

Aktywność przeciwgrzybicza flukonazolu wobec klinicznych szczepów *Candida albicans* oraz innych *Candida* spp. – przegląd badań *in vitro* przeprowadzonych w różnych ośrodkach medycznych

The antifungal activity of fluconazole against clinical *Candida albicans* strains and other *Candida* spp. – the review of the research *in vitro* carried out in various medical centres

Aleksandra Garbusińska, Anna Mertas, Wojciech Król

STRESZCZENIE

Candida albicans to najczęściej izolowany gatunek w przypadku kandydoz, jednakże liczba infekcji grzybiczych z udziałem *non-albicans Candida* (*Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei*) w ostatnich latach wyraźnie wzrosła. Flukonazol jest skutecznym i dobrze tolerowanym lekiem przeciwgrzybiczym – azolem, stosowanym w formie parenteralnej lub doustnej. Lek ten celuje w 14- α -demetylazę lanosterolu (produkt genu ERG11), enzym istotny w biosyntezie ergosterolu będącego głównym składnikiem błony komórkowej grzyba. Oporność na flukonazol jest związana z istnieniem molekularnych mechanizmów, szczególnie z punktowymi mutacjami w genie ERG11 i ekspresją genów CDR1, CDR2, MDR1 kodujących tzw. *efflux-pumps*, tj. system transportu niezbędny do wyrzutu flukonazolu przez błonę komórkową.

Celem niniejszej pracy było dokonanie przeglądu badań z różnych ośrodków medycznych, dotyczących oceny wrażliwości na flukonazol szczepów *Candida albicans* i innych *Candida* spp. wyizolowanych z materiałów klinicznych pobranych od hospitalizowanych pacjentów. Aktywność flukonazolu wobec izolatów drożdżaków była oceniana referencyjnymi metodami zgodnymi z zaleceniami CLSI, z przewagą metod rozcieńczeniowych, pozwalających na określenie minimalnego stężenia hamującego MIC.

Na podstawie wyników analizowanych badań można sformułować następujące wnioski:

1. Kliniczne szczepy *Candida* spp. cechują się zróżnicowanym poziomem wrażliwości na flukonazol.
2. Istotne wydaje się oznaczanie wrażliwości *Candida* spp. na flukonazol przed rozpoczęciem leczenia, w celu uzyskania pozytywnych wyników terapii.

Katedra i Zakład Mikrobiologii i Immunologii
Wydziału Lekarskiego z Oddziałem
Lekarsko-Dentystycznym w Zabrze
Śląskiego Uniwersytetu Medycznego
w Katowicach

ADRES

DO KORESPONDENCJI:

Dr n. med. Anna Mertas
Katedra i Zakład Mikrobiologii i Immunologii
Wydziału Lekarskiego
z Oddziałem Lekarsko-Dentystycznym
w Zabrze
Śląskiego Uniwersytetu Medycznego
w Katowicach
ul. Jordana 19
41-808 Zabrze
Tel./fax: (32) 272 25 54
e-mail: amertas@sum.edu.pl

Ann. Acad. Med. Siles. 2011, 65, 4, 29–37
Copyright © Śląski Uniwersytet Medyczny
w Katowicach
ISSN 0208-5607

SŁOWA KLUCZOWE

Candida, kandydoza, flukonazol

ABSTRACT

Candida albicans species is the most common yeast isolated from the candidiasis, however the number of fungal infections caused by *non-albicans Candida* (*Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei*) has increased in recent years.

Fluconazole is an effective and well tolerated the antifungal azole drug with parenteral and oral forms. This agent directed to 14- α -demethylase lanosterol (the product of the ERG11 gene) – the enzyme important in the biosynthesis of ergosterol – the major constituent of fungal membranes. Antifungal drug resistance is associated with the molecular mechanisms, especially with the point mutations of the ERG11 gene and the expression of genes CDR1, CDR2, MDR1 encoding so called *efflux-pumps*, the system of transport fluconazole across the plasma membrane.

The aim of this study was the review of the research in various medical centres and the evaluation of the susceptibility of *Candida albicans* strains and other *Candida* spp. to fluconazole. These strains obtained from the clinical samples of the patients hospitalized. The fluconazole activity against the yeasts isolates was evaluated *in vitro* using the reference methods according by the CLSI, predominantly by the broth dilution methods with the determination the minimum inhibitory concentration MIC.

Here are the conclusions obtained on the basis of the presented research:

1. The isolates of *Candida* spp. showed different levels of susceptibility to fluconazole.
2. It's important to determine the susceptibility of *Candida* spp. to fluconazole before beginning of treatment to improve the treatment outcome.

KEY WORDS

Candida, candidiasis, fluconazole

WPROWADZENIE

Postęp w medycynie w zakresie metod diagnostycznych i leczniczych ratujących życie ciężko chorym osobom niewątpliwie obok sukcesów terapeutycznych niesie z sobą wiele negatywnych, ubocznych skutków. Długotrwała choroba, hospitalizacja, zabiegi operacyjne, terapia lekami przeciwdrobnoustrojowymi o szerokim spektrum czy preparatami obniżającymi odporność, zastosowane leczenie wspomagające, np. żywienie pozajelitowe czy inne zabiegi diagnostyczne i lecznicze, to czynniki ryzyka sprzyjające rozwojowi infekcji grzybiczych [1,2]. W publikacjach sporo uwagi poświęcono zakażeniom grzybiczym powierzchniowym i układowym, a zwłaszcza występującym najczęściej – kandydozom powodowanym przez *Candida* spp.

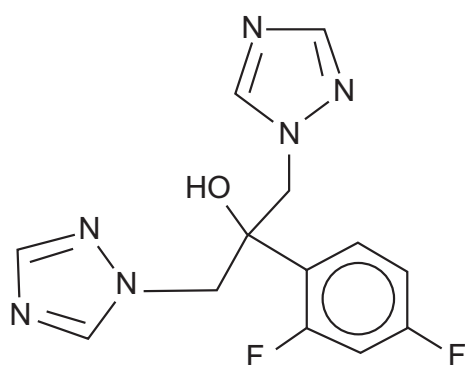
W piśmiennictwie polskim i międzynarodowym ostatnich lat, szerepy *Candida* spp. ga-

tunków: *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei* pojawiły się na wykazach najczęstszych czynników etiologicznych zakażeń grzybiczych [3,4,5,6,7,8,9]. *Candida albicans* wyraźnie dominuje w zakażeniach grzybami rodzaju *Candida*, jednakże obecnie zaznaczyła się wyraźna tendencja wzrostu infekcji powodowanych przez gatunki *non-albicans*, zwłaszcza *Candida glabrata* i *Candida krusei*, będąca rezultatem powszechnego stosowania leków z grupy azoli [9].

W postępowaniu terapeutycznym wobec grzybic są do dyspozycji leki zróżnicowane pod względem struktury chemicznej oraz mechanizmów działania przeciugrzybiczego, wśród których liczną grupę stanowią azole – syntetyczne pochodne imidazolu lub triazolu, reprezentowane przez mikonazol, klotrimazol, ketokonazol, itraconazol, fluconazol, worikonazol, posakonazol czy rafikonazol.

1. FLUKONAZOL – OGÓLNA CHARAKTERYSTYKA

Flukonazol, jako pochodna triazolu, należy do najpowszechniej stosowanych doustnych leków przeciwgrzybiczych (ryc. 1). W jego przeciwdrobnoustrojowym spektrum działania znajdują się grzyby z rodzaju *Candida*, z wyjątkiem gatunków naturalnie opornych na ten lek, tj. *Candida krusei* i *Candida glabrata* [9,11], dermatofity z rodzajami: *Trichophyton*, *Microsporum*, *Epidermophyton*, grzyby dimorficzne z rodzajami: *Histoplasma*, *Blastomyces* oraz *Cryptococcus neoformans*. Wobec rodzaju *Mucor*, *Fusarium*, *Aspergillus* lek ten jest nieaktywny [12].



kilku miesiącach osiąga wysokie stężenie wynoszące 3,09–8,54 µg/g, a po 4–6 miesiącach od zakończenia leczenia utrzymuje się w stężeniu terapeutycznym w przedziale 1,45–1,7 µg/g [12].

Flukonazol stosuje się w działaniach profilaktycznych u osób o dużym ryzyku zakażenia, np. u pacjentów oddziałów intensywnej terapii, z neutropenią, chorych po przeszczepach, poddawanych chemioterapii, radioterapii itp. Badania kliniczne Corvó i wsp. [14] wykazały, że profilaktyka z użyciem flukonazolu daje u pacjentów poddawanych radioterapii znaczną redukcję tempa i czasu rozszerzania się



2-(2,4-Difluorophenyl)-
1,3-bis(1H-1,2,4-triazol-1-ilo)
propan-2-ol

C – atom węgla (atom of carbon)
H – atom wodoru (atom of hydrogen)
F – atom fluoru (atom of fluorine)
N – atom azotu (atom of nitrogen)
O – atom tlenu (atom of oxygen)

Ryc. 1. Wzór strukturalny flukonazolu [10].

Fig. 1. Chemical structure of fluconazole [10].

Flukonazol jest stosowany w leczeniu zakażeń grzybiczych zarówno powierzchniowych, jak i układowych oraz w profilaktyce przeciwgrzybiczej. Podawany w formie doustnej lub parenteralnej, charakteryzuje się bardzo dobrą kinetyką i biodostępnością, szybko wchłania się z przewodu pokarmowego, niezależnie od pH żołądkowego, spożywanego pokarmu czy stanu klinicznego chorego. Minimalnie wiąże się z białkami osocza (do 12%), odznacza się długim (do 30 godzin) okresem półtrwania, co pozwala na jego dawkowanie raz dziennie. W postaci niezmienionej osiąga wysokie stężenie w moczu, ponadto łatwo przenika do płynów ustrojowych i przez barierę krew–mózg do tkanki ośrodkowego układu nerwowego, w tym płynu mózgowo-rdzeniowego i ciała szklanego [12,13]. Szybko gromadzi się w warstwie rogowej naskórka oraz w płytce paznokcia, osiągając po 2 tygodniach trwania terapii stężenie około 50 razy wyższe niż w osoczu. Po

kandydozy jamy ustnej i gardła. Średni czas pojawienia się symptomów tego schorzenia w grupie otrzymującej flukonazol (w dawce 50 mg/dzień zaczynając od 6 sesji radioterapii lub 100 mg/dzień od rozpoczęcia radioterapii) wyniósł 56 dni, podczas gdy w grupie otrzymującej placebo 47 dni.

2. AKTYWNOŚĆ FLUKONAZOLU WOBEC
KLINICZNYCH SZCZEPÓW *CANDIDA* SPP.

W terapii grzybic niezmiernie cenne dla lekarzy dokonujących wyboru właściwego schematu leczenia są wszelkie informacje dotyczące skuteczności działania antymikotyków i zarysowujących się trendów zmian lekooporności grzybów. Tabela I zawiera przykłady wyników badań aktywności flukonazolu wobec *Candida albicans* oraz pozostałych *Candida* spp. Badania przeprowadzono metod *in vitro* zgodnymi ze standardami CLSI (*Clinical and Laboratory*

Standards Institute). Zdecydowanie przeważały metody rozcieńzeniowe wyznaczające wartości MIC flukonazolu (*minimal inhibitory concentration* – minimalne stężenie leku hamujące wzrost drobnoustrojów). Opierając się na zaleceniach CLSI przyjęto następujące kryteria

interpretacyjne wartości MIC flukonazolu dla szczepów *Candida* spp:
 – wartość $MIC_{fluk} \leq 8 \mu\text{g/ml}$ – szczep wrażliwy na flukonazol,
 – wartość $MIC_{fluk} 16\text{--}32 \mu\text{g/ml}$ – szczep średnio wrażliwy na flukonazol,

Tabela I. Przykłady oznaczonej aktywności flukonazolu wobec klinicznych szczepów *Candida albicans* oraz innych *Candida* spp. (na podstawie opublikowanych wyników badań *in vitro* uzyskanych w różnych ośrodkach medycznych)

Table I. Examples of the activity of fluconazole determined against clinical *Candida albicans* strains and other *Candida* spp. (on the basis of the published outcomes *in vitro* obtained from the different medical centres)

Badane szczepy kliniczne z rodzaju <i>Candida</i>	Aktywność flukonazolu wobec badanych szczepów		Publikacje
	wyrażona jako odsetek badanych szczepów: $R_f/I_f/S_f$	wyrażona wartościami hamującymi $MIC/MIC_{50}/MIC_{90}$	
1	2	3	4
Szczepy wyhodowane z jamy ustnej pacjentów HIV+ n = 91 <i>Candida</i> spp., w tym: n = 83 <i>C. albicans</i>	$R_f = \text{ok. } 3,3\%$ (3 szczepy)	MIC: od 0,12–64 $\mu\text{g/ml}$ $MIC_{50} = 0,25 \mu\text{g/ml}$ $MIC_{90} = 8,0 \mu\text{g/ml}$ MIC: od 0,12–64 $\mu\text{g/ml}$ $MIC_{50} = 0,25 \mu\text{g/ml}$ $MIC_{90} = 8,0 \mu\text{g/ml}$	Traboulsi i wsp. [1]
Szczepy wyhodowane z jamy ustnej, skóry, dróg moczowych, paznokci, pochwy, n = 284 <i>C. albicans</i>	$R_f = \text{ok. } 2,1\%$	MIC: od 0,25–64 $\mu\text{g/ml}$ $MIC_{50} = 0,3 \mu\text{g/ml}$ $MIC_{90} = 4,0 \mu\text{g/ml}$	Jafari-nodoushann i wsp. [6]
Szczepy wyhodowane z różnych prób klinicznych n = 142 <i>Candida</i> spp., w tym: <i>C. albicans</i> (65,5%)	$R_f = \text{ok. } 12\%$ $R_f = \text{ok. } 15,1\%$	– –	Skrodeniené i wsp. [15]
Szczepy wyhodowane z dróg moczowych, oddechowych, krwi, skóry, pochwy, itp. n = 410 <i>C. albicans</i>	$R_f = \text{ok. } 0,7\%$ $I_f = 0,7\%$ $S_f = 98,6\%$	$MIC_{50} = 0,25 \text{ mg/ml}$ $MIC_{90} = 4,0 \text{ mg/ml}$	Gualco i wsp. [16]
Szczepy wyhodowane z kolonizacji lub infekcji (krwi, moczu) <i>Candida albicans</i> : n = 8 z kolonizacji n = 19 z infekcji <i>Candida</i> spp. n = 15 z kolonizacji n = 28 z infekcji	– –	MIC od 0,125–0,5 $\mu\text{g/ml}$ MIC od 0,25–32 $\mu\text{g/ml}$ MIC od 0,25–8,0 $\mu\text{g/ml}$ MIC od 0,125–16 $\mu\text{g/ml}$	Negri i wsp. [17]
Szczepy wyhodowane z jamy ustnej pacjentów HIV+ <i>Candida albicans</i> <i>C. dubliniensis</i>	$R_f = \text{ok. } 12,2\%$ (11 szczepów) $R_f = \text{ok. } 22,7\%$ (22 szczepy)	–	Chunchanur i wsp. [18]
Szczepy wyhodowane z pochwy n = 86 <i>C. albicans</i> n = 14 <i>Candida</i> spp.	– –	MIC: $\leq 0,125\text{--}2,0 \mu\text{g/ml}$ $MIC_{50} = 0,25 \mu\text{g/ml}$ $MIC_{90} = 0,5 \mu\text{g/ml}$ MIC: 0,25– $\geq 64,0 \mu\text{g/ml}$	Arechavala i wsp. [4]

AKTYWNOŚĆ PRZECIWRZYBICZA FLUKONAZOLU

cd. tabeli I			
1	2	3	4
<p>Szczepy wyhodowane z dróg moczowych, oddechowych, krwi n = 574 <i>Candida</i> spp. w tym szczepy: – z krwi (230) – innych mat. (344) n = 282 <i>C. albicans</i> w tym szczepy: – z krwi (111) – innych mat. (171) n = 426 <i>Candida</i> spp. w tym: n = 293 <i>C. albicans</i></p>	<p style="text-align: center;">–</p> <p>$R_f = 3,5\%$ $R_f = 9,0\%$</p> <p>$R_f = 0,9\%$ $R_f = 4,1\%$ $R_f = 8,5\%$</p> <p>$R_f = 5,1\%$ (15 szczepów) $I_f = 5,5\%$ (16 szczepów) $S_f = 89,4\%$ (262 szczepy)</p>	<p style="text-align: center;">–</p> <p style="text-align: center;">–</p> <p>$MIC_{50} = 2,4 \mu\text{g/ml}$</p> <p style="text-align: center;">–</p> <p style="text-align: center;">–</p> <p style="text-align: center;">–</p>	<p>Wang i wsp. [19]</p> <p>Xu i wsp. [5]</p>
<p>Szczepy wyhodowane z jamy ustnej pacjentów HIV+ n = 50 <i>C. albicans</i></p> <p>w tym szczepy: wrażliwe na azole (n = 40)</p> <p>oporne na azole (n = 10)</p>	<p style="text-align: center;">–</p> <p style="text-align: center;">–</p> <p style="text-align: center;">–</p> <p style="text-align: center;">–</p> <p style="text-align: center;">–</p>	<p style="text-align: center;">–</p> <p>$MIC: 0,062-8,0 \mu\text{g/ml}$ $MIC_{50} = 0,12 \mu\text{g/ml}$ $MIC_{90} = 2,0 \mu\text{g/ml}$</p> <p>$MIC: 16,0-64,0 \mu\text{g/ml}$ $MIC_{50} = 32,0 \mu\text{g/ml}$ $MIC_{90} = 64,0 \mu\text{g/ml}$</p>	<p>Vazquez i wsp. [20]</p>
<p>Szczepy wyhodowane z jamy ustnej chorych z nowotworami n = 159 <i>C. albicans</i></p>	<p>$R_f = 6,9\%$ (11 szczepów)</p>	<p style="text-align: center;">–</p>	<p>Bagg i wsp. [21]</p>
<p>Szczepy wyhodowane z jamy ustnej i gardła pacjentów HIV+ n = 61 <i>C. albicans</i>, w tym szczepy: wrażliwe na azole (n = 47)</p> <p>oporne na azole (n = 14)</p>	<p style="text-align: center;">–</p> <p style="text-align: center;">–</p> <p style="text-align: center;">–</p> <p style="text-align: center;">–</p> <p style="text-align: center;">–</p>	<p style="text-align: center;">–</p> <p>$MIC: 0,125-2,0 \mu\text{g/ml}$ $MIC_{50} = 0,125 \mu\text{g/ml}$ $MIC_{90} = 0,25 \mu\text{g/ml}$</p> <p>$MIC: 32,0-64,0 \mu\text{g/ml}$ $MIC_{50} = 64,0 \mu\text{g/ml}$ $MIC_{90} = 64,0 \mu\text{g/ml}$</p>	<p>Mondello i wsp. [22]</p>
<p>Szczepy wyhodowane z kandydemii n = 16 <i>C. albicans</i></p> <p>n = 17 <i>C. non-albicans</i></p>	<p style="text-align: center;">–</p> <p style="text-align: center;">–</p> <p style="text-align: center;">–</p> <p style="text-align: center;">–</p> <p style="text-align: center;">–</p>	<p>$MIC: 0,125-2,0 \mu\text{g/ml}$ $MIC_{50} = 0,25 \mu\text{g/ml}$ $MIC_{90} = 2,0 \mu\text{g/ml}$</p> <p>$MIC: 0,125-64,0 \mu\text{g/ml}$ $MIC_{50} = 0,25 \mu\text{g/ml}$ $MIC_{90} = 1,0 \mu\text{g/ml}$</p>	<p>Passos i wsp. [23]</p>
<p>Szczepy wyhodowane z krwi, cewników, jamy brzusznej, itp. n = 512 <i>Candida</i> spp., w tym: n = 220 <i>C. albicans</i></p>	<p>$R_f = 2,5\%$ (13 szczepów)</p> <p>brak szczepów opornych</p>	<p>$MIC: \leq 0,125- \geq 64,0 \mu\text{g/ml}$ $MIC_{50} = 0,5 \mu\text{g/ml}$ $MIC_{90} = 8,0 \mu\text{g/ml}$</p> <p>$MIC: \leq 0,125-4,0 \mu\text{g/ml}$ $MIC_{50} = 0,125 \mu\text{g/ml}$ $MIC_{90} = 0,5 \mu\text{g/ml}$</p>	<p>Fleck i wsp. [3]</p>

				cd. tabeli I
1	2	3	4	
Szczepki wyhodowane z jamy ustnej i gardła n = 66 <i>C. albicans</i>	$S_f = 100,0\%$	–		Shahum i wsp. [7]
n = 29 <i>C. non-albicans</i>	$R_f = 66,0\%$ (19 szczepków)	–		
Szczepki wyhodowane od chorych z nowotworami n = 118 <i>C. albicans</i>	$R_f = \text{ok. } 4,0\%$ $I_f = \text{ok. } 3,0\%$ $S_f = \text{ok. } 92,0\%$	–		Nawrot i wsp. [24]
n = 36 <i>Candida</i> spp. (inne niż <i>C. krusei</i> <i>C. glabrata</i>)	$R_f = \text{ok. } 17,0\%$ $I_f = \text{ok. } 31,0\%$	–		
Szczepki wyhodowane z jamy ustnej, pochwy, rany, skóry, moczu, bronchoskopii, itp. n = 26 <i>C. albicans</i>	$R_f = 42,0\%$ $I_f = 31,0\%$ $S_f = 27,0\%$	–		Dynowska i wsp. [25]
Szczepki wyhodowane z krwi, śliny, rany, moczu n = 632 <i>Candida</i> spp., w tym:	$R_f = 8,4\%$ (53 szczepków) $I_f = 7,1\%$ (45 szczepków) $S_f = 84,5\%$ (534 szczepków)	–	$MIC_{50} = 1,0 \text{ mg/ml}$ $MIC_{90} = 16,0 \text{ mg/ml}$	Yang i wsp. [8]
n = 237 <i>C. albicans</i>	$R_f = 3,8\%$ (9szczepków) $I_f = 3,0\%$ (7 szczepków) $S_f = 93,2\%$ (221 szczepków)	–	$MIC_{50} = 0,5 \text{ mg/ml}$ $MIC_{90} = 4,0 \text{ mg/ml}$	
Szczepki wyhodowane z jamy ustnej i gardła pacjentów HIV+				Mondello i wsp. [26]
n = 35 <i>C. albicans</i> (wrażliwe na azole)	–		$MIC: 0,125\text{--}2,0 \text{ mg/ml}$ $MIC_{50} = 0,125 \text{ mg/ml}$ $MIC_{90} = 0,25 \text{ mg/ml}$	
n = 14 <i>C. albicans</i> (oporne na azole)	–		$MIC: 32,0\text{--}64,0 \text{ mg/ml}$ $MIC_{50} = 64,0 \text{ mg/ml}$ $MIC_{90} = 64,0 \text{ mg/ml}$	
Szczepki wyhodowane z dróg rodnych n = 611 <i>C. albicans</i>	$R_f = 0,36\%$ $I_f = 2,98\%$ $S_f = 96,66\%$	–		Macura i wsp. [9]
n = 54 <i>Candida</i> spp. (inne niż <i>C. krusei</i> <i>C. glabrata</i>)	$R_f = 0,0\text{--}16,67\%$ $I_f = 0,0\%$ $S_f = 88,3\text{--}100,0\%$	–		

n – liczba szczepków; *C. albicans* – *Candida albicans*, *C. krusei* – *Candida krusei*, *C. glabrata* = *Candida glabrata*, *C. dubliniensis* – *Candida dubliniensis*, *C. non-albicans* – gatunki z rodzaju *Candida* inne niż *C. albicans*; MIC (*Minimal Inhibitory Concentration* – minimalne stężenie hamujące) – najmniejsze stężenie leku hamujące wzrost drobnoustrojów; MIC_{50} – najmniejsze stężenie leku hamujące 50% wzrostu drobnoustrojów; MIC_{90} – najmniejsze stężenie leku hamujące 90% wzrostu drobnoustrojów; R_f – odsetek szczepków opornych na flukonazol; I_f – odsetek szczepków średniowrażliwych na flukonazol; S_f – odsetek szczepków wrażliwych na flukonazol.

n – number of the strains; *C. albicans* – *Candida albicans*, *C. krusei* – *Candida krusei*, *C. glabrata* – *Candida glabrata*, *C. dubliniensis* – *Candida dubliniensis*, *C. non-albicans* – species of *Candida* genus other than *C. albicans*; MIC (*Minimal Inhibitory Concentration*) – the least of the concentration of the drug, inhibiting of the growth of the microorganisms; MIC_{50} – the least of the concentration of the drug, inhibiting 50% of the growth of the microorganisms; MIC_{90} – the least of the concentration of the drug, inhibiting 90% of the growth of the microorganisms; R_f – percentage of the fluconazole resistant strains; I_f – percentage of the fluconazole intermediate – susceptible strains; S_f – percentage of the fluconazole susceptible strains

– wartość $MIC_{fluk} \geq 64 \mu g/ml$ – szczep oporny na flukonazol.

3. MECHANIZMY OPORNOŚCI *CANDIDA* SPP. NA FLUKONAZOL

Działanie przeciwgrzybicze flukonazolu jest powiązane ze strukturą osłon komórki grzyba. Pod kilkuwarstwową ścianą komórkową składającą się w ponad 80% z mannoprotein i β -glukanu przeplatane chityną, znajduje się błona komórkowa zbudowana z ergosterolu, lipidowego składnika analogicznego do cholesterolu komórek zwierzęcych. Ergosterol i cholesterol różnią się strukturalnie, dlatego substancje chemiczne zaburzające biosyntezę ergosterolu nie dają krzyżowych reakcji z komórkami gospodarza. Mechanizm przeciwgrzybiczej aktywności azoli, a więc i flukonazolu, polega na zahamowaniu biosyntezy ergosterolu przez inhibicję 14- α -demetylazy lanosterolu – enzymu z grupy cytochromu P 450, odpowiadającego za konwersję lanosterolu w ergosterol. Prowadzi to do wzrostu poziomu prekursorów ergosterolu, tj. toksycznych 14-metylosteroli uznawanych za źródło aktywności przeciwgrzybiczej azoli. Zahamowanie syntezy ergosterolu skutkuje zaburzeniami w strukturze błony, zmianami jej przepuszczalności i funkcji, hamowaniem wzrostu oraz podziałami komórkowymi i – w konsekwencji – zniszczeniem komórki grzyba [11,12,13,27]. Warunki środowiska oraz ekspozycja grzybów na lek może spowodować ekspresję nowo nabytych zmian genetycznych lub tłumionych do tej pory fragmentów dróg metabolicznych czy też ujawnienie istniejących, mniej wrażliwych subpopulacji grzybów. Jest to zjawisko tzw. wtórnej, nabytej oporności szczepu grzyba na lek. Zidentyfikowano trzy (opisane w pkt 3.1.–3.3) mechanizmy wtórnej oporności *Candida* spp. na flukanazol.

3.1. ZMIANA STRUKTURY 14-A-DEMETYLAZY KODOWANEJ PRZEZ GEN ERG 11

Liczne punktowe mutacje w genie ERG 11 powodują zmiany funkcjonalne w miejscu wiążącym azole poprzez pojawienie się substitutów aminokwasów, co doprowadza do obniżenia powinowactwa mutantu Erg11p do azoli [2,28,29]. Przykładem mogą być mutacje Y132H i G448V zaobserwowane przez Kamai i wsp. [28] w szczepie *Candida albicans* TIMM 3209 opornym na flukonazol i itraconazol.

Z kolei Klepser [11] opisał punktową mutację R467K w komórce *Candida* spp. polegającą na zamianie argininy przez lizynę w genie ERG 11 i przedstawił pogląd, iż szczepy kliniczne *Candida* spp. zwykle zawierają po kilka sekwencji genów pozwalających na produkcję funkcjonalnych enzymów, nawet w sytuacji wystąpienia potencjalnie letalnej mutacji w jednej kopii genów. Tak więc komórka grzyba z dwoma kopiami zmutowanego genu ERG11 powinna być znacznie mniej wrażliwa na azole niż komórka posiadająca jedynie jedną kopię tej mutacji. Xu i wsp.[5] badając 29 klinicznych szczepów *Candida albicans* o zmiennej wrażliwości na azole wykryli 37 mutacji w sekwencji ERG11, oceniając równocześnie zależność między występowaniem tych mutacji a opornością na flukonazol. Zdecydowany związek z opornością na ten lek stwierdzono w przypadku mutacji G487T i T916C, ponieważ wystąpiły one wyłącznie u szczepów *Candida albicans* opornych na flukonazol.

3.2. ZMNIEJSZENIE WEWNĄTRZKOMÓRKOWEJ KONCENTRACJI LEKU

Zjawisko to może nastąpić przez zahamowanie wejścia leku do komórki oraz przez usuwanie leku z komórki dzięki ekspresji pompy lekowej (*efflux-pumps*) czy też w rezultacie kombinacji obydwu tych mechanizmów [2,11]. Wyróżnia się dwa typy pomp lekowych:

- *efflux-pumps* wykorzystująca energię ATP, związana z kasetą transportową ABC zawierającą geny CDR (CDR1 i CDR2); ekspresja tych genów warunkuje usuwanie różnych azoli [11,27,28,29],
- *efflux-pumps* wykorzystująca siłę protonomotoryczną MFS (*major facilitator superfamily*), kodowana przez gen MDR1; ekspresja tego genu warunkuje usuwanie flukonazolu [27,28,29].

3.3. UTRATA FUNKCJI ENZYMU 5,6-DESATURAZY KODOWANEJ PRZEZ GEN ERG3

Mechanizm ten prowadzi do zmiany kierunku drogi biosyntezy ergosterolu [2,11].

Molekularne mechanizmy oporności szczepów *Candida* spp. badano metodami genetycznymi (np. PCR, RT-PCR, Northern-blot), porównując poziom ekspresji genów powiązanych ze zjawiskiem oporności na azole, występujący w przypadku szczepów opornych, wrażliwych lub o obniżonej wrażliwości na azole [2,28]. W badaniach przeprowadzonych przez Cerni-

cką [2] wszystkie flukonazooloporne szczepy *Candida albicans* oporne krzyżowo również na inne leki z grupy azoli wykazywały zwiększoną ekspresję genów ERG11, CDR1, CDR2 i MDR1. Angiolella i wsp. [30] ocenili ekspresję genów w komórkach szczepów *Candida albicans* zróżnicowanych pod względem oporności na leki. Ekspresja *efflux-pumps* zaznaczyła się w szczepie CO23_{RFLC} opornym na flukonazol, a w typie dzikim CO23_s – nie. Szczep CO23_{RFLC} wykazał silną ekspresję jedynie MDR1 (33 razy), przy niewielkim wzroście ekspresji CDR1, CDR2 i FLU1 (odpowiednio: 3,7; 3,0; 3,9), natomiast ekspresja ERG11 była podobna w szczepach CO23_s i CO23_{RFLC}. Goldman i wsp. [29] po dokonaniu analizy poziomów ekspresji genów ERG11, CDR1, CDR2 i MDR1 i FLU1 dla 20 szczepów *Candida albicans* o zmiennej wrażliwości na azole, również nie stwierdzili jednoznacznych korelacji między poziomem ekspresji poszczególnych genów a uzyskanymi wartościami MIC dla badanych szczepów. Poziomy ekspresji tych genów były bowiem często wyższe w przypadku szczepów średnio wrażliwych w porównaniu ze szczepami opornymi.

W przypadku szczepów *Candida* spp. opornych na flukonazol zaobserwowano zjawisko krzyżowej oporności na inne leki przeciwgrzybicze. Badania Cernickiej [2] wykazały, że na 22 flukonazoolopornych szczepów *Candida albicans* aż 12 było krzyżowo opornych na itraconazol, 15 na vorikonazol, 19 wykazało obniżoną wrażliwość na terbinafinę, a 1 szczep był oporny na flucytozynę. Z kolei w badaniach Goldmana i wsp. [29] z 12 izolatów *Candida albicans*, które były oporne lub średnio wrażliwe na flukonazol, aż 9 szczepów było także śred-

nio wrażliwych na itraconazol i ketokonazol, 1 szczep był oporny na itraconazol, a 2 szczepy na ketokonazol. Oporność szczepów *Candida* spp. na więcej niż jeden lek z grupy azoli wykazali także inni autorzy [22,24,28].

PODSUMOWANIE

Powszechne stosowanie flukonazolu w terapii i profilaktyce kandydoz sprzyja selekcji opornych szczepów *Candida* spp. oraz narastaniu zjawiska wtórnej oporności na ten lek. Aktywność flukonazolu wobec klinicznych szczepów *Candida* spp. była oceniana w różnych ośrodkach medycznych z zastosowaniem najczęściej referencyjnych rozcieńczeniowych metod wyznaczających wartości MIC flukonazolu. Uzyskane wyniki potwierdzają istnienie zjawiska oporności szczepów *Candida albicans* i innych *Candida* spp. na flukonazol. Wartości MIC flukonazolu pozwoliły na klasyfikację każdego badanego szczepu do odpowiedniej kategorii klinicznej: „wrażliwy”, „średnio wrażliwy” lub „oporny”. Zaobserwowana oporność na ten lek była jednak zróżnicowana w poszczególnych ośrodkach badawczych, ponieważ odsetek szczepów z rodzaju *Candida* opornych na flukonazol osiągał wartości od poniżej 1% do kilkudziesięciu procent. W tej sytuacji w ustalaniu schematów terapii kandydoz szczególne znaczenie mają badania mikologiczne z oznaczaniem lekowrażliwości wyhodowanych szczepów *Candida* spp., zarówno wykonane przed rozpoczęciem leczenia pacjenta, jak również po leczeniu w celu oceny skuteczności zastosowanej terapii.

PIŚMIENNICTWO

1. Traboulsi R.S., Mukherjee P.K., Ghanoum M.A. *In vitro* activity of inexpensive topical alternatives against *Candida* spp. isolated from the oral cavity of HIV-infected patients. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 2008; 31: 272–276.
2. Cernicka J., Subik J. Resistance mechanisms in fluconazole-resistant *Candida albicans* isolates from vaginal candidiasis. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 2006; 27: 403–408.
3. Fleck R., Dietz A., Hof H. *In vitro* susceptibility of *Candida species* to five antifungal agents in a German university hospital assessed by the reference broth microdilution method and Etest. *J. Antimicrob. Chemother.* 2007; 59: 767–771.
4. Arechavala A.I., Bianchi M.H., Robles A.M., Santiso G., Negroni R. Identification and susceptibility against fluconazole and albaconazole of 100 yeasts' strains isolated from vaginal discharge. *Rev. Iberoam. Miccol.* 2007; 24: 305–308.
5. Xu Y., Chen L., Li C. Susceptibility of clinical isolates of *Candida species* to fluconazole and detection of *Candida albicans* ERG11 mutations. *J. Antimicrob. Chemother.* 2008; 61: 798–804.
6. Jafari-nodoushan A.A., Kazemi A., Mirzaei F., Dehghani M. Fluconazole susceptibility profile of *Candida* isolates recovered from patients specimens admitted to Yazd Central Laboratory. *IJPR* 2008; 7: 69–75.
7. Shahum A., Liskova A., Kalavsky E., Krcmery V. Voriconazole resistant *Candida* spp. and *Saccharomyces* spp. isolates from oropharyngeal candidiasis from Cambodian children with AIDS not pretreated with azoles. *Scand. J. Infect. Dis.* 2007; 39: 286–287.
8. Yang Y.L., Ho Y.A., Cheng H.H., Ho M., Lo H.J. Susceptibilities of *Candida species* to amphotericin B and fluconazole: The emergence of fluconazole resistance in *Candida tropicalis*. *Infect. Control. Hosp. Epidemiol.* 2004; 25: 60–64.

9. Macura A.B., Skóra M. Wrażliwość grzybów wyizolowanych z pochwy na leki przeciwgrzybicze. *Mikol. Lek.* 2009; 16: 206–209.
10. Fluconazolium (Flukonazol). [W:] *Farmakopea Polska VIII*. Warszawa: Polskie Towarzystwo Farmaceutyczne; 2008: t. II, str. 1763.
11. Klepser M.E., Pharm D. Antifungal resistance among *Candida species*. *Pharmacotherapy*. 2001; 21: 124S–132S.
12. Baran E., Hryncewicz-Gwóźdź A., Plomer-Niezgoda E., Czarnecka A., Maj J., Cisko M. Ocena skuteczności leczenia grzybiczy paznokci flukonazolem (Fluconazole firmy Polfarmex) w dawce 300 mg raz w tygodniu – wyniki pierwszego etapu badań. *Mikol. Lek.* 2006; 13: 207–210.
13. Pappas P.G., Kauffman C.A., Andes D. i wsp. Clinical practice guidelines for the management of *candidiasis*: 2009 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin. Infect. Dis.* 2009; 48: 503–535.
14. Corvó R., Amichetti M., Ascarelli A. i wsp. Effects of fluconazole in the prophylaxis of *oropharyngeal candidiasis* in patients undergoing radiotherapy for head and neck tumour: results from a double-blind placebo-controlled trial. *Eur. J. Cancer Care* 2008; 17: 270–277.
15. Skrodenienė E., Dambrauskienė A., Vitkauskienė A. Susceptibility of yeasts to antifungal agents in Kaunas University of Medicine Hospital. *Medicina (Kaunas)* 2006; 42: 294–299.
16. Gualco L., Debbia E.A., Bandettini R. i wsp. Antifungal resistance in *Candida* spp. isolated in Italy between 2002 and 2005 from children and adults. *Int. J. Antimicrob. Agents*. 2007; 29: 179–184.
17. Negri M., Henriques M., Svidzinski T.I., Paula C.R., Oliveira R. Correlation between Etest, disk diffusion, and microdilution methods for antifungal susceptibility testing of *Candida species* from infection and colonization. *J. Clin. Lab. Anal.* 2009; 23: 324–330.
18. Chunchanur S.K., Nadgir S.D., Halesh L.H., Patil B.S., Kausar Y., Chandrasekhar M.R. Detection and antifungal susceptibility testing of oral *Candida dubliniensis* from human immunodeficiency virus-infected patients. *Indian J. Pathol. Microbiol.* 2009; 52: 501–504.
19. Wang J.L., Chang S.C., Hsueh P.R., Chen Y.C. Species distribution and fluconazole susceptibility of *Candida* clinical isolates in a medical center in 2002. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* 2004; 37: 236–241.
20. Vazquez J.A., Arganoza M.T., Boikov D., Vaishampayan J.K., Akins R.A. *In vitro* susceptibilities of *Candida* and *Aspergillus* species to *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. *Rev. Iberoam. Micol.* 2000; 17: 60–63.
21. Bagg J., Jackson M.S., Sweeney M.P., Ramage G., Davies A.N. Susceptibility to *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil of yeasts isolated from the mouths of patients with advanced cancer. *Oral Oncol.* 2006; 42: 487–492.
22. Mondello F., De Bernardis F., Girolamo A., Salvatore G., Cassone A. *In vitro* and *in vivo* activity of tea tree oil against azole-susceptible and -resistant human pathogenic yeasts. *J. Antimicrob. Chemother.* 2003; 51: 1223–1229.
23. Passos X.S., Costa C.R., Araújo C.R. i wsp. Species distribution and antifungal susceptibility patterns of *Candida* spp. bloodstream isolates from a Brazilian tertiary care hospital. *Mycopathologia*. 2007; 163: 145–151.
24. Nawrot U., Nowicka J., Juszcak K., Gusin B. Susceptibility to antifungal agents of *Candida species* isolated from paediatric and adult patients with haematological diseases. *Mycoses* 2005; 48: 385–390.
25. Dynowska M., Ejdyś E., Kisicka I. Susceptibility to antifungal agents of yeasts-like fungi and yeasts isolated from people with multifocal infections. *Mikol. Lek.* 2004; 11: 15–19.
26. Mondello F., De Bernardis F., Girolamo A., Cassone A., Salvatore G. *In vivo* activity of terpinen-4-ol, the main bioactive component of *Melaleuca alternifolia* Chel (tea tree) oil against azole-susceptible and -resistant human pathogenic *Candida species*. *BMC Infect. Dis.* 2006; 6: 158.
27. Antibiotics for research applications. Antifungals. BioFiles–Life Science. 2009; 4(3): 10. URL: <http://www.sigmaaldrich.com/life-science/learning-center/biofiles.html>.
28. Kamai Y., Maebashi K., Kudoh M. i wsp. Characterization of mechanisms of fluconazole resistance in a *Candida albicans* isolate from a Japanese patient with chronic mucocutaneous candidiasis. *Microbiol. Immunol.* 2004; 48: 937–943.
29. Goldman G.H., da Silva Ferreira M.E., dos Reis Marques E. i wsp. Evaluation of fluconazole resistance mechanisms in *Candida albicans* clinical isolates from HIV-infected patients in Brazil. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2004; 50: 25–32.
30. Angiolella L., Stringaro A.R., De Bernardis F. i wsp. Increase of virulence and its phenotypic traits in drug-resistant strains of *Candida albicans*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2008; 52: 927–936.