

KISA BİLDİRİ:
CANDIDA ALBICANS İZOLATLARINA KARŞI AMFOTERİSİN B İLE
FLUKONAZOL VE VORİKONAZOL KOMBİNASYONLARININ
İN VİTRO ETKİNLİĞİ*

SHORT COMMUNICATION:

IN VITRO ACTIVITY OF AMPHOTERICIN B WITH FLUCONAZOLE OR
 VORICONAZOLE COMBINATIONS AGAINST *CANDIDA ALBICANS* ISOLATES

Yasemin ÖZ¹, Filiz AKŞİT¹, Nuri KİRAZ¹, Abdurrahman KİREMİTÇİ¹

ÖZET: Bu çalışmada, amfoterisin B (AMB) ile flukonazol (FLU) ve vorikonazol (VOR) kombinasyonlarının *Candida albicans* klinik izolatlarına karşı in vitro etkinliğinin “checkerboard” sıvı mikrodilüsyon ve E-test yöntemleri ile araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmaya, kan, idrar, balgam ve yara örneklerinden izole edilen toplam 30 *C. albicans* suşu alınmış ve AMB, FLU ve VOR’ün minimal inhibitör konsantrasyon (MİK) değerleri sıvı mikrodilüsyon ve E-test yöntemi ile araştırılmıştır. Test edilen tüm suşlar, her iki yöntemle de bu antifungallere duyarlı bulunmuştur (AMB ve VOR MİK: <1 µg/ml; FLU MİK: <8 µg/ml). Sıvı mikrodilüsyon ve E-test yöntemi arasındaki uyum AMB için %83, FLU ve VOR için %97 olarak saptanmıştır. AMB+FLU ve AMB+VOR kombinasyonlarının etkinliği de hem “checkerboard” sıvı mikrodilüsyon (CSM) hem de E-test yöntemleri ile araştırılmıştır. Kombinasyon testlerinde etkileşim, fraksiyonel inhibisyon konsantrasyon (FİK) indeksi kullanılarak belirlenmiş ve ilaç ilişkileri, FİK indeksine göre sinerjistik, etkisiz ve antagonistik olarak değerlendirilmiştir. AMB+FLU kombinasyonunda CSM yöntemi ile bir suş (%3.3) için sinerji saptanırken, antagonizma saptanmamış; buna karşın E-test ile iki suş (%6.6) için sinerji, dört suş (%13.3) için ise antagonizma saptanmıştır. Her iki yöntemle sinerjik etkinin görüldüğü suşların birbirinden farklı olduğu izlenmiştir. İzolatların 23’ünde (%76.6) bu kombinasyon her iki testle de etkisiz olarak sonuç vermiştir. AMB+VOR kombinasyonunda ise, hem CSM hem de E-test yöntemleri ile suşların ikisi (%6.6) için sinerjik etki saptanmış, ancak yine bu suşların birbirinden farklı olduğu görülmüştür. AMB+VOR kombinasyonunda her iki yöntemle de antagonizmaya rastlanmamış; izolatların 26 (%86.6) için ise bu kombinasyon etkisiz bulunmuştur. CSM ve E-test sonuçları arasındaki uyum %87 olarak hesaplanmıştır. Sonuç olarak çalışmamızda, AMB+azol kombinasyonlarında belirgin bir sinerjik etki saptanmamakla birlikte, antagonistik etkileşimin görülmemesi de umut vericidir. Ancak invazif fungal enfeksiyonların tedavisinde tartışmalı bir konu olan AMB ve azol etkileşimi ile ilgili olarak çok merkezli, geniş kapsamlı, standardize edilmiş yöntemlerin kullanıldığı, in vitro ve klinik çalışmalara gereksinim vardır.

*Bu çalışma “7. Antimikrobik Kemoterapi Günleri”nde (13-15 Nisan 2006, İstanbul) poster olarak sunulmuştur.

¹ Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Eskişehir. (akiremitci@hotmail.com)

Anahtar sözcükler: Amfoterisin B, flukonazol, vorikonazol, kombinasyon, E test Checkerboard.

ABSTRACT: The aim of this study was to investigate the in vitro interaction of amphotericin B in combination with fluconazole or voriconazole against *Candida albicans* clinical isolates by using a broth microdilution checkerboard assay and E-test. A total of 30 *C.albicans* strains isolated from blood, urine, sputum and pus samples were included to the study and the minimum inhibitory concentrations (MICs) of amphotericin B (AMB), fluconazole (FLU) and voriconazole (VOR) were determined by broth microdilution method and E-test. All strains tested for susceptibility were interpreted as susceptible by both methods (FLU MICs <8 µg/ml, VOR and AMB MICs <1 µg/ml). The rates of MIC agreement between two methods were as follows: AMB, 83%; FLU, 97%; VOR, 97%. AMB+FLU and AMB+VOR combinations were tested by checkerboard broth microdilution and E-test methods. The combination test results were determined by using the fractional inhibitory concentration (FIC) index as synergistic, indifferent or antagonistic. AMB+FLU combination tested by checkerboard broth microdilution revealed synergy in one strain (3.3%) and antagonism in none, while the same combination tested by E-test revealed synergy in two (6.6%) and antagonism in four (13.3%) strains. The strains which exhibited synergy were different from each other in two assays. This combination led to indifferent results in 23 (76.6%) of the strains. On the other hand AMB+VOR combination yielded synergistic results in two (6.6%) strains by both of the methods, however, these two strains were again different from each other. No antagonism was detected by AMB+VOR combination while the combination was indifferent in 26 (86.6%) of the strains. Agreement between the checkerboard and E-test results was 87%. Although significant synergy was not detected in AMB+azole combinations, it was yet hopeful to obtain no antagonism. However, multi-center, large-scale, well standardized in-vitro and clinical studies about AMB and azole interaction which is a matter of debate, are necessary.

Key words: amphotericin B, fluconazole, voriconazole, combination, Etest, checkerboard.

GİRİŞ

Yüksek morbidite ve mortalite oranlarına sahip olan sistemik *Candida* enfeksiyonlarının görülme sıklığında son yıllarda ciddi artış görülmektedir. Bu enfeksiyonlarda etken olan türlerin zamanla değişiklik göstermesine karşın, hala en sık görülen tür *C.albicans*'tır¹. Antifungal ilaçların yoğun kullanımı nedeniyle direncin ortaya çıkması, daha geniş spektrumlu ve farklı hedefleri etkileyen yeni antifungal ilaçlara ihtiyaç doğurmuştur. Buna karşın antifungal ilaçların halen sınırlı sayıda olması ve mevcut antifungallerin spektrumlarının darlığı, tedavide bu ilaçların bir arada kullanımını gündeme getirmiştir. Kombinasyon tedavisinin amaçları; daha geniş bir spektrum sağlamak, monoterapide elde edilenden daha güçlü bir etki oluşturmak, güvenilirliği artırmak, ilacın tolere edilmesini kolaylaştırmak ve dirençli mikroorganizmaların gelişimini azaltmaktır. İn vitro antimikrobiyal ilişkilerin saptanmasında standardize edilmiş bir yöntem bulunmamakla birlikte, "checkerboard", "time-kill", E-test ve disk difüzyon yöntemleri kullanılmaktadır²⁻⁴. Çalışmamızda, *C.albicans* klinik izolatlarında amfoterisin B ile flukonazol ve vorikonazol kombinasyonlarının in vitro antifungal etkinliklerinin araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmaya çeşitli klinik örneklerden (kan, idrar, balgam, yara) izole edilen 30 *C.albicans* suşu alındı ve suşlar germ tüp testi, mısır unlu-Tween 80 agarda kültür ve karbonhidrat asimilasyon testleri (API 20C, bioMérieux) ile tanımlandı. Amfoterisin B (AMB), flukonazol (FLU) ve vorikonazol (VOR)'ün minimal inhibitör konsantrasyon (MİK) değerleri, sıvı mikrodilüsyon ve E-test (AB Biodisk, İsveç) yöntemleriyle önerildiği şekilde belirlendi^{5,6}. İki test arasındaki uyumun değerlendirilmesinde, sıvı mikrodilüsyon yöntemi referans alındı. E-test ile saptanan MİK değerleri, sıvı mikrodilüsyon ile elde edilen değerlere göre ± 2 dilüsyon içinde yer almışsa uyumlu olarak kabul edildi⁶.

AMB+FLU ve AMB+VOR kombinasyonlarının etkinliği, hem "checkerboard" sıvı mikrodilüsyon (CSM) hem de E-test yöntemleri ile araştırıldı. CSM testinde AMB'nin 0.03-2 µg/ml, FLU'ün 0.03-32 µg/ml ve VOR'ün 0.004-4 µg/ml arasındaki dilüsyonları mikropoplaklardaki son konsantrasyonun dört katı olacak şekilde hazırlandı. 96 kuyucuklu mikropoplaklara X eksenine tek başına A ilacının ve Y eksenine tek başına B ilacının dilüsyonlarından 50'şer µl dağıtıldı. $1-5 \times 10^3$ CFU/ml (mikropoplaktaki son inokulumun iki katı) hücre içeren maya süspansiyonu tüm kuyucuklara 100'er µl dağıtıldı. Bu şekilde inokulum konsantrasyonu 1:2 ve ilaç konsantrasyonları 1:4 oranında seyreltilerek test konsantrasyonlarına ulaşılmış oldu (50 µl ilaç A + 50 µl ilaç B + 100 µl maya süspansiyonu). Paneldeki son sıra ve ilk sütun çalışılan ilaçların MİK değerlerini gösterirken, A12 kuyucuğu sterilite kontrol, H1 üreme kontrol kuyucuğu olarak kullanıldı. Mikropoplakların üzeri steril parafilm ile kapatılarak 35°C'de inkübe edildi ve sonuçlar 48 saat sonra görsel olarak değerlendirildi. Üreme kontrol kuyucuğuna göre bulanıklıkta %80'den fazla azalmanın olduğu ilk konsantrasyon kombinasyonunun MİK değeri olarak kabul edildi. Görsel değerlendirmeyi doğrulamak amacıyla, seçilmiş kuyucuklardan agar plaklarına pasajlar yapılarak koloni sayıları belirlendi.

E-test ile kombinasyon deneyinde; 0.5 McFarland bulanıklığa ayarlanmış maya süspansiyonu ve 150 mm çaplı, MOPS ile tamponlanmış %2 glukoz içeren RPMI 1640 besiyeri (pH: 7.0) kullanıldı. FLU ve VOR E-test şeritleri agar üzerine yerleştirildi, 1 saat sonra bu şeritler kaldırılıp onların izleri üzerine AMB şeritleri yerleştirildi; 35°C'de 48 saat inkübasyondan sonra MİK değerleri belirlendi^{7,8}.

İlaç ilişkileri, FİK (fraksiyonel inhibisyon konsantrasyon) indeksine göre sinerjistik, etkisiz ve antagonistik olarak sınıflandırıldı. FİK indeksi; ilacın kombinasyondaki MİK değerinin, tek başına test edildiğinde saptanan MİK değerine bölünmesi ile elde edilen her bir ilacın FİK değerlerinin toplanması ile elde edildi (FİK indeks=FİK A+FİK B). FİK indeksi ≤ 0.5 ise sinerjistik; $>0.5 - \leq 4$ ise etkisiz (indifferent) ve >4 ise antagonistik olarak değerlendirildi^{2,7-10}.

BULGULAR

Çalışmada, AMB, FLU ve VOR için sıvı mikrodilüsyon ve E-test yöntemleri ile saptanan MİK değerleri ile iki yöntemin sonuçları arasındaki uyum Tablo 1'de görülmektedir.

Tablo I. E-Test ve Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemi İle 30 *C.albicans* İzolatına Karşı Amfoterisin B, Flukonazol ve Vorikonazolün Antifungal Aktiviteleri

Antifungal	Yöntem	MİK Aralığı (µg/ml)	Uyum (%)
Amfoterisin B	Mikrodilüsyon	0.125-0.5	83
	E-test	0.016-0.25	
Flukonazol	Mikrodilüsyon	0.125-1.00	97
	E-test	0.032-1.00	
Vorikonazol	Mikrodilüsyon	0.008-0.062	97
	E-test	0.003-0.016	

AMB+FLU ve AMB+VOR kombinasyonları için CSM ve E-test yöntemleriyle alınan sonuçlar Tablo II'de verilmiştir. Gerek AMB+FLU gerekse AMB+VOR kombinasyonlarında, her iki yöntemle sinerjik etkinin görüldüğü suşların birbirinden farklı olduğu görülmüştür.

Tablo II. Amfoterisin B (AMB) ile Flukonazol (FLU) ve Vorikonazol (VOR) Kombinasyon Testlerinin Sonuçları

Yöntem	AMB+FLU Sayı (%)			AMB+VOR Sayı (%)		
	Sinerji	Etkisiz	Antagonizma	Sinerji	Etkisiz	Antagonizma
CSM	1 (3.3)	29 (96.6)	–	2 (6.6)	28 (93.3)	–
E test	2 (6.6)	24 (80.1)	4 (13.3)	2 (6.6)	28 (93.3)	–

CSM: "Checkerboard" sıvı mikrodilüsyon.

CSM plaklarından, seçilen bazı dilüsyonlardaki tüm kuyucuklardan agar plaklarına pasaj yapılması sonunda elde edilen koloni sayıları, görsel değerlendirme sonuçlarıyla uyumlu bulunmuştur.

TARTIŞMA

Mantar enfeksiyonlarının sıklığındaki artış, beraberinde tedavi ve direnç sorununu gündeme getirmiş, bu durum kombinasyon tedavilerinin etkinliğinin araştırılmasına yönelik çalışmaları tetiklemiştir². Çalışmamızda, amfoterisin B (AMB), flukonazol (FLU) ve vorikonazol (VOR)'ün tek başına ve kombine olarak 30 *C.albicans* klinik izolatına karşı etkinliğinin in vitro olarak değerlendirilmesi amaçlanmış ve sıvı mikrodilüsyon ve E-test yöntemleri ile saptanan MİK değerleri, FLU için CLSI tarafından belirlenen duyarlılık sınır değerinin altında yer almıştır (MİK ≤8 µg/ml). AMB ve VOR için henüz kesinleşmiş MİK direnç sınır değerleri bulunmamakla birlikte, en çok kabul gören duyarlılık sınır değerlerine göre tüm isolatlar her iki yöntemle de duyarlı bulunmuştur (MİK değerleri <1 µg/ml)^{5,11}.

Çalışmamızda, *C.albicans* suşlarının duyarlılığını saptamada sıvı mikrodilüsyon ve E-test yöntemleri arasındaki uyum AMB için %83, FLU için %97 ve VOR için %97 olarak bulunmuştur. Yapılan bazı çalışmalarda bu yöntemler arasındaki uyum %96-99 olarak bildirilmektedir^{6,12}. Koç ve arkadaşlarının¹³ çalışmasında ise, sıvı mikrodilüsyon ve E-test yöntemini karşılaştırmak için dört antifungal ajan kullanılmış ve testler arası uyum AMB için %93.1, FLU

için %79.4 olarak bulunmuştur. Tüm bu veriler, E-test yönteminin gerek ilaçlara karşı duyarlılığın saptanmasında gerekse kombinasyon etkileşimlerinin araştırılmasında, sıvı mikrodilüsyon yöntemine alternatif olabilecek etkin ve pratik bir yöntem olduğunu düşündürmektedir^{2,4,8,9}.

İn vitro antifungal duyarlılığı saptamada standardize edilmiş yöntemler bulunmasına rağmen, antifungal kombinasyonların etkinliğini değerlendirmede kullanılan yöntemler hala yetersizdir. Bu amaçla en sık kullanılan iki yöntem “checkerboard” ve “time-kill” testleri olup, bunlara son zamanlarda E test yöntemi de eklenmiştir^{2,7,8}. Ancak birçok araştırmacı “checkerboard” yöntemini tercih etmektedir ve 1998-2002 yılları arasında yayınlanmış ilaç etkileşim çalışmalarının %75’inde “checkerboard” yöntemi kullanılmıştır¹⁰. Lewis ve arkadaşları⁷, antifungal kombinasyonların etkileşimini değerlendirmek için her üç yöntemi karşılaştırmışlar ve E-test ile “time-kill” yöntemleri arasında, “checkerboard” yönteminin aksine oldukça uyumlu sonuçlar elde etmişlerdir. Bizim çalışmamızda ise bu araştırmacıların aksine, checkerboard ve E-test yöntemleri arasında, hem AMB+FLU (%76.6) hem de AMB+VOR kombinasyonunda (%86.6) oldukça uyumlu sonuçlar elde edilmiştir. Ancak sinerji ve antagonizma saptanan suşlar iki yöntemde de tamamen farklıdır. Yöntemler ayrı ayrı karşılaştırıldığında sonuçlarımızın Lewis ve arkadaşlarının⁷ sonuçları ile genel olarak paralel olduğu, farklılıkların ise, az sayıda izolatin test edilmiş olmasından ve *C.glabrata*, *C.krusei* ve flukonazole dirençli *C. albicans* gibi dirençli suşların kullanılmamasından kaynaklanmış olabileceği düşünülmüştür.

Fungal enfeksiyonların tedavisinde AMB ve azol etkileşimi hala tartışmalı bir konu olup, in vitro çalışmalarda bu kombinasyonların antagonistik etkileşiminden, belirgin sinerjiye kadar değişen oldukça farklı sonuçlar elde edilmiştir¹⁴⁻²⁰. Bu çelişkili sonuçlar; çalışılan suşların farklılığına, değerlendirme yöntemlerine, ilaçların uygulanma şekline (uygulama sırasındaki farklılık, eş zamanlı uygulama gibi), yorumlama kriterlerine, değerlendirenin bilgi ve tecrübesine ve standardize edilmiş bir yöntemin bulunmamasına bağlı olabileceği gibi, AMB ve azollerin aynı biyokimyasal hedefi etkilemelerinden de kaynaklanıyor olabilir^{4,8,21}. Çalışmamıza göre, AMB+azol kombinasyonunda belirgin bir sinerjik etki saptanmamakla birlikte, antagonistik etkileşimin görülmemesi de umut vericidir. Yeni geliştirilmiş bir antifungal olan VOR ile kombinasyonda ise sonuçlar daha iyi görünmektedir. Ancak antifungal ilaç etkileşmelerinin suşa göre değişebileceği ve in vitro çalışmaların ilaçların in vivo etkilerini yansıtmayabileceği de unutulmamalıdır^{2,4,8}. Sonuç olarak çalışmamızda, en az antagonistik etkinin görüldüğü AMB+VOR kombinasyonunun, tedaviye yanıt alınamayan ya da dirençli *Candida* suşları ile oluşan enfeksiyonların tedavisinde ümit vaat edebileceği düşünülmekle beraber, bu konuda çok merkezli, geniş kapsamlı, standardize edilmiş yöntemlerin kullanıldığı, in vitro ve klinik çalışmalara gereksinim vardır.

KAYNAKLAR

1. Edwards JE. *Candida* species, pp: 2938-57. In: Mandell GL, Bennet JE, Dolin R (eds), Principles and Practice of Infectious Disease. 2005, 6th ed. Elsevier Churchill Livingstone, Philadelphia.
2. Mukherjee PK, Sheehan DJ, Hitchcock CA, Ghannoum MA. Combination treatment of invasive fungal infections. Clin Microbiol Rev 2005; 18: 163-94.

3. Johnson MD, MacDougall C, Ostrosky-Zeichner L, Perfect JR, Rex JH. Combination antifungal therapy. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 693-715.
4. Cuenca-Estrella M. Combinations of antifungal agents in therapy—what value are they? *J Antimicrob Chemother* 2004; 54: 854-69.
5. Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast. Approved Standard, 2002. Document M27-A2. CLSI (NCCLS), Wayne, Pa.
6. Maxwell MJ, Messer SA, Hollis RJ, et al. Evaluation of Etest method for determining fluconazole and voriconazole MICs for 279 clinical isolates of *Candida* species infrequently isolated from blood. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 1087-90.
7. Lewis RE, Diekema DJ, Messer SA, Pfaller MA, Klepser ME. Comparison of Etest, checkerboard dilution, and time-kill studies for the detection of synergy or antagonism between antifungal agents tested against *Candida* species. *J Antimicrob Chemother* 2002; 49: 345-51.
8. White RL, Burgess DS, Manduru M, Bosso JA. Comparison of three different in vitro methods of detecting synergy: time-kill, checkerboard and Etest. *Antimicrob Agent Chemother* 1996; 40: 1914-8.
9. Te Dorsthorst DTA, Verweij PE, Meletiadis J, et al. In vitro interaction of flucytosine combined with amphotericin B or fluconazole against thirty-five yeast isolates determined by both the fractional inhibitory concentration index and the response surface approach. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 2982-9.
10. Odds FC. Synergy, antagonism, and what the chequerboard puts between them. *J Antimicrob Chemother* 2003; 52:1.
11. Pfaller MA, Diekema DJ, Rex JH, et al. Correlation of MIC with outcome for *Candida* species tested against voriconazole: analysis and proposal for interpretive breakpoints. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 819-26.
12. Barry AL, Pfaller MA, Rennie RP, Fuchs PC, Brown SD. Precision and accuracy of fluconazole susceptibility tests by broth microdilution, Etest, and disk diffusion methods. *Antimicrob Agent Chemother* 2002; 46: 1781-4.
13. Koc AN, Gokahmetoglu S, Oguzkaya M. Comparison of Etest with the broth microdilution method in susceptibility testing of yeast isolates against four antifungals. *Mycoses* 2000, 43: 293-7.
14. Lewis RE, Lund BC, Klepser ME, Ernst EJ, Pfaller MA. Assessment of antifungal activities of fluconazole and amphotericin B administered alone and in combination against *Candida albicans* by using a dynamic in vitro mycotic infection model. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42:1382-6.
15. Ernst EJ, Klepser ME, Pfaller MA. In vitro interaction of fluconazole and amphotericin B administered sequentially against *Candida albicans*: effect of concentration and exposure time. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1998; 32: 205-10.
16. Louei A, Banerjee P, Drusano GL, Shayegani M, Miller MH. Interaction between fluconazole and amphotericin B in mice with systemic infection due to fluconazole-susceptible or -resistant strains of *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43: 2841-7.
17. Sanati H, Ramos CF, Bayer AS, Ghannoum MA. Combination therapy with amphotericin B and fluconazole against invasive candidiasis in neutropenic-mouse and infective-endocarditis rabbit models. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41: 1345-8.
18. Louie A, Kaw P, Banerjee P, Liu W, Chen G, Miller MH. Impact of the order of initiation of fluconazole and amphotericin B in sequential or combination therapy on killing of *Candida albicans* in vitro and in a rabbit model of endocarditis and pyelonephritis. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 485-94.

19. Rex JH, Pappas PG, Karchmer AW, et al. A randomized and blinded multicenter trial of high-dose fluconazole plus placebo versus fluconazole plus amphotericin B as therapy for candidemia and its consequences in non-neutropenic subjects. Clin Infect Dis 2003; 36: 1221-8.
20. Barchiesi F, Spreghini E, Maracci M, et al. In vitro activities of voriconazole in combination with three other antifungal agents against *Candida glabrata*. Antimicrob Agents Chemother 2004; 48: 3317-22.
21. Barchiesi F, Schimizzi AM, Caselli F, et al. Interactions between triazoles and amphotericin B against *Cryptococcus neoformans*. Antimicrob Agents Chemother 2000; 44: 2435-41.