKS, Guarro J, eds. *Biology of Dermatophytes and Other Keratinophilic Fungi*. Rev Iberoam Micol (Bilbao) 2000: 44-50.
10. Ali-Shtayeh MS, Jamous RMF. Keratinophilic fungi and related dermatophytes in polluted soil and water habitats. In: Kushwaha RKS, Guarro J, eds. *Biology of Dermatophytes and Other Keratinophilic Fungi*. Rev Iberoam Micol (Bilbao) 2000: 51-59.
11. Wawrzkiwicz K, Ziolkowska G, Wawrzkiwicz J. *In vitro* biodegradation of hair from different animal species by *Microsporium canis*. *Int Biodeter Biodegr* 1997; 39: 15-25.
12. Abdel-Gawad KM. Mycological and some physiological studies of keratinophilic and other moulds associated with sheep wool. *Microbiol Res* 1997; 152: 181-188.
13. Guzman-Chavez RE, Segundo-Zaragoza C, Cervantes-Olivares RA, Tapia-Perez G. Presence of keratinophilic fungi with special reference to dermatophytes on the haircoat of dogs and cats in Mexico and Nezahualcoyotl cities. *Rev Latinoam Microbiol* 2000; 42: 41-44.

14. Dixon DM, Shadomy HJ, Shadomy S. Dematiaceous fungal pathogens isolated from nature. *Mycopathologia* 1980; 70: 153-161.
15. Kuehn HH, Orr GF. Tolerance of certain fungi to actidione and its use in isolation of Gymnoascaceae. *Sabouraudia* 1962; 1: 220-229.
16. Vanbreuseghem R. Technique biologique pour l'isolement des dermatophytes du sol. *Annls Soc Belge Méd Trop* 1952; 32: 173-177.
17. Orr GF. Keratinophilic fungi isolated from by a modified hair bait technique. *Sabouraudia* 1969; 7: 129-134.
18. Benedek T. Fragmenta mycologica. I. Some historical remarks on the development of 'hairbaiting' of Toma-Karling- Vanbreuseghem (The Tokava-hair baiting method). *Mycopathol Mycol Appl* 1962; 16: 104-106.
19. Marchisio VF. Keratinophilic fungi: Their role in nature and degradation of keratinophilic substrates. In: Kushwaha RKS, Guarro J, eds. *Biology of Dermatophytes and Other Keratinophilic Fungi*. Rev Iberoam Micol (Bilbao) 2000: 86-92.
20. Bakerspigel A. Soil as a storage medium for fungi. *Mycologia* 1953; 45: 596-604.
21. Otcenasek M. Ecology of the dermatophytes. *Mycopathologia* 1978; 65:67-72.
22. Kunert J. Physiology of keratinophilic fungi. Keratinophilic fungi: Their role in nature and degradation of keratinophilic substrates. In: Kushwaha RKS, Guarro J, eds. *Biology of Dermatophytes and Other Keratinophilic Fungi*. Rev Iberoam Micol (Bilbao) 2000: 77-85.
23. Gugnani HC. Nondermatophytic filamentous keratinophilic fungi and their role in human infection. In: Kushwaha RKS, Guarro J, eds. *Biology of Dermatophytes and Other Keratinophilic Fungi*. Bilbao; 2000: 109-114.
24. Tümbay E, Hilmiöğlu-Polat S, İnci R, Metin DY. *Türkiye Klinik Mikoloji ve Mantar Hastalıkları Kaynakçası, 1896-2004 (Yerli Yayınlar)*. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayını No: 53. İzmir: Meta Basım, 2006.
25. Yücel A, Kantarcioğlu S. Parşömen eserlerin *Trichophyton verrucosum*'un bulaş kaynağı olabileceğinin gösterilmesi. *Cerrahpaşa Tıp Fak Derg* 1998; 29: 151-155.
26. Yücel A, Kantarcioğlu AS. *Müzelerdeki Eserlerin Bozulmasında Mikropların Rolü*. Kültür Bakanlığı Başvuru Eserleri Dizisi 47. Ankara: Türk Tarih Kurumu Basımevi, 1997.
27. Göksüğüür N, Karabay O, Koçoğlu E. Mycological flora of the Hammams, traditional Turkish bath. *Mycoses* 2006; 49: 411-414.