

Flukonazol ve amfoterisin B'nin Candida türlerine postantifungal etkisi

Postantifungal effect of fluconazole and amphotericin B on Candida species

Sultan Yolbakan, Feryal Çetin Gürelık, Işıl Fidan, Sibel Aydoğan, Ayşe Kalkancı, Semra Kuştimur

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Beşevler, Ankara

İletişim / Correspondence: Işıl Fidan Adres / Address: Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Beşevler/ANKARA Tel: 0 312 202 46 26, Fax: 0 312 214 11 31 E-mail: isilfidan@yahoo.com

ÖZET

Mantarların antifungallere duyarlılık testleri genellikle CLSI standartlarına göre yapılmasına rağmen bazen minimal inhibitör konsantrasyon (MİK) değerleri ile hastaların klinik yanıtı arasında uyumsuzluk görülebilmektedir. Bu çalışmada Candida türleri üzerine flukonazol ve amfoterisin-B'nin postantifungal etkisinin (PAFE) belirlenmesi amaçlanmıştır. Candida izolatları antifungal ajanların farklı konsantrasyonları ile inkübe edilmiş ve daha sonra örneklerin optik dansiteleri ölçülmüştür. Amfoterisin-B belirgin bir postantifungal etki oluştururken, flukonazol ile bu etki gözlenmemiştir. Bu nedenle antifungal ajanların PAFE değerlerinin belirlenmesinin etkili bir antifungal tedavi için yararlı bir strateji olacağı düşünülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Candida, postantifungal etki, flukonazol, amfoterisin-B

SUMMARY

Although the antifungal susceptibility tests of fungi are usually determined according to CLSI standards, sometimes there is a discordance between the minimum inhibitory concentration (MIC) values and the clinical response of the patients. Aim of this study is to determine the postantifungal effects (PAFE) of fluconazole and amphotericin-B on Candida species. Suspension of Candida isolates were incubated with various concentrations of antifungal agents. Then the optic densities of the samples were measured. As a result it was seen that while amphotericin-B generated a marked postantifungal effect, fluconazole did not generate. So it was suggested that determining postantifungal effect of antifungal agents may be a useful strategy for an effective antifungal treatment.

Key words: Candida, postantifungal effects, fluconazole, amphotericin-B

GİRİŞ

Dünyada fungal infeksiyon oranı giderek artış göstermekte ve immün sistemi baskılanmış hastalarda önemli mortalite ve morbidite nedeni oluşturmaktadır (1). Candida, doğada yaygın olarak bulunur. Başta *Candida albicans* (*C.albicans*) ol-

mak üzere diğer *Candida* türleri özellikle AIDS, kanser hastaları ile organ transplantasyonu yapılmış kişilerde giderek artan bir sıklıkta görülen hastane infeksiyonu etkenleridir (2). Amfoterisin-B, 5-florositozin, azollerden flukonazol gibi antifungal ajanlar kandidoz tedavisinde yaygın

olarak kullanılmaktadır.

Fungusların antifungal ilaç duyarlılıklarının belirlenmesinde Clinical Laboratory Standarts Institution (CLSI) standardı yaygın olarak kullanılmasına rağmen, özellikle amfoterisin-B gibi antifungal ajanların MİK (Minimal inhibitör konsantrasyon) değerleri ve klinik yanıt arasında tam bir uygunluk görülemeyebilmektedir (3). Bu nedenle, antifungal ajanların *in vivo* etkisi sadece intrinsek aktivitesi ve farmakokinetik özelliklerine bağlı değil, aynı zamanda antifungal ajanın kendisinin oluşturduğu postantifungal etki (PAFE) ile ilişkilidir (4). PAFE, fungal hücre ile muamele edilmiş antifungal ilacın ortamdan uzaklaştırılmasından sonra, hücrenin antifungal ajanın hasar oluşturucağı etkisinden kurtulması için gerekli olan süre olarak tanımlanır (5). MİK değerleri, besiyerinde antimikrobiyal etkinin statik ölçümü hakkında belirli bir zaman dilimi içinde bilgi vermektedir. PAFE, klinisyen için daha önemlidir ve ilaç konsantrasyonu ile ortaya çıkan farmakolojik etkiler arasında daha detaylı bilgi verir (6). Dolayısıyla antifungal ajanın PAFE değerinin belirlenmesi konvansiyonel MİK değerleri yanında ikinci bir referans değer olarak önemlidir. Bu değer klinik kullanım sırasında antifungal dozunun belirlenmesinde de yarar sağlayabilir (7).

Uzun PAFE değerine sahip antimikrobiyal ilaçlar, kısa PAFE değerine sahip antimikrobiyal ajanlardan daha az sıklıkta uygulanabilir. Bu durum antimikrobiyal ilacın konakta oluşturacağı toksik etkilerin azaltılması ve uygulama kolaylığı açısından önem taşımaktadır (8).

Bu çalışmada, PAFE'nin antimikrobiyal ilaçların etkinliğinin belirlenmesindeki önemi nedeniyle, çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Candida* türlerine karşı flukonazol ve amfoterisin-B'nin postantifungal etkinliklerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Candida izolatları. Klinik örneklerden izole edilen bir adet *C.albicans*, bir adet *C. parapsilosis*, bir adet *C. inconspicua* suşu çalışma kapsamına alınmıştır. *Candida* suşlarının isimlendirilmesinde ID32C maya tanımlama sistemi (bioMerieux, Fransa) kullanılmıştır.

Antifungal ilaçlar ve MIC değerlerinin belirlenmesi. Flukonazol (Pfizer, Türkiye) ve amfoterisin-B (Sigma,Almanya) ilaçlarının morfolinopropansulfonik asit (MOPS) ile tamponlanmış RPMI-1640 (Sigma, Almanya) besiyerinde stok solüsyonları hazırlanmıştır. *Candida* suşlarının flukonazol ve amfoterisin-B MİK değerlerinin belirlenmesinde CLSI standardı kullanılmıştır (9).

Postantifungal etkinin belirlenmesi. Sabouraud dextrose agar (SDA) besiyerinde bir gece inkübe edilen *Candida* suşlarının spektrofotometride (Shimadzu, UV-1201, ABD) 520 nm'de 1.5 olacak şekilde süspansiyonları hazırlanmıştır. Flukonazol ve amfoterisin-B'nin her *Candida* suşu için MİK, 2MİK, 4MİK, 8MİK değerlerindeki ilaç konsantrasyonu *Candida* süspansiyonları ile karşılaştırılmıştır. Kontrol olarak antifungal içermeyen *Candida* süspansiyonları kullanılmıştır. Antifungal içeren ve içermeyen *Candida* süspansiyonları 37°C'de 1 saat çalkalayıcı etüvde inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası antifungal ilaçların uzaklaştırılması için 2 kez santrifüj edilerek yıkama yapılmıştır. Daha sonra 100 µl *Candida* içeren süspansiyonu içinde 150 µl RPMI-1640 besiyeri bulunan düz tabanlı 96 kuyucuklu mikropalak kuyucuklarına eklenmiştir. Herbir *Candida* suşu ve herbir MİK değeri için 3'er kuyucuk hazırlanmıştır. Plaklar 37°C'de 24 saat süreyle inkübe edilmiş, 0. saatten itibaren her 1 saatte bir otomatik ELISA okuyucusunda (Biotek, ABD) 595 dalga boyunda optik dansiteleri ölçülmüştür.

PAFE değerlendirilmesinde PAFE=T-C formülü kullanılmıştır. T, antifungal ilaç içeren *Candida* süspansiyonlarının 0.05 absorbansa ulaşması için gerekli süreyi; C ise antifungal ilaç içermeyen kontrol *Candida* süspansiyonlarının 0.05 absor-

bans düzeylerine ulaşması için gerekli olan süreyi ifade etmektedir (7).

İstatistiksel analiz. Sonuçların değerlendirilmesinde Mann-Whitney U testi kullanılmıştır. $p < 0.05$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

BULGULAR

Her üç Candida suşu ile yapılan amfoterisin-B ve flukonazolün postantifungal etkisinin belirlendiği çalışmamızda, MİK, 2MİK, 4MİK ve 8MİK değerlerinde amfoterisin-B ile karşılaştırılan C.albicans, C.parapsilosis ve C. inconspicua suşlarına ait postantifungal etki sürelerini gösteren değerler tabloda gösterilmiştir (Tablo 1).

Tablo 1. C.albicans, C.parapsilosis ve C. inconspicua suşlarının PAFE süreleri (saat) (Ortalama±Standart hata)

Amfoterisin-B konsantrasyonu	C.albicans	C.parapsilosis	C. inconspicua
MİK	1.83±0.16	4.16±0.16	2.94±0.35
2xMİK	3.50±0.28	6.16±0.16	5.66±0.57
4xMİK	10.5±0.28	16.83±0.44	13.72±0.92
8xMİK	20.33±0.33	19.33±0.33	19.88±0.21

Candida suşlarında amfoterisin-B'nin konsantrasyonunun artmasının antifungal ajanın postantifungal etki süresini uzattığı görülmüştür. Suşlar arasında amfoterisin-B'nin PAFE etkisi açısından farklılık incelendiğinde; MİK düzeyinde C.albicans'a karşı amfoterisin B'nin PAFE etkisinin diğer iki suştan daha kısa sürdüğü görülmüştür. 2xMİK ve 4xMİK değerlerinde gruplar arasında PAFE süreleri açısından anlamlı farklılıklar olduğu belirlenmiştir ($p < 0.05$) Amfoterisin-B'nin Candida suşları arasındaki PAFE etkisine ait p değerleri tabloda gösterilmiştir (Tablo 2). Özellikle C.parapsilosis suşunda MİK, 2xMİK ve 4xMİK değerlerinde PAFE'nin diğer Candida türlerine göre daha uzun süreli olduğu belirlenmiştir.

Tablo 2. Bulguların istatistiksel değerlendirilmesi (p değerleri)

	C.albicans	C.parapsilosis	C.inconspicua
C.albicans	MİK -	0.01	0.072
	2xMİK -	$p < 0.001$	$p < 0.001$
	4xMİK -	$p < 0.001$	0.001
	8xMİK -	$p > 0.05$	$p > 0.05$
C.parapsilosis	MİK 0.01	-	0.021
	2xMİK $p < 0.001$	-	0.026
	4xMİK $p < 0.001$	-	0.002
	8xMİK $p > 0.05$	-	$p > 0.05$
C.inconspicua	MİK 0.072	0.021	-
	2xMİK $p < 0.001$	0.026	-
	4xMİK 0.001	0.002	-
	8xMİK $p > 0.05$	$p > 0.05$	-

*Koyu yazılanlar istatistiksel olarak anlamlı değerler

Flukonazol ise Candida suşlarının hiç birinde antifungal ajanın bulunmadığı kontrol örneklerine göre herhangi bir postantifungal etki oluşturmuş ve kontrol örneklerinin 0.05 optik dansite değerine ulaştığı süre ile flukonazolün farklı konsantrasyonlarda uygulandığı test örneklerinin 0.05 optik dansite değerine ulaştığı süre arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir.

TARTIŞMA

Candida infeksiyonlarının tedavisinde kullanılan antifungal ajanlara karşı artan direnç, özellikle kandidozların daha sık görüldüğü immün sistemi baskılanmış hastalarda sorun oluşturmakta ve bu nedenle uygulanan ilaçların farmakolojik özelliklerinin tam olarak belirlenmesi önem taşımaktadır. Antifungal etkinliğin belirlenmesinde kullanılan MİK değerlerinin ilaç etkinliğini sadece kısa bir zaman dilimi için belirleyebilmesi, klinikte antifungal ajanlarının etkilerinin tespitinde PAFE gibi diğer farmakodinamik parametrelerin kullanımının yaygınlaşmasına yol açmıştır (6).

Üç farklı Candida türüne karşı amfoterisin-B ve flukonazol gibi antifungal ajanların PAFE değerlerinin belirlenmesi için yaptığımız çalışmada, MİK değerleri ve üzerindeki konsantrasyonlarda amfoterisin-B'nin belirgin PAFE göstermesine rağmen, flukonazol ile bu tür belirgin bir etki tespit edilememiştir.

PAFE, antifungal ajanın konsantrasyonu, ilacın yapısı, ilaçla karşılaşan mikroorganizmanın özel-

likleri, karşılaşma süresi, pH gibi pekçok faktöre bağlı olarak değişiklik göstermektedir (3, 10). Çalışmamızda da görüldüğü gibi *Candida* türlerinde amfoterisin-B aracılığıyla oluşan PAFE, konsantrasyon ve antifungal ajanla karşılaşma süresine bağlı olarak farklılık sergilemektedir ve MİK üzerindeki antifungal konsantrasyonları etkili bir PAFE oluşturmaktadır.

Özkütük ve ark (11) *C.albicans* suşlarına karşı amfoterisin-B'nin 7.5 ile 20 saat arası süren postantifungal etkisini gözlerken, flukonazolün bu suşlara karşı ölçülebilir bir postantifungal etki göstermediğini bildirmişlerdir.

Manavathu ve ark (5) amfoterisin-B'nin *Aspergillus fumigatus*'a karşı uzun süreli bir PAFE sağladığı, ancak triazolollerin kısa PAFE'ye neden olduklarını ve fungisidal aktiviteli antifungal ilaçların fungistatik ilaçlara kıyasla daha uzun süreli PAFE oluşturma eğiliminde olduklarını belirtmişlerdir. Aynı şekilde Ernst ve ark (12) da fungisidal etkili mikofunginin doz bağımlı PAFE etkisi olduğunu bildirmişlerdir.

Garcia ve ark (4) amfoterisin-B ve florositozinin *Candida* türlerine karşı MİK, 4xMİK, 8xMİK konsantrasyonlarda anlamlı düzeylerde postantifungal etkiye yol açtığını, ketakonazol ve flukonazolün bu konsantrasyonlarda belirgin bir PAFE oluşturmadıklarını, ancak MİK üzerindeki konsantrasyonlarda antifungal uygulanmış suşlara daha sonra ilacın sub-MİK konsantrasyonlarda yeniden uygulamasının etkili PAFE sağlayabileceğini belirtmişlerdir. Azollerin doz protokolünde mikroorganizmaların büyüme dönemlerinin gözönüne alınmasının gerekli olduğunu bildirmişlerdir.

Chryssanthou ve ark (13) *C.albicans*, *C.glabrata* ve *C.krusei* suşlarında amfoterisin-B'nin konsantrasyonu arttıkça PAFE'de bir artış görüldüğünü, amfoterisin-B'nin yüksek konsantrasyonlarda daha az sıklıkta verilmesinin daha uygun olabileceğini ve 24 saat infüzyon tarzı uygulamanın etkide azalmaya yol açabileceğini belirtmişlerdir.

Bonaventura ve ark.(1) *C.guilliermondii*, *C.kefyr*

ve *C.lusitaniae* suşlarında azollerin fungostatik aktivite sergilediğini ancak ölçülebilir bir PAFE belirlenemediğini, amfoterisin-B'nin doz bağımlı fungisidal aktivite ve PAFE oluşturduğunu bildirmişlerdir. Bizim de çalışmamızda flukonazol ile ölçülebilir bir PAFE değeri saptamamız muhtemelen flukonazolün fungistatik etkili bir antifungal ajan olması nedeniyle olmaktadır.

Ernst ve ark.(8) flukonazolün *C.albicans* ve *Cryptococcus neoformans*'a karşı tek başına veya ekinokandin ile kombine durumda iken belirli bir PAFE göstermediğini ama amfoterisin-B'nin *Candida* suşlarına karşı 12 saate kadar PAFE oluşturduğunu belirtmişlerdir.

Antifungal ajan ve etki arasındaki ilişki optimal tedavi dozlarının belirlenmesinde temel oluşturur. Uzun PAFE'ye sahip antifungal ajanlar daha az sıklıkta uygulanırken, kısa süreli PAFE oluşturan ajanların daha sık aralıklarla uygulanmaları gerekmektedir. Konsantrasyona bağlı aktivite ve daha uzun PAFE oluşumuna neden olan ajanların daha az sıklıkta uygulanan tedavi seçeneklerinin kullanımı başta ilaç birikimine bağlı oluşabilecek toksisitelerin azaltılmasını sağlayacağı gibi, pekçok başka avantajı da beraberinde getirecektir. (14). Bu nedenle özellikle immünsüpresif hastalarda ciddi bir problem oluşturan *Candida* enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılan özellikle fungisidal etkili antifungal ajanların tedavi protokollerinin belirlenmesinde MİK değeri yanında PAFE değerlerinin belirlenmesinin de önemli olduğunu düşünmekteyiz.

Kaynaklar

1. Bonaventura GD, Spedicato I, Picciani C, D'Antonio D, Piccolomini R. In vitro pharmacodynamic characteristics of amphotericin B, caspofungin, fluconazole, and voriconazole against bloodstream isolates of infrequent *Candida* species from patients with hematologic malignancies. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 4453-4456.
2. Ashman RB, Farah CS, Wanasasengsakul S, Hu Y, Pang G, Clancy RL. Innate versus adaptive immunity in *Candida albicans* infection. *Immunol Cell Biol* 2004; 82:196-204.
3. Vitale RG, Mouton JW, Afeltra J, Meis JFGM, Verweij PE. Method for measuring postantifungal effect in *Aspergillus* species. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 1960-1965.

4. Garcia MT, Llorente MT, Minquez F, Prieto J. Postantifungal effect and effects of Sub-MIC concentrations on previously treated *Candida* spp. Influence of growth phase. *J Infect* 2002; 45: 263-267.
5. Manavathu EK, Ramesh MS, Baskaran I, Ganesan LT, Chandrasekar pH. A comparative study of the post-antifungal effect (PAFE) of amphotericin B, triazoles and echinocandins on *Aspergillus fumigatus* and *Candida albicans*. *J Antimicrob Chemother* 2004; 53: 386-389.
6. Zhanel GG, Saunders DG, Hoban DJ, Karlowsky JA. Influence of human serum on antifungal pharmacodynamics with *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 2018-2022.
7. Shu M, Ellepola AN, Samaranayake LP. Effects of two different growth media on the postantifungal effect induced by polyenes on *Candida* species. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 2732-2735.
8. Ernst EJ, Klepser ME, Pfaller MA. Postfungal effects of echinocandin, azole, and polyene antifungal agents against *Candida albicans* and *Cryptococcus neoformans*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 1108-1111.
9. National Committee for Clinical Laboratory Standards.. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved Standard. Second edition, document M27-A2. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa. 2002.
10. Garcia MT, Llorente MT, Minguez F, Prieto J. Influence of pH and concentration on the postantifungal effect and on the effects of Sub-MIC concentrations of 4 antifungal agents on previously treated *Candida* spp. *Scand J Infect Dis* 2000; 32: 669-673.
11. Özkütük A, Kırdar S, Doğan Y. Amfoterisin-B ve flukonazolün *Candida albicans* üzerindeki postantifungal etkinliği. *ANKEM Derg* 2005; 19: 31-34.
12. Ernst EJ, Roling EE, Petzold CR, Keele DJ, Klepser ME. In vitro activity of micafungin (FK-463) against *Candida* spp.: Microdilution, Time-kill, and postantifungal-effect studies. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 3846-3853.
13. Chryssanthou E, Cars O, Sjölin J. New automated method for determining postantifungal effect of amphotericin B against *Candida* species: Effects of concentration, exposure time, and area under the curve. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 4016-4018.
14. Gunderson SM, Hoffman H, Ernst EJ, Pfaller MA, Klepser ME. In vitro pharmacodynamic characteristics of nystatin including time-kill and postantifungal effect. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 2887-2890.