

MOKSİFLOKSASİN VE AMFOTERİSİN B KOMBİNASYONUNUN *CANDIDA* TÜRLERİ ÜZERİNE İN VİTRO SİNERJİSTİK ETKİSİ*

IN VITRO SYNERGISTIC EFFECT OF MOXIFLOXACIN AND AMPHOTERICIN B COMBINATION AGAINST *CANDIDA* STRAINS

Burçe YALÇIN¹, Ayşe KALKANCI¹, Feryal GÜRELİK¹, Işıl FİDAN¹, Semra KUŞTİMUR¹, Şengül ÖZDEK²

¹ Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara. (kalkanci@gazi.edu.tr)

² Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Göz Hastalıkları Anabilim Dalı, Ankara.

ÖZET

Yapılan çalışmalarda, kinolonların antifungal ilaçların etkinliğini artırdıkları ya da aralarında herhangi bir etkileşim bulunmadığını bildiren çelişkili sonuçlar alınmıştır. Bu çalışmada, *Candida* suşlarının tek başlarına moksifloksasin (MOX)'e ve MOX + amfoterisin B (AmB) kombinasyonuna karşı in vitro duyarlılıklarının araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmaya, 10 *Candida albicans*, 4 *Candida glabrata*, 2 *Candida parapsilosis*, 1 *Candida tropicalis*, 1 *Candida pelliculosa* ve 1 *Candida sake* olmak üzere 19 klinik *Candida* izolatu ile *C. albicans* ATCC 90028 standart suşu olmak üzere toplam 20 suş dahil edilmiştir. MOX ve AmB kombinasyonunun in vitro etkinliği, "Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)" önerilerine uygun olarak sıvı mikrodilüsyon ve dama tahtası (checkerboard) yöntemleri kullanılarak değerlendirilmiştir. Çalışmamızda, *Candida* türlerinin MOX için minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK) değerleri ≥ 400 µg/ml olarak bulunmuş ve MOX'un tek başına *Candida* türleri üzerine antifungal etki göstermediği saptanmıştır. AmB MİK değerleri ise, 11 klinik suş için 1 µg/ml; 8 klinik suş ile standart suş için ise ≤ 0.5 µg/ml olarak tespit edilmiştir. AmB ile MOX kombinasyonunda, AmB MİK değerleri bütün suşlar için 1-4 dilüsyon arasında azalma göstermiş, AmB'nin MOX ile kombine edildiğinde inhibitör etkisinin arttığı belirlenmiştir. Hesaplanan fraksiyonel inhibitör konsantrasyonu (FIK) indeksi, AmB ve MOX kombinasyonunun, suşların %90 (18/20; tümü klinik suşlar)'ı üzerinde sinerjistik etki (FIK < 0.5), %10 (2/20; 1'i klinik, 1'i standart suş) üzerinde ise "indifferent" etki (FIK = 1) gösterdiğini ortaya koymuştur. Kombinasyon testinin 48. saatinde bile antagonizma görülmemiştir. Sonuç olarak, bulgularımızın daha fazla tür ve sayıda izolatu içeren in vitro ve in vivo çalışmalar ile desteklenmesi durumunda, *Candida* türleri tarafından oluşturulan enfeksiyonların tedavisinde yararlı olabilecek yeni kombinasyon seçenekleri sağlayabileceği düşünülmüştür.

Anahtar sözcükler: Amfoterisin B, moksifloksasin, sinerji, antifungal, dama tahtası, FIK.

* Bu çalışma XXXIII. Türk Mikrobiyoloji Kongresi (21-25 Ekim 2008, Bodrum)'nde sözlü bildiri olarak sunulmuştur.

ABSTRACT

Contradictory results such as synergy or indifferent effect, have been reported about the interactions between quinolones and antifungal drugs in different studies. The aim of this study was to investigate the in vitro susceptibilities of *Candida* spp. to moxifloxacin (MOX) alone and MOX + amphotericin B (AmB) combination. A total of 20 strains were included to the study, of which 19 were clinical isolates (10 *Candida albicans*, 4 *Candida glabrata*, 2 *Candida parapsilosis*, 1 *Candida tropicalis*, 1 *Candida pelliculosa* ve 1 *Candida sake*) and 1 was a standard strain (*C. albicans* ATCC 90028). In vitro susceptibilities of the strains to MOX with AmB were investigated by broth microdilution method according to the recommendations of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), and in vitro interaction of these drugs were determined by a checkerboard titration method. Minimal inhibitory concentration (MIC) values of *Candida* spp. for MOX were found ≥ 400 $\mu\text{g/ml}$ indicating that MOX, by itself has no antifungal activity. AmB MIC values were found 1 $\mu\text{g/ml}$ in 11 of the clinical isolates, and ≤ 0.5 $\mu\text{g/ml}$ in the other 8 clinical isolates and 1 standard strain. The inhibitor activity of AmB was slightly enhanced when combined with MOX, there being a decrease of 1-4 fold dilutions in the AmB MICs against all isolates tested. Synergistic effect between MOX and AmB, defined as a fractional inhibitory concentration (FIC) index as ≤ 0.5 , was observed in 90% (18/20; all were clinical isolates) of the strains, whereas indifferent effect (FIC= 1) was detected in 10% (2/20; 1 was clinical and 1 was standard strain) of the strains. Antagonistic effect was not observed for this combination even at 48th hours. It was concluded that these preliminary results should be confirmed by large-scaled in vitro and in vivo studies to evaluate MOX + AmB combination as a therapeutic option for the treatment of *Candida* infections.

Key words: Amfoterisin B, moxifloxacin, synergy, antifungal, checkerboard, FIC.

GİRİŞ

Florokinolonlar, DNA giraz (topoizomeraz II) enzimini inhibe etmek suretiyle DNA replikasyonunu ve transkripsiyonunu bozarak bakteri hücrelerini öldürürler¹. DNA topoizomerazlar hem prokaryot hem de ökaryot mikroorganizmalarda bulunan enzimlerdir. Bu nedenle mantarlar üzerine etkili olabilecekleri öngörülerek, bazı in vitro çalışmalar yürütülmüştür. Bu çalışmalarda, florokinolonların mantarlarda yüksek miktarda bulunan topoizomeraz I ve II enzimleri üzerine etkileri sonucu oluşan bir antifungal etki gösterilmiştir^{2,3}.

Mantar enfeksiyonları gelişmesi açısından risk altındaki hastalar aynı zamanda bakteri enfeksiyonları açısından da risk altındadır. Bu grupta yer alan hastalarda antibakteriyel ilaçlar ve antifungal ilaçlar genellikle birlikte kullanılmaktadır. Bu nedenle florokinolonların antifungal ilaçlar ile birlikte kullanılma olasılığı yüksektir. Florokinolonlar tek başlarına antifungal etkili değildir ve mantar enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılmazlar¹. Ancak, antifungal ilaçlar ile birlikte kullanıldıklarında oluşabilecek etkileşimin sinerjik mi yoksa antagonistik mi olduğu önemlidir. Bu çalışmada, *Candida* klinik izolatlarının tek başlarına moksifloksasin (MOX)'e ve MOX + amfoterisin B (AmB) kombinasyonuna karşı in vitro duyarlılıklarının araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmaya, 10 *Candida albicans*, 4 *Candida glabrata*, 2 *Candida parapsilosis*, 1 *Candida tropicalis*, 1 *Candida pelliculosa* ve 1 *Candida sake* olmak üzere 19 klinik *Candida* izolatı ile 1 referans suş (*C.albicans* ATCC 90028) dahil edildi. Tüm suşların MOX için minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK) değerleri mikrodilüsyon yöntemi ile "Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)" M27-A3 önerilerine göre belirlendi⁴. Aynı suşların ayrıca AmB için in vitro duyarlılıkları da tespit edildi. MİK değerleri her iki ilaç için de 24 ve 48. saatlerde belirlendi.

Her iki ilacın etkileşimini göstermek amacı ile dama tahtası (checkerboard) mikrodilüsyon yöntemi uygulandı⁵. Hem mikrodilüsyon hem de dama tahtası yönteminde aynı ilaçların sulandırılmaları kullanıldı. Doksan altı kuyucuklu, U tabanlı mikropalaklarda gerçekleştirilen dama tahtası yönteminde; mikropalakların soldan sağa ilk 10 kuyucuğuna AmB'nin seri sulandırılmaları, yukarıdan aşağı ilk 8 kuyucuğuna ise MOX'un seri sulandırılmaları dağıtıldı. İlaç sulandırım aralığı AmB için 0.03-16 µg/ml; MOX için 400-3.13 µg/ml arasında düzenlendi. Her iki ilaç için de, kontrol kuyucuğuna göre üremenin tam inhibe olduğu ilk kuyucuk MİK değeri olarak kabul edildi.

Kombinasyon testinin değerlendirilmesi fraksiyonel inhibitör konsantrasyonu (FİK) indeksine göre yapıldı^{6,7}. FİK için şu formül kullanıldı: $FİK = (MİK_A + MİK_B / MİK_A) + (MİK_A + MİK_B / MİK_B)$. FİK indeksi ≤ 0.5 ise, yani iki ilaç bir arada iken bulunan MİK değeri, tek başına olduğunda bulunan değerden daha az veya eşit ise sinerjistik; $> 0.5-4$ arasında ise "indifferent" ve > 4 ise antagonistik olarak kabul edildi⁶⁻⁹.

BULGULAR

Çalışmamızda, *Candida* türlerinin MOX için MİK değerleri ≥ 400 µg/ml olarak bulunmuştur. Bu doz, ilacın in vivo kullanım dozunun üzerinde olduğundan, MOX'un tek başına *Candida* türleri üzerine etkisiz olduğu saptanmıştır. AmB MİK değerleri ise, 11 klinik suş için 1 µg/ml, 5 suş için 0.5 µg/ml, 2 suş için 0.25 µg/ml ve 1 suş için 0.125 µg/ml olarak belirlenirken, *C.albicans* ATCC 90028 standart suşunun AmB MİK değeri 0.125 µg/ml olarak tespit edilmiştir.

Dama tahtası yöntemi sonuçlarına göre; MOX eklenmesi ile AmB MİK değerleri, test edilen suşlara göre değişmekle birlikte, 1-4 dilüsyon arasında; MOX MİK değerleri ise 1-3 dilüsyon arasında azalmıştır (50-200 µg/ml). Suşların AmB ve MOX MİK değerleri, kombinasyondaki MİK değerleri ve FİK indeksleri Tablo 1'de gösterilmiştir.

Çalışılan suşların 18'inde (klinik suşlar) FİK < 0.5 ve 2'sinde (biri klinik, biri standart suş) FİK= 1 olarak bulunmuş; dolayısıyla AmB ve MOX kombinasyonunun, suşların %90 (18/20)'ı üzerinde sinerjistik etki, %10 (2/20)'ü üzerinde ise "indifferent" etki gösterdiği izlenmiştir.

Tablo 1. Tüm Suşların Amfoterisin B ve Moksifloksasin MİK Değerleri ile FİK İndeksleri

Suş	MİK değerleri (µg/ml)		Kombinasyondaki MİK değerleri (µg/ml)		FİK	Sonuç
	AmB	MOX	AmB	MOX		
<i>Candida albicans</i>	1	400	0.5	200	< 0.5	S
<i>Candida albicans</i>	1	400	0.25	200	< 0.5	S
<i>Candida albicans</i>	1	400	0.125	100	< 0.5	S
<i>Candida albicans</i>	1	400	0.125	100	< 0.5	S
<i>Candida albicans</i>	1	400	0.06	200	< 0.5	S
<i>Candida albicans</i>	1	400	0.03	100	< 0.5	S
<i>Candida albicans</i>	1	400	0.06	50	< 0.5	S
<i>Candida glabrata</i>	1	400	0.125	200	< 0.5	S
<i>Candida parapsilosis</i>	1	400	0.25	100	< 0.5	S
<i>Candida tropicalis</i>	1	400	0.25	100	< 0.5	S
<i>Candida sake</i>	1	400	0.125	100	< 0.5	S
<i>Candida albicans</i>	0.5	400	0.125	200	0.5	S
<i>Candida albicans</i>	0.5	400	0.5	200	1	I
<i>Candida glabrata</i>	0.5	400	0.125	100	< 0.5	S
<i>Candida parapsilosis</i>	0.5	400	0.06	100	< 0.5	S
<i>Candida pelliculosa</i>	0.5	400	0.25	100	0.5	S
<i>Candida glabrata</i>	0.25	400	0.03	50	< 0.5	S
<i>Candida glabrata</i>	0.25	400	0.06	100	< 0.5	S
<i>Candida albicans</i>	0.125	400	0.125	200	1	I
ATCC	0.125	400	0.03	100	< 0.5	S

MİK: Minimum inhibitör konsantrasyonu, FİK: Fraksiyonel inhibitör konsantrasyonu, AmB: Amfoterisin B, MOX: Moksifloksasin, S: Sinerji, I: Indifference.

TARTIŞMA

Kinolonların antifungal etkinlikleri ile ilgili çeşitli in vivo ve in vitro araştırmalar, 1990'lı yıllardan itibaren yapılmaktadır. Bu çalışmaların bazılarında kinolonların antifungal ilaçların etkinliğini artırdıkları^{10,11}, bazılarında iki ilaç arasında etkileşim bulunmadığı¹²; bazılarında ise florokinolonların tek başına antifungal etkinliklerinin olduğu¹³ bildirilmiştir. Vitale ve arkadaşları¹⁴ *Exophiala spinifera* suşları ile yaptıkları in vitro çalışmada, AmB ile siprofloksasin ve itrakonazol ile siprofloksasin arasında sinerjistik etki olduğunu göstermişlerdir¹⁴. Diğer çalışmalarda da in vivo modellerde florokinolonlar ile antifungal etkinin arttığı bildirilmektedir^{10,12,15}. Ancak bazı in vitro çalışmalarda florokinolonlar ile AmB arasında sinerjistik aktivite bulunamamıştır. Örneğin; Stergiopolou ve arkadaşları¹⁶, sinerjistik aktivite değerlendirilmesinde dama tahtası yönteminde elde edi-

len sonuçları hem FK indeksi hem de regresyon analizi ile incelemişlerdir. FK indeksi hesaplandığında AmB ve siprofloksasin, flukonazol ve siprofloksasin, kaspofungin ve siprofloksasin arasında sinerjistik bir aktivite gözlenmezken; aynı sonuçlar regresyon analizi ile bir kere daha değerlendirildiğinde siprofloksasin ile bütün antifungal ilaçlar arasında belirgin bir sinerji olduğu gösterilmiştir¹⁶. Aynı araştırmacılar bir sonraki çalışmalarında siprofloksasin ile birlikte MOX ve levofloksasinin AmB, flukonazol, vorikonazol ve kaspofungin ile etkileşimini incelemişler ve kombinasyon testi sonuçlarına regresyon analizi yapıldığında, her üç kinolonun da antifungal etkiyi artırdığını doğrulamışlardır¹⁷. Sasaki ve arkadaşları¹² flukonazole dirençli *C.albicans* suşları ile yaptıkları çalışmada, ofloksasin ile flukonazolün kombine edilmesinin in vitro olarak sinerjistik etkili olmadığını, ancak aynı kombinasyonun farelerde dalak ve böbreklerde mantar yükünü azalttığını göstermişlerdir. Özdek ve arkadaşlarının¹³ in vitro duyarlılık çalışmasında ise, göz enfeksiyonu etkeni olarak izole edilen *Candida* türlerine karşı MOX ve gatifloksasinin tek başlarına antifungal etkili olduğu bulunmuştur. Bazı araştırmacılar da, MOX'un *Candida* enfeksiyonlarında immünomodülatör etki gösterdiğini ifade etmektedir^{18,19}. Shalit ve arkadaşları¹⁹, *C.albicans* indüksiyonu ile bronkopnömoni geliştirilen farelerde MOX, pnömoninin şiddetini, kilo kaybını ve mortaliteyi azalttığını ve sitokin üretimini sınırlandırdığını göstermişlerdir.

Bizim yaptığımız in vitro çalışmada, MOX'un tek başına *Candida* türleri üzerinde antifungal etkisi olmadığı, ancak AmB ile kombine edildiği zaman AmB MK değerlerini 1-4 dilüsyon arasında azalttığı gösterilmiştir. Her iki ilacın kombinasyonu durumunda MOX MK değerleri de 1-3 dilüsyon arasında azalmıştır. Bu azaltma, özellikle AmB MK değerleri 1 µg/ml olan suşlar için anlamlıdır. Aslında AmB ile yapılan in vitro duyarlılık test sonuçlarının in vivo elde edilen sonuçlarla korelasyonunun olmadığı belirtilmektedir²⁰. Ancak in vitro olarak uygulanan kombinasyon testleriyle elde edilen sonuçlar için böyle bir uyumsuzluk rapor edilmemiştir. Yaptığımız bu çalışma ile AmB ve MOX'un bir arada kullanımının antagonistik etki oluşturmadığı, test edilen suşların %90'ında sinerjistik etki elde edildiği gösterilmiştir. Bu sonuçların elbette ki klinik araştırmalar ile desteklenmesi gereklidir. Konu ile ilgili yapılacak olan klinik çalışmalar, her iki ilacın bir arada kullanılabilmesi ve bu kombinasyonun, doza bağlı yan etkileri olan AmB'nin dozunun azaltılmasına katkıda bulunabilmesi konusunda açıklayıcı bilgiler sağlayacaktır.

Çalışmamızda elde edilen sonuçlar, suş sayılarının az olması nedeniyle her bir *Candida* türü için ayrı ayrı tartışılmamış; ancak çok sayıda dilüsyonun denenmesi nedeniyle suşlar AmB MK değerlerinin 1 µg/ml (11 klinik suş) ve < 1 µg/ml (8 klinik, 1 kontrol suş) olmasına göre gruplanarak irdelenmiştir.

AmB ve MOX'un arasındaki etkileşim mekanizmaları arasında; mantar hücresinin geçirgenliğinin artması, hücre içinde ölçülebilir miktarda kinolon düzeyine ulaşılması veya AmB ile MOX'un hücre içindeki etkileşimleri yer alıyor olabilir. Çalışmamızın bulguları, ileride gerek daha fazla sayıda ve türde izolatu içeren in vitro, gerekse in vivo çalışmalar ile desteklenebildiği takdirde, *Candida* türleri tarafından oluşturulan enfeksiyonların tedavisinde yararlı olabilecek yeni kombinasyon seçenekleri sağlanabilir.

KAYNAKLAR

1. Bradbury BJ, Pucci MJ. Recent advances in bacterial topoisomerase inhibitors. *Curr Opin Pharmacol* 2008; 8: 574-81.
2. Shen LL, Baranowski J, Fostel J, Montgomery DA, Lartey PA. DNA topoisomerases from pathogenic fungi: targets for the discovery of antifungal drugs. *Antimicrob Agents Chemother* 1992; 36: 2778-84.
3. Polak A. In vitro and in vivo activity of antifungal agents in combination with fleroxacin, a new quinolone. *Mycoses* 1990; 33: 173-8.
4. Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution susceptibility testing of yeasts. Approved Standard, Document M27-A3. 2008, 3rd ed. CLSI, Wayne, Pennsylvania.
5. Isenberg HD (ed). Synergism testing: broth microdilution checkerboard and broth macrodilution methods, pp: 5.18.1. In: *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. 1992, Vol I. American Society for Microbiology, Washington, DC.
6. Odds FC. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. *J Antimicrob Chemother* 2003; 52: 1.
7. Cuenca-Estrella M. Combinations of antifungal agents in therapy-what value are they? *Antimicrob Chemother* 2004; 54: 854-69.
8. Oliveira ER, Fothergill AW, Kirkpatrick WR, Coco BJ, Patterson TF, Redding SW. In vitro interaction of posaconazole and caspofungin against clinical isolates of *Candida glabrata*. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 3544-5.
9. Kiraz N, Dag I, Yamac M, Kiremitci A, Kasifoglu N, Akgun Y. Antifungal activity of caspofungin in combination with amphotericin B against *Candida glabrata*: comparison of disk diffusion, Etest, and time-kill methods. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53: 788-90.
10. Nakajima R, Kitamura A, Someya K, Tanaka M, Sato K. In vitro and in vivo antifungal activities of DU-6859a, a fluoroquinolone, in combination with amphotericin B and fluconazole against pathogenic fungi. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39: 1517-21.
11. Sugar AM, Liu XP, Chen RJ. Effectiveness of quinolone antibiotics in modulating the effects of antifungal drugs. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41: 2518-21.
12. Sasaki E, Maesaki S, Miyazaki Y, et al. Synergistic effect of ofloxacin and fluconazole against azole-resistant *Candida albicans*. *J Infect Chemother* 2000; 6: 151-4.
13. Ozdek SC, Miller D, Flynn PM, Flynn HW. In vitro antifungal activity of the fourth generation fluoroquinolones against *Candida* isolates from human ocular infections. *Ocul Immunol Inflamm* 2006; 14: 347-51.
14. Vitale RG, Afeltra J, de Hoog GS, Rijs AJ, Verweij PE. In vitro activity of amphotericin B and itraconazole in combination with flucytosine, sulfadiazine and quinolones against *Exophiala spinifera*. *J Antimicrob Chemother* 2003; 51: 1297-300.
15. Sugar AM, Liu XP. Combination antifungal therapy in treatment of murine pulmonary mucormycosis: roles of quinolones and azoles. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 2004-6.
16. Stergiopoulou T, Meletiadiis J, Sein T, et al. Isobolographic analysis of pharmacodynamic interactions between antifungal agents and ciprofloxacin against *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52: 2196-204.
17. Stergiopoulou T, Meletiadiis J, Sein T, et al. Comparative pharmacodynamic interaction analysis between ciprofloxacin, moxifloxacin and levofloxacin and antifungal agents against *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. *J Antimicrob Chemother* 2009; 63: 343-8.
18. Gruger T, Morler C, Schnitzler N, et al. Influence of fluoroquinolones on phagocytosis and killing of *Candida albicans* by human polymorphonuclear neutrophils. *Med Mycol* 2008; 46: 675-84.
19. Shalit I, Horev-Azaria L, Fabian I, et al. Immunomodulatory and protective effects of moxifloxacin against *Candida albicans*-induced bronchopneumonia in mice injected with cyclophosphamide. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 2442-49.
20. Arkan S. Current status of antifungal susceptibility testing methods. *Med Mycol* 2007; 45: 569-87.