

## Değişik içeriklere sahip Castellani solüsyonunun farklı mikroorganizmalar üzerine in vitro etkinliği

### *In vitro effectiveness of Castellani solution including various ingredients against different microorganisms*

Şükran Çopur, Hanni Turan, Müge Demirbilek, Ebru Evren, J. Sedef Göçmen

#### ÖZET

**Amaç:** Dış kulak yolunun nemli bir ortam olması bakteri ve mantarların üremesini kolaylaştırır. Bu bölgede *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Aspergillus spp.* ve *Candida albicans* 'a bağlı enflamasyon ve enfeksiyonlar gelişir. Klasik Castellani solüsyonu borik asit, fenol, fuksin, rezorsinol, aseton, alkol içeriğiyle klinikte, dış kulak yolu mantar ve bakteri enfeksiyonlarında, yüzeysel dermatofitozlarda, ekzematöz dermatitlerde kullanılmaktadır.

Bu çalışmanın amacı klasik Castellani solüsyonunun ve farklı formülasyonlarının, maya ve bakteri standart suşları üzerine farklı dilüsyonlarda in vitro etkinliğinin araştırılmasıdır.

**Yöntemler:** Çalışmaya *C. albicans* ATCC 10231, *C. krusei* ATCC 6258, *C. dubliniensis* CD 36, *C. guilliermondii* ATCC 6260, *C. parapsilosis* ATCC 22019, *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853, MRSA ATCC 43300, *S. aureus* ATCC 25923, *S. epidermidis* ATCC 12228 standart suşları dahil edilmiştir. Her mikroorganizma ve Castellani formülasyonu için sıvı mikrodilüsyon yöntemi kullanılmıştır. Testler en az iki kez tekrarlanmıştır.

**Bulgular:** Bakterilere ve mayalara karşı etkin olan inhibitör konsantrasyon sırasıyla klasik Castellani solüsyonunda 1/64, 1/256, fuksin içermeyen solüsyonda 1/32 - 1/64, borik asitsiz solüsyonda 1/32- 1/128 ve rezorsinolsüz solüsyonda 1/64-1/128 sulandırım aralıklarında etkili bulunmuştur.

**Sonuç:** Klasik Castellani solüsyonu ve ayrı dilüsyonlardaki farklı formülasyonlarının özellikle farklı hasta popülasyonları için etkili antimikrobiyal ajanlar olabileceğini düşünmekteyiz.

**Anahtar kelimeler:** Castellani solüsyonu, antimikrobiyal etkinlik, in vitro

#### ABSTRACT

**Objective:** As the external auditory canal is a moisture area, it facilitates the growth of bacteria and fungi. Infections and inflammation due to *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Aspergillus spp.* and *Candida albicans* can develop in this area. Classical Castellani solution including boric acid, fenol, fuchsin, resorcinol, acetone, and alcohol is used for external ear tract infections due to fungi and bacteria, and also for the superficial dermatophytoses, and eczematous dermatitis of the external ear tract infections.

The purpose of this study is to investigate of the in vitro effectiveness of classical Castellani solution and its different formulations with different dilutions against the standard yeast and bacteria strains.

**Methods:** *C. albicans* ATCC 10231, *C. krusei* ATCC 6258, *C. dubliniensis* CD 36, *C. guilliermondii* ATCC 6260, *C. parapsilosis* ATCC22019, *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853, MRSA ATCC 43300, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, and *S. epidermidis* ATCC 12228 strains were included in the study. Broth microdilution method was used for each microorganism and Castellani formulation. The tests are repeated at least twice.

**Results:** The inhibitory concentration of classical Castellani solution against bacteria and fungi is 1/64-1/256, 1/32-1/64 for fuchsin free solution, 1/32-1/128 for boric acid-free solution and, 1/64-1/128 for resorcinol-free solution.

**Conclusions:** As a conclusion we think that the classical Castellani solution and its different formulations at various dilutions may be effective antimicrobial agents for different patient populations. *J Clin Exp Invest* 2013; 4 (3): 302-305

**Key words:** Castellani solution, antimicrobial activity, in vitro

## GİRİŞ

Mikrobiyoloji laboratuvarlarında boya maddeleri mikroorganizmaların morfolojilerini belirlemek, bakteriyolojik besiyerlerinde inhibitör etki göstermek ya da indikatör olarak kullanılmaktadır. Kristal viyole, brillant yeşili, malaşit yeşili, fuksin, kongo kırmızısı gibi boya maddelerinin inhibitör etkisiyle bazı mikroorganizmaların üremesini inhibe etme özelliklerinden dolayı antimikrobiyal etki gösterdikleri bilinmektedir. Dış kulak yolu bakteri ve mantarların üremesi için uygun bir ortama sahiptir. Dış kulak yolunda özellikle *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Aspergillus spp.* ve *Candida albicans*'a bağlı enfeksiyonlara sık rastlanmaktadır [1,2].

Klasik Castellani solüsyonu borik asit, fenol, fuksin, rezorsinol, aseton, alkol ve distile su içermektedir. Bu solüsyon, klinikte özellikle mantar ve bakterilerin etken olduğu dış kulak yolu enfeksiyonlarında, yüzeysel dermatofitozlarda, ekzematöz dermatitlerde kullanılmaktadır [3-6].

Castellani solüsyonunun içerdiği maddelerin değişik etkileri bulunmaktadır. Borik asit antiseptik etkinliğe sahiptir. Fenol, düşük konsantrasyonlarda sinir uçlarını etkileyerek antipruritik özellik gösteren fakat yüksek konsantrasyonlarda kimyasal dermabrazyon amacı ile plastik ve rekonstrüktif cerrahide de kullanılabilen kostik bir ajandır [7].

Fuksin, anestetik, fungisidal ve özellikle gram pozitif bakterilere karşı etkilidir ve epitelizeasyonu uyarmaktadır. Alkol ve aseton soğutucu etkinliğe sahiptir ve çözücü olarak kullanılmaktadır. Rezorsinol antipruritik, keratolitik, antimikotik ve anti ekzematöz özellik taşımaktadır. Ciltte iritasyon, kontakt dermatit, cildin boyanması ve nefrotoksisite gibi yan etkilere sahiptir [3,5].

Castellani solüsyonu bakteriyel veya fungal enfeksiyonlarda etkili olmasına rağmen yan etkileri solüsyonun kullanımını kısıtlamaktadır. Fenol ve borik asit özellikle çocuklarda toksik etkiye sahiptir. Nadir de olsa rezorsinole bağlı kontakt dermatit olguları görülmektedir. Solüsyonun içerisinde bulunan fuksinin cildi ve kıyafetleri boyamasının yanı sıra karsinogenez yönünden riskli olduğu da bildirilmektedir [8].

Bu çalışmada klasik Castellani solüsyonunun ve farklı formülasyonlarının, maya ve bakteri standart suşları üzerine farklı dilüsyonlarda etkinliğinin in vitro araştırılması amaçlanmıştır.

## YÖNTEMLER

Çalışmaya *C. albicans* ATCC 10231, *C. krusei* ATCC 6258, *C. dubliniensis* CD 36, *C. guilliermon-*

*dii* ATCC 6260, *C. parapsilosis* ATCC 22019, *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853, Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) ATCC 43300, *S. aureus* ATCC 25923, *S. epidermidis* ATCC 12228 standart suşları dahil edilmiştir.

Klasik Castellani Solüsyonu 0,08 gr borik asit, 0,4 gr fenol, 0,04 gr fuksin, 0,8 gr rezorsinol, 0,4 ml aseton, 0,85 ml alkol ve 10 ml distile su içermektedir. Çalışmada klasik Castellani solüsyonu ve yanı sıra; fuksinsiz, borik asitsiz ve rezorsinolsüz modifiye formları kullanılmıştır.

Her mikroorganizma ve her boya formülasyonu en az ikişer kez tekrarlanacak şekilde 96 kuyucuklu mikrolaplarda mikrodilüsyon yöntemi ile çalışılmıştır.

Maya süspansiyonu için RPMI 1640 sıvı besiyeri (Sigma-Aldrich, ABD), bakteriler için Mueller Hinton II broth (BD, ABD) besiyeri kullanılmıştır. İki kat seri dilüsyonları hazırlanan solüsyonlar üzerine mikroorganizma süspansiyonları 1x10<sup>5</sup>CFU/mL olacak şekilde aktarılmış, 37°C'de 24 saat inkübasyon sonrası minimal inhibitör dilüsyon (MİD) değerleri gözle değerlendirilmiştir. Minimal mikrobisidal dilüsyon (MMD) ise üreme görülmeyen kuyucuklardan Mueller Hinton Agar (BD, ABD) ve Sabouraud Dextroz Agara (BD, ABD) yapılan spot ekimler ile belirlenmiştir.

## BULGULAR

Klasik ve farklı formülasyonlardaki Castellani solüsyonlarının test edilen mikroorganizmalar üzerindeki in vitro etkinlikleri Tablo 1'de görülmektedir.

Klasik Castellani solüsyonunun tüm mikroorganizmalara karşı etkili olduğu görülmüştür. Bakterilere karşı 64 kat sulandırmada etkili iken mayalarda bu etkinlik 256 kat sulandırmada da tespit edilmiştir. Bakterisidal/fungisidal etkinlik ile bakteriyostatik/fungistatik etkinlik arasında bir sulandırmadan fazla fark görülmemiştir.

Fuksin içermeyen solüsyonda bakterilere karşı 32 katlık sulandırmada etkili bulunurken mayalara karşı 64 katlık dilüsyonda etkili olduğu bulunmuştur. Fuksin içermeyen solüsyon, klasik Castellani solüsyonu ile inhibitör ve mikrobisidal etkinlik açısından karşılaştırıldığı zaman *E.coli*, *P.aeruginosa*, *C.dubliniensis* hariç diğer mikroorganizmalara karşı etkinlik daha yüksek MİD değerlerinde tespit edilmiştir.

Borik asitsiz solüsyonda ise bakterilere karşı etkili olan konsantrasyon 1/32 iken mayalarda bu etkinlik 1/128 olarak tespit edilmiştir. Borik asitsiz solüsyonun inhibitör ve mikrobisidal etkisi klasik Castellani solüsyonu ile karşılaştırıldığı zaman *S.a-*

*ureus* ATCC 25923 hariç diğer suşlarda etkinliğin aynı MİD değerinde olduğu gözlemlenmiştir.

Rezorsinolsüz solüsyonda bakterilere karşı etkili olan konsantrasyon 1/64 iken mayalarda bu etkinlik 1/128 olarak saptanmıştır. Bu solüsyon klasik Castellani solüsyonu ile inhibitör ve mikrobisidal et-

kinlik açısından karşılaştırıldığı zaman bir dilüsyondan fazla fark olmadığı gözlemlenmiştir. Test edilen solüsyonların mikroorganizmalar üzerine minimum inhibitör dilüsyonları (MİD) ve minimum mikrobisidal dilüsyonları (MMD) Tablo 1'de gösterilmiştir.

**Tablo 1.** Test edilen solüsyonların mikroorganizmalar üzerine minimum inhibitör dilüsyonları (MİD) ve minimum mikrobisidal dilüsyonları (MMD)

Solüsyonlar		<i>E.coli</i> ATCC 25922	<i>P.aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>MRSA</i> ATCC 43300	<i>S.aureus</i> ATCC 25923	<i>S.aureus</i> ATCC 29213	<i>S.epidermidis</i> ATCC 12228	<i>C.guilliermondii</i> ATCC 6260	<i>C.albicans</i> ATCC 10231	<i>C.krusei</i> ATCC 6258	<i>C.dubliniensis</i> CD 36	<i>C.parapsilosis</i> ATCC 22019
Klasik Castellani	MİD	1/64	1/64	1/512	1/1024	1/1024	1/1024	1/256	1/256	1/256	1/256	1/1024
	MMD	1/64	1/32	1/256	1/1024	1/1024	1/1024	1/128	1/256	1/256	1/128	1/1024
Fuksin içermeyen	MİD	1/32	1/64	1/32	1/32	1/32	1/32	1/64	1/64	1/64	1/128	1/128
	MMD	1/32	1/16	1/16	1/16	1/16	1/16	1/32	1/64	1/32	1/128	1/64
Borik asit içermeyen	MİD	1/32	1/64	1/256	1/256	1/1024	1/1024	1/256	1/256	1/256	1/128	1/512
	MMD	1/32	1/32	1/64	1/256	1/1024	1/1024	1/64	1/256	1/256	1/128	1/512
Rezorsinol içermeyen	MİD	1/64	1/64	1/512	1/1024	1/1024	1/1024	1/128	1/256	1/256	1/256	1/1024
	MMD	1/64	1/16	1/512	1/1024	1/1024	1/1024	1/64	1/256	1/256	1/256	1/1024

## TARTIŞMA

Klasik Castellani solüsyonu bakteriyel veya fungal enfeksiyonlarda etkili olmasına rağmen fenol ve borik asitin özellikle çocuklarda toksik olması ve nadir de olsa rezorsinole bağlı kontakt dermatit olgularının görülmesi bu boya solüsyonunun tedavide kullanılmasını sınırlamaktadır.

Asteatosis, dış kulak yolunda apokrin bezlerin salgıladıkları serumen yokluğu ile görülen, özellikle kronik diffüz otitis eksterna olgularında sık karşılaşılan klinik tablodur. Serumen salgısının azalması dış kulak yolunda enfeksiyonlara yatkınlığı da arttırmaktadır. Yapılan bir klinik çalışmada kulak kaşınması olan asteatosisli hastalarda dış kulak yolu mikrobiyolojisi araştırılmış ve topikal olarak uygulanan %2'lik alkol ve borik asit solüsyonunun kaşınma üzerine oldukça etkili olduğu görülmüştür [9]. Biz de çalışmamızda klasik Castellani solüsyonunun borik asitli formülasyonunda test edilen bakterilere karşı 32 kat dilüe edildiğinde etkinlik gösterirken, bu şeklin ma-

yalara 128 kat dilüe edildiğinde de etkili olduğunu bulduk. Böylece çalışmamızda asteatosisli hastaların tedavisinde klasik Castellani formülasyonu yerine 32 kat sulandırılmış borik asitli formülasyonun kullanılabileceğini in vitro olarak gösterdik.

Klasik Castellani solüsyonunun içerisinde bulunan başka bir madde olan fuksinin karsinogenez yönünden riskli olduğu bilinmektedir. Yanı sıra fuksinin cildi ve kıyafetleri boyaması klasik Castellani boyasının tedavide kullanımında da sorun olmaktadır. Yapılan bir klinik çalışmada fuksin içermeyen Castellani solüsyonunun intertrigoda etkili olduğu belirtilmektedir [10]. Bizim çalışmamızda fuksinin çıkarılması antimikrobiyal etkinliği azaltmakla birlikte bu fuksinsiz formülasyonun 16 kat dilüsyonda dahi antimikrobiyal etki gösterdiği in vitro olarak görülmüştür.

Fenolün aktivitesi, yapısında bulunan halkada yapılan yer değiştirmeler ile artırılabilir. Bu şekilde metil fenol, orto meta-fenol, para krezol ve

halogenlenmiş fenolün elde edilmektedir. Elde edilen yeni fenollerin etkisi normal fenolden daha fazladır. Lizol %5 konsantrasyonda deri, yara, çamaşır, eşya, hastane odaları ile idrar ve gaita ile kirlenmiş ortamların dezenfeksiyonunda kullanılan bir fenol bileşimidir. Rezorsinol bakterisidal bir hidrosifenoldür. Yapısında bulunan alifatik yan zincirin değiştirilmesiyle antimikrobiyal etkisi artmaktadır. Çalışmamızda klasik Castellani solüsyonundan rezorsinol çıkarıldığında bakterilere karşı 1/64 sulandırımın, mayalara karşı da 1/128 sulandırımın etkili olduğu saptanmıştır. Rezorsinolsüz solüsyon Klasik Castellani solüsyonu ile inhibitör ve mikrobisidal etkinlik açısından karşılaştırıldığı zaman bir dilüsyondan fazla fark olmadığı gözlemlenmiştir. Bu da bize rezorsinolün solüsyon içindeki varlığının etkinliği değiştirmedini göstermektedir.

Çalışmamız sonucunda klasik Castellani formülasyonunda borik asit, fuksin ve rezorsinol gibi solüsyonun içeriğini oluşturan kimyasalların miktarlarının azaltılmasıyla benzer bakterisidal/fungisidal etki sağlanırken, hem toksik etkilerin azaltılması hem de kimyasallardan tasarruf edilmesi sağlanacaktır. Ayrıca borik asit, fuksin, rezorsinol miktarının azaltıldığı “modifiye Castellani solüsyonu” diyebileceğimiz formülasyonlarının in vivo sonuçlarının da önemli olacağını düşünmekteyiz.

## KAYNAKLAR

1. Osguthorpe JD, Nielsen DR. Otitis externa: review and clinical update. J. American Family Physician 2006;74:1510-1516.
2. Vennewald I, Wollina U. Cutaneous infections due to opportunistic molds: uncommon presentations. Clin Dermatol 2005;23:565-571.
3. Balabanova M, Papova M, Tchipeva R. Dyes in dermatology. Clin Dermatol 2003;21:2-6.
4. Parish L, Witkowski JA. Traditional therapeutic agents. Clin Dermatol 2000;18:5-9.
5. Kim YH. Clinical characteristics of granular myringitis treated with Castellani solution. Eur Arch Otorhinolaryngol 2011;268:1139-1146.
6. Katsambas A, Stefanaki C. Cutaneous diseases of the foot: Unapproved treatments. Clin Dermatol 2002;20:689-699.
7. Erk G, Erdoğan G, Dikmen B, Ünlü E. Kimyasal dermabrazyon sırasında peroperatif fenol entoksikasyonu. Türk Anest Rean Der Dergisi 2003;31:253-257.
8. Shah MK. Castellani's paint. Indian J Dermatol Venerol Leprol 2003;69:357-358.
9. Karakuş F, Arda N, İkinciogulları A. Asteatosis ve kaşıntılı hastalarda dış kulak yolu mikrobiyolojisi. Kulak Burun Bogaz İhtis Derg 2003;11:33-38.
10. Arnold HL. Castellani's paint without fuchsin. Arch Dermatol 1979;11:1287.