

## AKTYWNOŚĆ LEKÓW AZOLOWYCH *IN VITRO* WOBEC SZCZEPÓW *CANDIDA ALBICANS* O RÓŻNYCH KODACH WYODRĘBNIONYCH Z PRZEWODU POKARMOWEGO DZIECI

MAREK KURNATOWSKI<sup>1</sup>, ALICJA KURNATOWSKA<sup>2</sup> I KRYSZYNA WĄSOWSKA-KRÓLIKOWSKA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Klinika Gastroenterologii i Alergologii Dziecięcej Instytutu Pediatrii, Uniwersytet Medyczny, ul. Sporna 36/50, 91-738 Łódź; <sup>2</sup>Zakład Biologii i Parazytologii Lekarskiej Katedry Biologii i Genetyki Medycznej, Uniwersytet Medyczny, Pl. Gen. J. Hallera 1, 90-647 Łódź;  
E-mail: katbiol@poczta.onet.pl

**ABSTRACT.** Activity of the azole drugs *in vitro* against strains of *Candida albicans* with different codes isolated from the digestive tract in children. The activity of ketoconazole (K, R04 1400 molecular weight 531.44), miconazole (M, R01 4889, molecular weight 479.15) and itraconazole (I, R05 1211, molecular weight 705.64) obtained from Janssen Pharmaceutica NV, against *Candida albicans* strains was studied. The axenic fungal strains were isolated from the faecal samples of children – not previously treated with antifungal drugs – with clinical symptoms suggesting the inflammation of the mucous membrane in the stomach and/or duodenum. The strains were assessed by own methods and unified tests (bioMérieux: API 20 C, API 20 C AUX). Five codes of *Candida albicans* Berkhout were found. The minimal inhibitory concentration (MIC) values were calculated from 448 dose-response curves according to the agar diffusion – Kadłubowski's method. MICs were also examined by analyzing the variation (min-max,  $\bar{x}$  mean  $\pm$  standard error, mode Mo, median Me). It was demonstrated that all the strains used in the study were susceptible to the azoles drugs.

**Key words:** activity of the azoles, *Candida albicans* strains, children, digestive tract.

### WSTĘP

W badaniach wcześniejszych (Kurnatowski i wsp. 2002) udowodniono wysoką prewalencję grzybów rodzaju *Candida* w układzie trawiennym, wzrastającą istotnie ( $p < 0,01$ ) w grupach dzieci w okresie szkolnym (do ok. 70%). Wobec wielu obserwowanych powikłań tych zarażeń stało się konieczne określenie wrażliwości grzybów, zwłaszcza szczepów *Candida albicans* o dużej różnorodności biochemicznych cech wewnątrzgatunkowych na związki azolowe, wprowadzane ostatnio w różnych postaciach kandydozy. Dane z piśmiennictwa uzasadniają bezsporną konieczność korzystania z opisywanych szeroko leków azolowych podawanych *per os*, coraz lepiej poznawanych w sensie farmakodynamicznym (Terrel i Hughes 1992, Patel 1998, Terrel 1999). Autorzy amerykańscy (Rex i wsp. 2000), podkreślając różnice

wrażliwości na leki między szczepami *Candida* określonych gatunków, uznali pełną aktywność (100% szczepów) preparatów azolowych wobec *C. albicans*.

Celem wykonanej pracy było zbadanie drażliwości na 4 leki azolowe *Candida albicans* o 5 różnych kodach wyizolowanych z przewodu pokarmowego dzieci, dotychczas nieleczonych lekami przeciwgrzybiczymi.

#### MATERIAŁ I METODY

Akseniczne szczepy grzybów wyodrębnione z przewodu pokarmowego dzieci (wiek: 1-15 r.ż.) oznaczono metodami własnymi (Kurnatowska 1995) oraz unifikowanymi testami firmy bioMérieux (API 20 C, API 20C AUX) pozwalającymi na określenie gatunku i jego kodu. Do doświadczeń wybrano szczepy *Candida albicans* Berkhout, 1923, o różnych kodach opisanych z wykorzystaniem zasady numerycznej analizy (Analytis Profile Index, bioMérieux, Lyon 1990).

Drażliwość szczepów na ketokonazol (Ketoconazole, R041400 m. cz. 531,44), mikonazol (Miconazole nitrate, R014889, m. cz. 479,15), ekonazol (Econazole, R018240, m. cz. 381,69) i itrakonazol (Itraconazole, R051211, m. cz. 705,64) oznaczano w 3% żelu agarowym metodą Kadłubowskiego (Kurnatowska i wsp. 2001) używając oryginalnych substancji leków uzyskanych z Janssen Pharmaceutica NV.

Krzywe działania ketokonazolu, ekonazolu, mikonazolu, i itrakonazolu na określony szczep grzyba uzyskiwano w układzie współrzędnych prostokątnych odkładając na osi odciętych zlogarytmowane stężenia leku, a na osi rzędnych średnicę (w milimetrach) pola zahamowania wzrostu po 24 godzinach. Wykorzystywany do analizy odcinek krzywej działania o przebiegu zbliżonym do prostoliniowego, wyrażał wprost proporcjonalną, w granicach błędu, zależność między średnicą pola zahamowania wzrostu na agarze a stężeniem badanego preparatu. Zwiększając stężenie leku uzyskiwano największe (maksymalne) pole zahamowania wzrostu. Następnie porównywano graficznie krzywe działania tego samego leku oraz obliczano najmniejsze stężenie hamujące (MIC) wzrost grzyba na 112 szczepach – *Candida albicans*, o różnych kodach – wyizolowanych od dzieci. MIC obliczano z przekształconego równania regresji prostoliniowej (Kadłubowski 1971); łącznie uzyskano do oceny 448 krzywych działania.

Do analizy wyników użyto testu Shapiro-Willie oraz współczynników korelacji liniowej ( $r_{xy}$ ) i ranq Spearmana ( $r_s$ ).

#### WYNIKI BADAŃ I DYSKUSJA

Wśród 112 szczepów *Candida albicans* wyodrębnionych z przewodu pokarmowego dzieci odczytano aż 5 różnych kodów – świadczących o różnorodności ich cech biochemicznych – związanych z możliwością wykorzystywania węgla podczas asymilacji określonych związków.

Wykrywane dla omawianego zbioru szczepów kody zestawiono i opisano w Tabeli 1.

Tabela 1. Zestawienie i opis kodów aksenicznych szczepów *Candida albicans*

Kod – grupy ABCDEFG	Opis/zmiany*
2576174	A: glukoza; B: 2-keto-D-glukonian i ksyloza; C: adonitol, ksylitol i galaktoza; D: sorbitol i L-metylo-D-glukozyd; E: N-acetylo-D-glukozamina; F: maltoza, sacharoza, trehaloza; G: obecne strzępki lub pseudostrzępki
2176174	w B: tylko 2-keto-D-glukonian
2476164	w B: tylko ksyloza; w F: sacharoza i trehaloza
2776174	w B: dodatkowo L-arabinoza
2566174	w C: adonitol i galaktoza

\* zmiany wobec kodu: 2576174, z pełnym opisem

Kod 2576174 najczęściej oznaczany ( $80,4 \pm 3,75\%$  szczepów) różnił się od następnego tylko zapisem 1. na drugim miejscu, tj. przyswajaniem węgla z 2-keto-D-glukonianu ( $11,6 \pm 3,0\%$ ); w dalszym kodzie ( $6,25 \pm 2,3\%$ ) na drugim miejscu liczby 4. i na szóstym 6. świadczyły o asymilacji ksylozy (w B) oraz sacharozy i trehalozy (w F). Następny kod ( $0,89 \pm 0,8\%$ ) różnił się od najczęstszego przyswajaniem węgla także z L-arabinozy (w B), zaś w kodzie 2566174 ( $0,89 \pm 0,8\%$ ) adonitolu i galaktozy (w C).

Wartości najmniejszych stężeń hamujących (MIC) ketokonazolu obliczonych z krzywych działania wobec szczepów o różnych kodach oraz wybrane parametry (min-max,  $\bar{x} \pm s$ , Mo, Me) rozkładu – w układzie współrzędnych prostokątnych – zestawiono w Tabeli 2.

Tabela 2. Wartości MIC\* ketokonazolu uzyskane dla szczepów *C. albicans* o różnych kodach

Kod	Liczba szczepów N	Parametry rozkładu wartości MIC mg/l			
		min-max	$\bar{x} \pm s$	Mo	Me
2576174	90	$\leq 0,01 - 1,89$	$0,61 \pm 0,12$	0,74	0,60
2176174	13	0,14 – 2,20	$0,99 \pm 0,21$	1,34	0,82
2476164	7	0,03 – 3,0	$1,61 \pm 0,59$	1,92	0,92
2776174	1	0	1,02	0	0
2566174	1	0	1,45	0	0

\* MIC – najmniejsze stężenie hamujące

$\bar{x} \pm s$  – wartość średnia MIC  $\pm$  błąd standardowy

Mo – modalna, Me – mediana

Średnie wartości najmniejszych stężeń hamujących (MIC) ketokonazolu dla wszystkich zbadanych szczepów *C. albicans* wahały się w granicach od 0,01 do 3,0 mg/l.

Najniższa wartość MIC ketokonazolu cechowała szczep o kodzie 2576174 ( $n = 90$ ); rozkład wartości MIC ( $Mo > Me > \bar{x}$ ) świadczył o niewielkiej asymetrii prawej.

Natomiast dla szczepów o kodzie 2176174 ( $n = 13$ )  $\bar{x}$  MIC ketokonazolu była nieznacznie wyższa od uzyskanej dla poprzedniej grupy szczepów ( $p > 0,05$ ), zaś o kodzie 2476164 ( $n = 7$ ) wartość MIC omawianego leku była istotnie wyższa ( $p < 0,02$ ); rozkład wartości MIC łącznej liczby tych 20 szczepów, o dwóch kodach, cechował się niewielką asymetrią lewą.

Średnie wartości najmniejszych stężeń hamujących (MIC) mikonazolu dla szczepów *C. albicans* o różnych kodach wahały się od 0,18 do 0,75 mg/l (Tabela 3). Najniższa wartość MIC omawianego leku dotyczyła szczepów o kodzie 2176174 ( $n = 13$ ). Rozkład wartości MIC dla mikonazolu dla wszystkich zbadanych szczepów cechował się średnio asymetrią lewą ( $Mo < Me < \bar{x}$ ).

Tabela 3. Wartości MIC\* mikonazolu uzyskane dla szczepów *C. albicans* o różnych kodach

Kod	Liczba szczepów		Parametry rozkładu wartości MIC mg/l			
	N		min-max	$\bar{x} \pm s$	Mo	Me
2576174	90		0,06 – 2,0	0,75 $\pm$ 0,11	0,58	0,72
2176174	13		0,02 – 1,3	0,18 $\pm$ 0,02	0,39	0,63
2476164	7		0,01 – 1,5	0,70 $\pm$ 0,05	0	0
2776174	1		0	0,29	0	0
2566174	1		0	1,40	0	0

\* MIC – najmniejsze stężenie hamujące

$\bar{x} \pm s$  – wartość średnia MIC  $\pm$  błąd standardowy

Mo – modalna, Me – mediana

Średnie wartości najmniejszych stężeń hamujących (MIC) ekonazolu zbadanych szczepów *C. albicans* mieściły się w zakresie od 0,75 do 2,02 mg/l (Tabela 4). Nie różniły się statystycznie istotnie ( $p > 0,05$ ) dla szczepów o kodach 2576174 i 2176174. MIC średni dla ekonazolu dla pozostałych szczepów ( $n = 9$ ) był wyższy ( $p < 0,05$ ). Rozkład tych wartości otrzymanych dla wszystkich ocenianych szczepów *C. albicans* wobec ekonazolu był asymetryczny.

Tabela 4. Wartości MIC\* ekonazolu uzyskane dla szczepów *C. albicans* o różnych kodach

Kod	Liczba szczepów		Parametry rozkładu wartości MIC mg/l			
	N		min-max	$\bar{x} \pm s$	Mo	Me
2576174	90		$\leq 0,1 - 16,5$	0,82 $\pm$ 0,19	1,13	1,62
2176174	13		0,05 – 9,7	0,75 $\pm$ 0,23	1,22	1,07
2476164	7		0,01 – 10,4	2,02 $\pm$ 0,11	0	0
2776174	1		0	1,06	0	0
2566174	1		0	3,03	0	0

\* MIC – najmniejsze stężenie hamujące

$\bar{x} \pm s$  – wartość średnia MIC  $\pm$  błąd standardowy

Mo – modalna, Me – mediana

Średnie wartości najmniejszych stężeń hamujących (MIC) itrakonazolu mieściły się w granicach 0,18-0,58 mg/l (Tabela 5). Najniższą wartość MIC uzyskano dla szczepu o kodzie 2776174 (0,13 mg/l) oraz szczepów o kodzie 2576174 (0,18 mg/l). Rozkład wszystkich wartości MIC dla omawianego leku charakteryzował się znaczną symetrią, o cechach zbliżonych do krzywej rozkładu normalnego.

Tabela 5. Wartości MIC\* itrakonazolu uzyskane dla szczepów *C. albicans* o różnych kodach

Kod	Liczba szczepów N	Parametry rozkładu wartości MIC mg/l			
		min-max	$\bar{x} \pm s$	Mo	Me
2576174	90	≤ 0,01 – 1,0	0,18 ± 0,02	0,59	0,41
2176174	13	0,03 – 4,2	0,24 ± 0,07	0,72	0,33
2476164	7	≤ 0,03 – 3,8	0,58 ± 0,05	0	0
2776174	1	0	0,13	0	0
2566174	1	0	0,56	0	0

\* MIC – najmniejsze stężenie hamujące

$\bar{x} \pm s$  – wartość średnia MIC ± błąd standardowy

Mo – modalna, Me – mediana

Warto jeszcze raz przypomnieć, że od wielu już lat (Kadłubowski 1971) w naszym ośrodku – określając wrażliwość szczepów grzybów na związki chemiczne – doświadczenia prowadzimy wg procedury pozwalającej na uzyskanie krzywych działania w układzie półlogarytmicznym i obliczanie z nich najmniejszego stężenia hamującego (MIC), z przekształconego równania regresji prostoliniowej. To pozwala na wykorzystywanie wartości MIC do analizy wieloboków zmienności (wartości średnie i inne) umożliwiając porównawczą ocenę wrażliwości grzybów w zbiorach szczepów uzyskiwanych od pacjentów leczonych i nieleczonych określonym lekiem (Kurnatowska i Kwaśniewska. 1978).

Prezentowane w omawianej pracy dane dotyczące wrażliwości na 4 leki azolowe szczepów *Candida albicans* wyodrębnionych od dzieci dotychczas nieleczonych preparatami przeciwgrzybiczymi świadczą o wysokiej i średniej wrażliwości ich na te leki. Biorąc pod uwagę przedziały ufności dla średnich MIC wszystkie szczepy użyte w omówionych badaniach uznano za wrażliwe na 4 leki azolowe, niezależnie od opisanych kodów. Autorzy amerykańscy (Rex i wsp. 2000) zwracają uwagę na trudności porównywania wyników badań *in vitro* nad działaniem leków przeciwgrzybiczych, gdyż nawet tak często używana ostatnio metoda NCCLS M27-A stwarza trudności interpretacyjne (Wayne 1997).

Warto zwrócić uwagę, że badając wrażliwość na itrakonazol i mikonazol szczepów *Candida* wyodrębnionych z pochwy, tą samą metodą opisaną w pracy, otrzymaliśmy także szeroki zakres zmienności MIC obu leków azolowych (Kurnatowska i wsp. 2001). W teście ATB Fungus (bioMérieux) wśród szczepów *Candida* – wyodrębnionych z różnych materiałów biologicznych od osób dorosłych, większości wcześniej leczonych preparatami przeciwgrzybiczymi – uzyskano różne odset-

ki opornych na ketokonazol, ekonazol i mikonazol, lecz istotnie niższe dla *C. albicans* niż innych gatunków (Banach-Piątkowska i wsp. 2001). Porównując w odrębnych badaniach wrażliwość na mikonazol szczepów *C. albicans* i *C. glabrata* stwierdzono też większą aktywność leku wobec szczepów pierwszego gatunku niż drugiego (Kurnatowski i wsp. 2001).

Ogromna różnorodność morfologicznych i biochemicznych cech fenotypowych gatunków i szczepów grzybów chorobotwórczych (De Hoog i wsp. 2000) zmusza do ilościowej oceny ich wrażliwości na stosowane u ludzi leki.

#### LITERATURA

- Banach-Piątkowska W., Kotłowski A., Humanowska J., Mayer L., Kowalczyk D. 2001. Badania *in vitro* lekooporności szczepów grzybów z rodzaju *Candida*. *Wiadomości Parazytologiczne* 47: 811-816.
- De Hoog G.S., Guarro J., Geré J., Figueras M.J. 2000. Atlas of Clinical Fungi. *Centraalbureau voor Schimmelcultures/Universitat Rovira i Virgili*.
- Kadłubowski R. 1971. Analyse simplifiée de l'action des agents chimiques sur le *Cryptococcaceae*. *Proceedings Multicolloque Européen de Parasitologie*, Rennes: 483.
- Kurnatowska A., Kwaśniewska J. 1978. An analysis of the *in vitro* mycostatic activity of some of the antifungal antibiotics on fungal strains isolated from patients treated with these antibiotics. *Materia Medica Polona* 10: 166-169.
- Kurnatowska A. 1995. Wybrane zagadnienia mikologii medycznej. *Promedi* Łódź.
- Kurnatowska A., Horwatt-Bożyczko E., Kurnatowski P. 2001. Evaluation *in vitro* of the susceptibility on itraconazole and miconazole of fungal strains isolated from the vaginal ontocenosis. *Mycoses* 44 (suppl. 1): 39-40.
- Kurnatowski M., Wąsowska-Królikowska K., Kurnatowska A. 2002. Analiza prevalencji grzybów i ich gatunków w przewodzie pokarmowym osób dorosłych i dzieci. *Wiadomości Parazytologiczne* 48: 435-439.
- Kurnatowski P., Makięło L., Horwatt-Bożyczko E. 2001. Porównanie działania *in vitro* mikonazolu na *Candida albicans* i *Candida glabrata*. *Wiadomości Parazytologiczne* 47: 867-873.
- Patel R. 1998. Antifungal Agents. Part I. Amphotericin B preparations and flucytosine. *Mayo Clinic Proceedings* 73: 1205-1225.
- Rex J.H., Walsh T.J., Sobel J.D., Filler S.G., Pappas P.G., Dismukes W.E., Edwards J.E. 2000. Practice guidelines for the treatment of candidiasis. *Clinical Infections Diseases* 30: 662-678.
- Terrel C.L., Hughes C.E. 1992. Antifungal agents used for deep-seated mycotic infections. *Mayo Clinic Proceedings* 67: 69-91.
- Terrel C.L. 1999. Antifungal Agents. Part II. The Azoles. *Mayo Clinic Proceedings* 74: 78-100.
- Wayne P.A. 1997. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: approved standard. *National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS)*.