

YENİDOĞANLARDAN İZOLE EDİLEN *MALASSEZIA* SUŞLARININ KETOKONAZOL, İTRAKONAZOL VE TERBİNAFİNE İN VİTRO DUYARLILIĞI*

IN VITRO ACTIVITY OF KETOCONAZOLE, ITRACONAZOLE AND TERBINAFINE
AGAINST *MALASSEZIA* STRAINS ISOLATED FROM NEONATES

Banu SANCAK**, **Meltem AYHAN*****
Ayşen KARADUMAN***, **Sevtap ARIKAN****

ÖZET: *Malassezia*, normal deri florasında bulunabilen, çeşitli deri hastalıklarına ve sistemik enfeksiyonlara yol açabilen maya benzeri bir mantardır. Bugün için *Malassezia* türleri için uygulanacak in vitro duyarlılık testi yöntemi ve direnç sınır değerleri henüz kesinlik kazanmamıştır. Bu çalışmada, 21 yenidoğanın yanak ve/veya skalp sürüntü ve/veya sefalik püstül örneklerinden izole edilen 30 *Malassezia* izolatının (22 *Malassezia furfur/dermatis*, 8 *M.japonica*) ketokonazol, itrakonazol ve terbinafine in vitro duyarlılığı araştırılmıştır. Tür düzeyinde tanımlama, Sabouraud dekstroz agarda üreme, Tween asimilasyonu ve katalaz testi sonuçlarına göre yapılmıştır. Antifungal ilaçlara in vitro duyarlılık, modifiye Dixon agar (MDA) kullanılarak agar dilüsyon yöntemiyle araştırılmış, plaklar 32°C'de inkübe edilmiştir. Minimum inhibitör konsantrasyon (MİK, µg/ml) değerleri, yeterli üreme elde edilen suşlarda 48 saat sonunda değerlendirilmiş, yeterli üreme elde edilemeyen suşlarda inkübasyon 7 güne kadar uzatılmıştır. Tüm ilaçlar için üremeyi tam inhibe eden en düşük konsantrasyon MİK değeri olarak belirlenmiştir. En iyi in vitro aktivite gösteren ilacın itrakonazol olduğu, bunu sırasıyla ketokonazol ve terbinafinin izlediği görülmüştür. Terbinafinin test edilen *Malassezia* suşlarının yaklaşık yarısına karşı in vitro aktivitesinin yeterli düzeyde olmadığı saptanmıştır. Ketokonazol ve terbinafinin in vitro aktivitelerinin suşa göre değişebileceği, itrakonazolün in vitro aktivitesinin ise tüm suşlar için birbirine benzer olduğu gözlenmiştir. Bu sonuçların klinik öneminin anlaşılabilmesi için çok sayıda suşun test edildiği ve in vitro ile in vivo korelasyonu araştıran çalışmalara gereksinim vardır.

Anahtar sözcükler: *Malassezia* türleri, antifungal duyarlılık.

ABSTRACT: *Malassezia*, a yeast-like fungus found in normal skin flora is known to be associated with various skin diseases and systemic infections. There is yet no standardized in vitro susceptibility testing method and minimum inhibitory concentration (MIC) breakpoints for *Malassezia* species. In this study, we investigated the in vitro activity of ketoconazole, itraconazole and terbinafine against 30 *Malassezia* strains (22 *Malassezia furfur/dermatis*, 8 *M.japonica*) isolated from

* Bu çalışma, XXXI. Türk Mikrobiyoloji Kongresi'nde (19-23 Eylül 2004, Kuşadası) poster olarak sunulmuştur.

** Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Klinik Mikrobiyoloji ve Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

*** Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Dermatoloji Anabilim Dalı, Ankara.

cheek and/or scalp swabs and/or cephalic pustules of 21 neonates. The isolates were identified to species level on the basis of growth on Sabouraud dextrose agar, assimilation of Tween compounds and catalase reaction. The antifungal susceptibility tests were performed by agar dilution method using modified Dixon agar (MDA) and the agar dilution plates were incubated at 32°C. For the isolates which exhibited sufficient growth, MICs were read at 48 hours, for the remaining slow-growing isolates, MIC readings were done on 7th day. For all drugs tested, the lowest concentration that provided complete inhibition of growth visually was interpreted as the MIC ($\mu\text{g/ml}$) value. Itraconazole was the most active drug in vitro against *Malassezia* species, followed by ketoconazole and terbinafine in rank order. In vitro activity of terbinafine was poor for half of the *Malassezia* strains tested. Variations in activity against individual *Malassezia* strains were detected for ketoconazole and terbinafine, while in vitro activity of itraconazole was similar for all strains tested. In order to validate the clinical significance of these results, further in vitro and in vivo correlation studies are needed.

Key words: Malassezia species, antifungal susceptibility.

GİRİŞ

Malassezia, normal deri florasında bulunabilmesinin yanı sıra pitriyazis versikolor, folikülit, seboreik dermatit gibi dermatozlara ve sistemik enfeksiyonlara yol açabilen maya benzeri bir mantardır¹. *Malassezia*'nın etken olduğu düşünülen enfeksiyonlardan biri de neonatal sefalik püstülozdur^{2,3}.

Malassezia türlerinin saptanmasında moleküler yöntemlerin kullanılmaya başlanmasıyla, son yıllarda *M.dermatis*, *M.japonica* ve son olarak da *M.yamatoensis* olmak üzere yeni *Malassezia* türleri tanımlanmıştır. Bugün bu türlerin yanı sıra, *M.globosa*, *M.restricta*, *M.obtusa*, *M.slooffiae*, *M.furfur*, *M.sympodialis* ve *M.pachydermatis* olmak üzere toplam 10 *Malassezia* türü olduğu bilinmektedir⁴⁻⁹.

Malassezia türlerinin antifungal ilaçlara duyarlılığını belirlemek amacıyla kullanılacak in vitro duyarlılık testi yöntemi ve direnç sınır değerleri henüz kesinlik kazanmamıştır. Bugüne kadar yapılan çalışmalarda *Malassezia* suşlarının in vitro duyarlılığının belirlenmesinde mikrodilüsyon, agar dilüsyon ve E-test gibi farklı yöntemler denenmiştir. Bu yöntemlerde modifiye Dixon agar (MDA), üreli besiyeri, Leeming-Notman (LN) besiyeri, Alamar mavili LN besiyeri, yağ asitli RPMI 1640 besiyeri olmak üzere bir çok farklı besiyeri kullanılmıştır¹⁰⁻¹⁵.

Bu çalışmada, 21 yenidoğanın yanak ve/veya skalp sürüntüsünden ve/veya sefalik püstül örneklerinden izole edilen 30 *Malassezia* izolatının (22 *M.furfur/dermatis*, 8 *M.japonica*) ketokonazol, itrakonazol ve terbinafine in vitro duyarlılığının araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

İzolatlar: Çalışmaya Ekim 2003-Ocak 2004 tarihleri arasında Zekai Tahir Burak Kadın Sağlığı ve Eğitim Hastanesinde miyadında doğan ve 24 saatini doldurmuş 104 sağlıklı yenidoğanın 21'inden izole edilen toplam 30 *Malassezia* suşu alındı. Bu bebeklerin 8'inin yanak, 4'ünün skalp, 3'ünün yanak ve skalp, 4'ünün püstül ve 2'sinin de püstül ve yanak örneğinde *Malassezia* saptandı.

Moleküler tiplendirme yapılamadığından, aynı hastanın farklı klinik örneklerinden izole edilen suşların farklı genotip olabileceği düşünülerek izole edilen tüm suşlar çalışmaya dahil edildi.

Tür Düzeyinde Tanımlama: Suşlar, Sabouraud dekstroz agarda (SDA) üreme, Tween asimilasyonu, katalaz testi ve 40°C'de üreme sonuçlarına göre tür düzeyinde tanımlandı^{6,8,16} (Tablo I). Tween asimilasyon testi için; otoklavlandıktan sonra 45°C'e soğutulan 19 cc SDA içine, test edilecek maya süspansiyonundan 1 ml karıştırılarak, elde edilen karışım petri kutusuna döküldü. Agar içine 3 mm çaplı 4 adet çukur açılarak her bir çukura sırasıyla 5'er µl Tween 20, 40, 60 ve 80 damlatıldı. Plaklar 32°C'de 1 hafta inkübe edilerek günlük olarak çukur etrafında üreme olup olmadığı kaydedildi. Katalaz testi için ise incelenen maya kolonisi, bir damla H₂O₂ ile karıştırıldı. Gaz kabarcığı görülmesi durumunda test pozitif olarak değerlendirildi. 40°C'de üremenin test edilmesi amacıyla da, Mc Farland 2 bulanıklığa ayarlanmış maya süspansiyonundan 10 µl damlatılan modifiye Dixon agar (MDA) besiyerleri, 40°C'de 48 saat inkübe edilerek üreme olup olmadığı değerlendirildi^{6,8,16}.

Tablo I: *Malassezia* Suşlarının Fenotipik Testler Kullanılarak Tanımlanması

	Tween				Koloni Morfolojisi	40°C'de Üreme	Katalaz Testi	SDA'da Üreme
	Asimilasyon	Reaksiyonu						
	20	40	60	80				
<i>M.furur/dermatis</i>	+	+	+	+	S (smooth)	+	+	-
<i>M.japonica</i>	-	+	+	-	R (rough)	-	+	-

Antifungal Duyarlılık Testleri: Suşların ketokonazol, itrakonazol ve terbinafine in vitro duyarlılığı, MDA kullanılarak agar dilüsyon yöntemiyle araştırıldı¹⁰. Bu amaçla, her bir ilaç için 16 ile 0.03 µg/ml arasında değişen seri çift kat ilaç dilüsyonlarını içeren MDA plakları hazırlandı. Test edilecek inokulumun yoğunluğu spektrofotometrik olarak 530 nm dalga boyunda %78-80 geçirgenlik olacak şekilde ayarlandıktan sonra, hazırlanan plaklara 10'ar µl (10⁴ cfu/damla) damlatıldı. Ekim yapılan plaklar 32°C'de inkübe edildi.

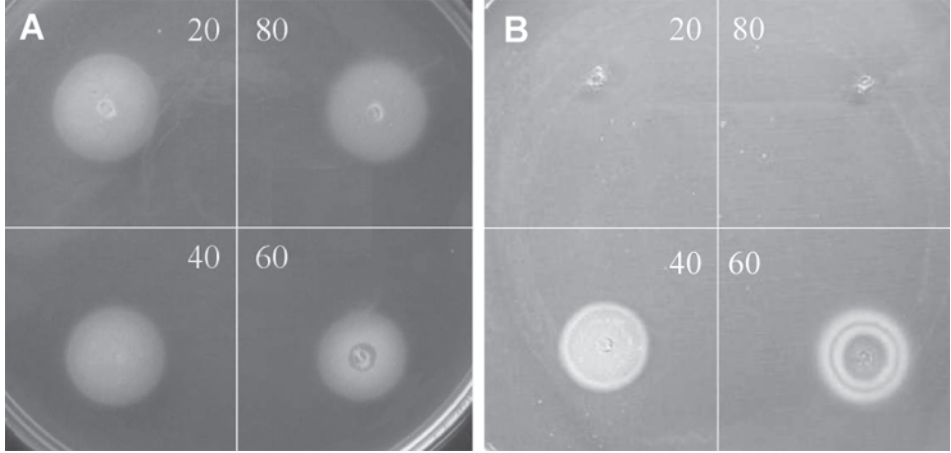
Sonuçların Değerlendirilmesi: Plaklardaki üremeler 7 gün boyunca günlük olarak kaydedildi. Minimum inhibitör konsantrasyon (MİK, µg/ml) değerleri, yeterli üreme elde edilen suşlarda 48 saat sonunda değerlendirildi. Yeterli üreme saptanamayan suşlarda ise inkübasyon 7 güne kadar uzatıldı. Tüm ilaçlar için üremeyi tam inhibe eden en düşük konsantrasyon MİK değeri olarak belirlendi. *Malassezia* türleri için her üç antifungal ilaç için de direnç sınır değerleri henüz kesinlik kazanmadığı için, sadece elde edilen MİK dağılımları saptandı.

B U L G U L A R

Çalışmaya alınan 30 *Malassezia* izolatının, 22'si *M.furur/dermatis*, 8'i *M.japonica* olarak tanımlanmıştır (Tablo I).

Tween asimilasyon reaksiyonlarına göre *Malassezia* suşlarının morfolojik görünüşleri Şekil 1'de verilmiştir.

Çalışmaya alınan *Malassezia* suşları için test edilen antifungal ilaçların in vitro duyarlılık sonuçları Tablo II'de gösterilmiştir.



Şekil 1: Tween asimilasyon reaksiyonlarına göre *Malassezia* suşlarının morfolojik görünüşleri. A: *M.furfur/dermatis*, B: *M.japonica*.

Tablo II: Ketokonazol, İtrakonazol ve Terbinafinin *Malassezia* Suşları İçin Saptanan MİK Değerleri

Suşlar (n)	MİK Değeri (µg/ml)		
	Ketokonazol	İtrakonazol	Terbinafin
<i>M.furfur/dermatis</i> (22)			
MİK ₅₀	1	0.125	16
MİK ₉₀	>16	0.25	>16
MİK aralığı	0.5->16	0.06-1	0.5->16
<i>M.japonica</i> (8)			
MİK ₅₀	–	–	–
MİK ₉₀	–	–	–
MİK aralığı	0.125-16	0.06-0.25	0.25-16

Sonuçlar incelendiğinde, itrakonazol MİK değerlerinin dar bir aralıkta dağılım gösterdiği, ketokonazol ve terbinafin MİK değerlerinin ise suşa göre farklılık gösterebildiği ve daha geniş bir aralıkta dağıldığı saptanmıştır. Her üç ilacın MİK değerlerinin türe göre dağılımı incelendiğinde, iki/üç tür arasında, test edilen üç ilaç için elde edilen MİK dağılımları açısından türe özgü farklılıklar gözlenmemiştir (Tablo III, IV, V).

Tablo III: Ketokonazol MİK Değerlerinin Suş Sayısına Göre Dağılımı

	MİK (µg/ml)									
	0.03	0.06	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	≥16
<i>M.furfur/dermatis</i>	-	-	-	-	10	1	7	-	1	3
<i>M.japonica</i>	-	-	1	1	1	1	3	-	-	1

Tablo IV: İtrakonazol MİK Değerlerinin Suş Sayısına Göre Dağılımı

	MİK (µg/ml)									
	0.03	0.06	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16
<i>M.furfur/dermatis</i>	-	5	10	6	-	1	-	-	-	-
<i>M.japonica</i>	-	5	2	1	-	-	-	-	-	-

Tablo V: Terbinafin MİK Değerlerinin Suş Sayısına Göre Dağılımı

	MİK (µg/ml)									
	0.03	0.06	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	≥16
<i>M.furfur/dermatis</i>	-	-	-	-	4	7	-	-	-	11
<i>M.japonica</i>	-	-	-	2	-	1	1	1	1	2

TARTIŞMA

Günümüzde mayaların in vitro antifungal duyarlılık testi için NCCLS tarafından önerilen mikrodilüsyon yöntemi, referans yöntem olarak birçok merkezde uygulanmaktadır¹⁷. Ancak bu yöntemde kullanılan RPMI-1640 besiyeri, *M.pachydermatis* dışında kalan ve üreme için lipidlere gereksinim duyan *Malassezia* türleri için uygun değildir. Bu nedenle *Malassezia* türleri için yapılan in vitro antifungal duyarlılık çalışmalarında MDA¹⁰, Leeming-Notman besiyeri¹¹⁻¹³, Tween 40 ve Tween 80 eklenmiş üreli besiyeri¹⁴ ve yağ asiti eklenmiş RPMI 1640 besiyeri¹⁵ gibi farklı besiyerleri denenmektedir.

Malassezia türleri için henüz standardize edilmiş bir in vitro antifungal duyarlılık yöntemi olmadığından, bu suşların in vitro antifungal ilaçlara duyarlılığını belirlemek amacıyla bugüne dek mikrodilüsyon¹²⁻¹⁴, agar dilüsyon^{10,11} ve E-test¹⁵ gibi değişik yöntemler de kullanılmıştır. *Malassezia* suşları için farklı ilaçlarla saptanan MİK değerlerinin okunmasında kullanılacak değer (endpoint) de kesinlik kazanmadığından, azol grubu ilaçlar için bazı çalışmalarda üremenin tam inhibe olduğu en düşük konsantrasyon (MİK-0) MİK değeri olarak kabul edilirken, diğerlerinde kontrole göre üremede belirgin azalma sağlayan konsantrasyon (MİK-2) MİK değeri olarak kabul edilmiştir. Dolayısıyla bu çalışmalardan elde edilen MİK değerlerinin birbiriyle kıyaslanması zorluklar arz etmektedir.

Malassezia türlerine karşı değişik antifungal ilaçların in vitro aktiviteleri daha önce birçok çalışmada araştırılmıştır. Bizim çalışmamızda ve yapılan diğer çalışmalarda *Malassezia* cinsinde tür düzeyinde MİK farklılıkları gözlenmiştir. Bizim çalışmamızda izole edilen *Malassezia* türleri fenotipik olarak *M.furfur/dermatis* ve *M.japonica* olarak tanımlanmıştır. *M.dermatis* 2002 yılında, *M.japonica* 2003 yılında

tanımlanan yeni türlerdir. Bu nedenle *M.dermatis* duyarlılık çalışmaları oldukça sınırlı sayıda iken *M.japonica* ile yapılan in vitro duyarlılık çalışması henüz hiç bulunmamaktadır. Dolayısıyla sadece *M.furfur* için yapılan duyarlılık testleri sonuçları bizim çalışmamızla karşılaştırılabilir niteliktedir.

Yapılan çalışmalarda *M.furfur* için farklı antifungal ilaçlar için elde edilen MİK değerleri de birbirinden farklıdır. Çalışmamızda saptanan itrakonazol MİK değerleri, diğer çalışmalarda elde edilen MİK değerleri ile benzer olarak bulunmuştur^{11,13,15}. Diğer taraftan, bizim çalışmamızda belirlenen ketokonazol MİK değerleri (0.5- ≥16 µg/ml), Gupta ve arkadaşları¹¹ (≤0.03-0.125 µg/ml), Garau ve arkadaşları¹³ (≤0.03 µg/ml) ve Velegraki ve arkadaşları¹⁵'nin (0.03-1 µg/ml) bildirdiği değerlerden oldukça yüksektir. Bunun nedeni, çalışmalarda kullanılan farklı inokulum yoğunlukları ve farklı değerlendirme kriterleri olabilir. Gupta ve arkadaşları¹¹'nin çalışmasında agar dilüsyon yöntemi kullanılmış, 1x10⁴ cfu/ml'ye ayarlanan inokulumden besiyerine 50 µl damlatılmış ve %80 inhibisyon sağlayan konsantrasyon MİK değeri olarak kabul edilmiştir. Garau ve arkadaşları¹³ LN besiyerini ve mikrodilüsyon yöntemini kullanmış, 1-5x10⁴ cfu/ml olarak hazırlanan inokulumden 50 µl damlatarak alamar mavisini ekledikten sonra meydana gelen renk değişimini önleyen en düşük ilaç konsantrasyonunu MİK değeri olarak değerlendirmişlerdir. Velegraki arkadaşları¹⁵ ise yağ asitleri eklenmiş RPMI besiyeri kullanarak NCCLS'in mayalar için önerdiği protokolü uygulamışlar, üremeyi %90 inhibe eden konsantrasyonu MİK değeri olarak kabul etmişlerdir. Bizim çalışmamızda agar dilüsyon yöntemi kullanılarak 1x10⁶ cfu/ml olacak şekilde hazırlanan inokulumlerden MDA plaklarına 10'ar µl damlatılmış, üremenin tam inhibe olduğu konsantrasyon MİK değeri olarak kabul edilmiştir.

Bugüne kadar yapılan çalışmalarda elde edilen terbinafin MİK değerleri ise önemli ölçüde farklılıklar göstermektedir. Velegraki ve arkadaşları¹⁵'nin yaptıkları çalışmada *M.furfur* ve *dermatitis* için elde edilen terbinafin MİK₉₀ değerleri 0.125 ve 0.5 iken bizim çalışmamızda MİK₉₀ değeri >16 olarak bulunmuştur. Uchida ve arkadaşları¹⁰'nin yaptıkları çalışmada elde edilen terbinafin MİK değerleri (MİK₉₀:16) ise bizim elde ettiğimiz değerlere paraleldir. Bu çalışmada kullanılan yöntem ve değerlendirme kriterleri de bizim çalışmamızla benzerdir. Gupta ve arkadaşları¹¹ da benzer şekilde *M.furfur* için terbinafin MİK₉₀ değerini 16 olarak bulmuşlardır.

Bizim çalışmamızda test edilen tüm ilaçlar için üremenin tam inhibe olduğu en düşük konsantrasyon MİK değeri olarak kabul edilmiştir. Buna göre test edilen *Malassezia* suşlarına karşı en iyi in vitro aktivite gösteren ilacın itrakonazol olduğu, bunu sırasıyla ketokonazol ve terbinafinin izlediği görülmüştür. Ketokonazol ve terbinafinin in vitro aktivitelerinin suşa göre değişebileceği, itrakonazolün in vitro aktivitesinin ise tüm suşlar için birbirine benzer olduğu gözlenmiştir. Bu özelliğin, etken suşun izole edilemediği olgularda ampirik tedavi yönünden itrakonazolü avantajlı kılabileceği düşünülmüştür. Terbinafinin test edilen *Malassezia* suşlarının yaklaşık yarısına karşı in vitro aktivitesinin yeterli düzeyde olmadığı saptanmıştır.

Günümüzde *Candida* ile yapılan moleküler çalışmalarda, aynı hastadan izole edilen suşların farklı genotipe sahip olabilecekleri gösterilmiştir^{18,19}. Bu nedenle çalışmamızda, aynı hastanın farklı klinik örneklerinden izole edilen *Malassezia*

suşlarının farklı genotipe sahip olabilecekleri göz önüne alınarak izole edilen tüm suşlar in vitro duyarlılık testine alınmıştır. Aynı hastadan izole edilen suşların genotiplerinin belirlenebilmesi ve tür düzeyinde kesin tanımlamalarının yapılabilmesi için ise moleküler yöntemlerin uygulanması gerekmektedir.

Sonuç olarak, bu çalışmada elde edilen in vitro verilerin klinik öneminin anlaşılabilmesi için çok sayıda suşun test edildiği ve in vitro ile in vivo korelasyonu araştıran çalışmalara gereksinim vardır.

KAYNAKLAR

1. Gueho E, Boekhout T, Ashbee HR, Guillot J, van Belkum A, Faergemann J: The role of *Malassezia* species in the ecology of human skin and as pathogens. *Med Mycol* 1998, 36 (Suppl 1): 220-229.
2. Bernier V, Weill FX, Hirigoyen V, et al: Skin colonization of *Malassezia* species in neonates. *Arch Dermatol* 2002, 138: 215-218.
3. Erchiga VC, Florencio VD: *Malassezia* species in skin diseases. *Curr Opin Infect Dis* 2002, 15: 133-142.
4. Guillot J, Gueho E: The diversity of *Malassezia* yeast confirmed by rRNA sequence and nuclear DNA comparisons. *Antonie van Leeuwenhoek* 1996, 67: 297-314.
5. Gueho E, Midgley G, Guillot J: The genus *Malassezia* with description of four new species. *Antonie van Leeuwenhoek* 1996, 69: 337-355.
6. Guillot J, Gueho E, Lesourd M, et al: Identification of *Malassezia* species. *J Mycol Med* 1996, 6: 103-110.
7. Sugita T, Takashima M, Shinoda T, et al: New yeast species, *Malassezia dermatis*, isolated from patients with atopic dermatitis. *J Clin Microbiol* 2002, 40: 1363-1367.
8. Sugita T, Takashima M, Kodama M, et al: Description of a new yeast species, *Malassezia japonica*, and its detection in patients with atopic dermatitis and healthy subjects. *J Clin Microbiol* 2003, 41: 4695-4699.
9. Sugita T, Tajima M, Takashima M, et al: A new yeast, *M.yamatoensis*, isolated from a patient with seborrheic dermatitis, and its distribution in patients and healthy subjects. *Microbiol Immunol* 2004, 48: 579-583.
10. Uchida K, Nishiyama Y, Tanaka T, Yamaguchi H: In vitro activity of novel imidazole antifungal agent NND-502 against *Malassezia* species. *Int J Antimicrob Agents* 2003, 21: 234-238.
11. Gupta AK, Kohli Y, Li A, Faergemann J, Summerbell RC: In vitro susceptibility of the seven *Malassezia* species to ketokonazole, voriconazole, itraconazole and terbinafine. *Br J Dermatol* 2000, 142: 758-765.
12. Schmidt A, Rühl-Hörster B: In vitro susceptibilities of *Malassezia furfur* against azole compounds. *Mycoses* 1996, 39: 309-312.
13. Garau M, Pereino Jr M, del Palacio A: In vitro susceptibilities of *Malassezia* species to a new triazole, albaconazole (UR-9825), and other antifungal compounds. *Antimicrobial Agents Chemother* 2003, 47: 2342-2344.
14. Nakamura A, Kano A, Murai T, Watabane S, Hasegawa A: Susceptibility testing of *Malassezia* species using the urea broth microdilution method. *Antimicrob Agents Chemother* 2000, 44: 2185-2186.
15. Velegraki A, Alexopoulos EC, Kritikou S, Gaitanis G: Use of fatty acid RPMI 1640 media for testing susceptibilities of eight *Malassezia* species to a new triazole posaconazole and to six established antifungal agents by a modified NCCLS M27-A2 microdilution method and Etest. *J Clin Microbiol* 2004, 42: 3589-3593.
16. Nakabayashi A, Sei Y, Guillot J: Identification of *Malassezia* species isolated from patients with seborrheic dermatitis, atopic dermatitis, pityriasis versicolor and normal subjects. *Med Mycol* 2000, 38: 337-341.

17. National Committee for Clinical Laboratory Standards: Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved Standard, NCCLS Document M27-A2. 2002, 2nd ed. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA.
18. Sancak B, Rex JH, Chen E, Marr K: Comparison of PCR- and *Hinf*I restriction endonuclease-based methods for typing of *Candida krusei* isolates. J Clin Microbiol 2004, 42: 5889-5891.
19. Pizzo G, Giammanco GM, Pecorella S, Campisi G, Mammina C, D'Angelo M: Biotypes and randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) profiles of subgingival *Candida albicans* isolates in HIV infection. New Microbiol 2005, 28: 75-82.