

TERBİNAFİN İLE FLUKONAZOL KOMBİNASYONUNUN *CANDIDA ALBICANS* KÖKENLERİNE KARŞI *IN VITRO* ETKİSİ

IN VITRO ACTIVITY OF TERBINAFINE IN COMBINATION WITH FLUCONAZOLE AGAINST *CANDIDA ALBICANS* ISOLATES

A. Serda KANTARCIOĞLU Ayhan YÜCEL

İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul

Anahtar Sözcükler: Terbinafin, flukonazol, *Candida albicans*, antifungal kombinasyon, dama tahtası (checkerboard) yöntemi

Key Words: Terbinafine, fluconazole, *Candida albicans*, antifungal combination, checkerboard method

ÖZET

Bu çalışmanın amacı, terbinafin ve flukonazolün yalnız başına ve kombinasyon halinde 31 klinik *Candida albicans* kökeni üzerine *in vitro* etkinliğini saptamak idi. Deney kökenlerinin MIC aralıkları ve %50 ve %90'ını baskılayan MIC değerleri (MIC₅₀ ve MIC₉₀ sırasıyla) mikrodilüsyon yöntemi ile terbinafin için 0.25->8 µg/ml ve 8 ile >64 µg/ml; flukonazol için 0.25->64 µg/ml ve 16 ile 64 µg/ml bulundu. İki antifungal madde arasındaki ilişki dama tahtası yöntemiyle saptandı, 18 köken (%58) için aditif ve 13 (%42) köken için sinerjikti. İki ilacın kombinasyonunda antagonistik etki saptanmadı. Bu bulgular cesaret verici olmakla birlikte, sonuçların *in vitro* ve *in vivo* uyumunun kontrollü klinik çalışmalarla araştırılması gereklidir.

SUMMARY

In the present study, the *in vitro* activity and interaction of terbinafine in combination with fluconazole were investigated against 31 clinical isolates of *Candida albicans*. With microdilution method the MIC ranges and MICs required to inhibit 50 and 90% of the test isolates (MIC₅₀s and MIC₉₀s, respectively) of terbinafine were 0.25->8 µg/ml and 8->64 µg/ml; of fluconazole were 0.25->64 µg/ml and 16-64 µg/ml. With checkerboard method the combination of these two antifungals were additive for 18 (58%) and synergistic for 13 (42%) isolates. Antagonism was not observed. These findings are encouraging, however, *in vitro* and *in vivo* correlation should be investigated in controlled clinical studies.

GİRİŞ

Son yıllarda, bağışıklığı baskılanmış hastalarda çeşitli *Candida* türleri ile oluşan derine yerleşmiş infeksiyonların insidensi artmaktadır ve tüm olguların >%75'i *Candida albicans* ile oluşmaktadır (1). Flukonazol (FLZ); ağızdan çok iyi kullanım, stabil parenteral formülasyon, polyenlerden çok daha az toksik olmak gibi birçok üstünlüklere sahip olarak sistemik *Candida* infeksiyonlarının tedavisinde

sıklıkla kullanılmaktadır. Ancak FLZ, diğer azol türevleri gibi yalnızca fungistatiktir (2, 3). Ayrıca, FLZ'e dirençli *C. albicans*'ın daha sık karşılaştığı AIDS'li ve kanserli hastalar başta olmak üzere tedavide başarısızlıklar artmaktadır (4- 6) ve bir azole direnç, ekseri bir başka azole çapraz dirençle de ilgilidir (7, 8). Bağışıklığı ciddi şekilde baskılanmış olgulardaki derin kandidozun tedavisindeki başarısızlık insidensinin artması nedeniyle, yeni daha

etkili maddeler ve/veya kullanılmakta olan antifungal maddelerin etkinliğini artıracak kombinasyonlar geliştirilmesine gereksinim duyulmaktadır. Kombinasyonlar, istenilen antifungal etkinliğe ulaştırılabilir.

Allilamin bir antimikotik olan terbinafin (TBF), dermatofitler dahil hipli mantarlara ve *C. parapsilosis* gibi bazı mayalara fungusid etkili, oral ve topikal kullanılabilen bir ilaçtır. *Candida albicans*'a karşı yalnızca fungistatik etki göstermektedir (9-13). Yüksek başarısızlık oranı nedeniyle, yanıtı artırabilme girişimi olarak antifungal maddeleri kombinasyon halinde kullanmaya büyük ilgi olmaktadır. Terbinafin ayrı bir antifungal ilaç grubuna dahil olduğundan, TBF'in diğer gruplardan antifungal ilaçlarla kombinasyonu bir tedavi olanağı olabilir. Bugüne kadar *C. albicans* kökenleri karşısında FLZ ve TBF kombinasyonunun etkinliği konusunda çok az veri yayınlanmıştır (4, 14).

Bu çalışmanın amacı, TBF ve FLZ'ün *C. albicans*'ın klinik kökenleri karşısında in vitro etkileşimini araştırmaktır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Kökenler: Bu çalışmada klinik olarak infeksiyon etkeni kabul edilen 31 *C. albicans* kökeni kullanıldı. Tüm kökenler derin mikoz kuşku hastaların klinik örneklerinden (balgam, BAL, idrar) ayrıldı. Kökenlerin tür düzeyinde tanımı morfoloji ve biyokimya yöntemleri ile yapıldı ve kökenler kullanılıncaya kadar eğri Sabouraud-dekstro-agar (SDA) besiyerinde +4° C'de sürdürüldü. Deneyden önce her köken iki kez SDA besiyeri plaklarına subkültür yapıldı ve 35° C'de 48 saat inkübe edildi. *Candida albicans* ATCC 90028 antifungallere duyarlılığın belirlendiği mikrodilüsyon deneylerinde ve *C. krusei* ATCC 6258 kombinasyon deneylerinde kontrol organizmalar olarak kullanıldı (14-18).

Antifungal maddeler: Flukonazol (Pfizer) ve TBF (Novartis) üretici firmalar tarafından, analitik düzeyde toz olarak sağlandı. Stok çözeltiler yapıldı ve kullanılıncaya kadar -70° C'de saklandı.

Deney besiyerleri: %2 glukoz katılmış, L-glutamin içeren sodyum bikarbonatsız RPMI 1640 besiyeri (Sigma) 0.165 M morfolinopropanesulfonik asit (MOPS) ile pH 7.0'a tamponlanılarak kullanıldı.

Antifungal duyarlılık deneyleri: Minimum inhibitör konsantrasyon (MIC) değerleri NCCLS referans M27-A mikrodilüsyon metoduna (15) dayandırılarak belirlendi. Stok çözeltiler steril distile suda (FLZ) veya %5 Tween 80 içeren dimetil sülfoksitte (TBF) hazırlandı. Sonraki seyreltmeler deney besiyeri ile yapıldı. Her antifungal maddenin seri olarak iki katı seyreltmeleri M27-A belgesinde belirlendiği şekilde yapıldı. Antifungal maddelerin son yoğunlukları TBF için 0.03-128 µg/ml ve FLZ için 0.125-64 µg/ml idi.

İnokulum süspansiyonu mantarları steril tuzlu suda (%0.85) asıntı yaparak hazırlandı. Sonuç inokulum yoğunluğu 0.5-2.5x10³ CFU/ml idi. Herbir mikrodilüsyon kuyucuğuna 100 µl maya asıntısı eklendi. Üreme kontrol kuyucuğu 100 µl steril ilaçsız besiyeri içeriyordu ve 100 µl iki kat seyreltilmiş inokulum çözeltisi ile inoküle edildi; her deney serisine bir besiyeri kontrolü eklendi. Mikropleyter 35° C'de inkübe edildi. Okuma, bir okuma aynası yardımıyla yapıldı ve ilk 24 saatten sonra ilaçsız kontrol kuyucuğunda üreme gözlemlendiği zaman MIC dönüm noktaları, her antifungal maddenin yalnız başına denendiğinde mantarın üremesini baskılayan en düşük yoğunluğu (üremeyi %50 oranında inhibe eden değer MIC-2) olarak belirlendi.

İlaçların birbirleri ile etkileşimleri NCCLS önerilerine dayanan bir dama tahtası (checkerboard) mikrodilüsyon yöntemi ile belirlendi. Sonuç antifungal yoğunlukları TBF için 0.125-64 µg/ml ve FLZ için 0.125-64 µg/ml idi. Kombinasyonda MIC değeri, bulanıklığı üreme kontrolünün bulanıklığına kıyasla ≤%50 daha az olan konsantrasyon değeri olarak değerlendirildi (16). Bu seyreltme aralığının altında ve üstünde olan sonuçlar da değerlendirmeye katıldı. Daha önceki çalışmalarda (14, 16, 19, 20) yapıldığı gibi, bu aralıktan daha yüksek MIC'ler (TBF için >64 µg/ml ve FLZ için >64 µg/ml) bir sonraki en yüksek yoğunluğa dönüştürüldü (sırasıyla 128 ve 128 µg/ml) ve aralığın daha altında kalan sonuçlar (TBF ve FLZ için ≤0.125 µg/ml) değiştirilmeden bırakıldı. İlaç etkileşimleri; fractional inhibitory concentration (FIC) indeksi esaslarına göre (21) sinerjik, aditif (additive) veya antagonistik olarak sınıflandırıldı. FIC indeksi; iki ilacın FIC değerlerinin toplanması ile bulundu. FIC şöyle belirlendi; her ilacın kombinasyonda kullanıldığı zamanki MIC'i tek başına kullanıldığındaki MIC'ine bölündü. İlaç etkileşimleri; FIC indeksi ≤0.50 ise sinerjik, FIC indeksi >0.50-≤2.0 arasındaysa "additive" ve >2.0 ise antagonistik olarak belirlendi. Her iki antifungal maddenin minimum fungusidal yoğunlukları (MFC) beş köken karşısında tek başına ve kombinasyon halinde saptandı. MFC belirlenmesi için, inkübasyon süresi sonunda kuyucuklardan 0.1 ml örnek alındı, sonra SDA plaklara yayılıp 35° C'de 72 saat bekletilerek hücrelerin canlılığı kontrol edildi. MFC, mantar kolonisi gelişmeyen en düşük ilaç yoğunluğu olarak belirlendi.

BULGULAR

Kontrol kökenlerinin mikrodilüsyon yöntemi ile bulunan MIC'leri; *C. krusei* ATCC 6258 karşısında TBF ve FLZ için sırasıyla >8 ve 64 µg/ml ve *C. albicans* ATCC 90028 için 1 ve 0.5 µg/ml arasında idi. TBF ve FLZ'ün kontrol kökenleri ve 31 *C. albicans* kökeni karşısında yalnız başına ve kombinasyondaki MIC'leri Tablo 1'de sunulmuştur. Deney kökenlerinin MIC aralıkları ve %50 ve %90'ını

Tablo 1. Terbinafin (TBF) ve flukonazol (FLZ)'ün tek başlarına ve kombinasyon halinde *C. albicans* kökenlerine etkisi (MIC) ve etkileşim durumu (FIC indeksi)

Köken no	MIC'ler (mg/ml)				Etkileşim	
	Tek başına		Kombinasyon		TBF /FLZ FIC indeksi	Tipi
	TBF	FLZ	TBF	FLZ		
1	>8	>64	8	64	1	aditif
2	2	0.25	0.25	0.125	0.62	aditif
3	1	0.5	0.125	0.25	0.75	aditif
4	>8	64	4	16	0.5	sinerjik
5	8	0.25	2	0.125	0.75	aditif
6	4	32	1	8	0.5	sinerjik
7	2	16	0.25	4	0.37	sinerjik
8	4	32	1	16	0.75	aditif
9	8	8	2	2	0.5	sinerjik
10	>8	>64	8	64	1	aditif
11	>8	2	4	0.5	0.5	sinerjik
12	4	16	1	2	0.37	sinerjik
13	0.25	>64	0.125	64	1	aditif
14	4	0.5	1	0.125	0.75	aditif
15	4	8	0.5	2	0.37	aditif
16	1	32	0.25	8	0.5	sinerjik
17	0.5	16	0.25	4	0.75	aditif
18	2	16	0.5	4	0.5	sinerjik
19	4	64	1	32	0.75	aditif
20	>8	64	8	16	0.75	aditif
21	8	16	2	2	0.37	sinerjik
22	0.25	2	0.125	0.25	0.62	aditif
23	>8	4	4	2	0.75	aditif
24	0.25	16	0.125	4	0.37	sinerjik
25	0.5	32	0.125	8	0.75	aditif
26	4	64	1	32	0.75	aditif
27	8	16	1	4	0.37	sinerjik
28	4	16	2	2	0.62	aditif
29	4	32	1	4	0.37	sinerjik
30	2	64	0.25	32	0.62	aditif
31	1	8	0.125	2	0.37	sinerjik
<i>C. krusei</i> ATCC 6258	>8	64	8	16	0.75	aditif

baskılayan MIC değerleri (MIC₅₀ ve MIC₉₀ sırasıyla) TBF için 0.25->8 µg/ml ve 8 ile >64 µg/ml; FLZ için 0.25->64 µg/ml ve 16 ile 64 µg/ml idi. İki antifungal madde arasındaki ilişki; 18 köken (%58) için aditif ve 13 (%42) köken için sinerjiktir. İki ilacın kombinasyonunda antagonistik etki elde edilmedi. TBF ve FLZ kombinasyonu *C. krusei* ATCC 6258 için aditif idi. FIC indeksi 0.75 bulundu. Kombinasyon halinde her iki ilacın da MIC değerlerinin tek başına saptanan MIC değerlerine göre daha düşük olduğu saptandı.

TARTIŞMA

Ergosterol, mantar hücre zarının başlıca sterolü olup, hücrenin çeşitli fonksiyonlarına katılır ve tüm mantarların canlılığında temel bir görev üstlenir. Ergosterolün biyosentezini durduran çeşitli antifungal bileşikler keşfedilmiştir, bunların en önemlileri skualen epoksidazın baskılanması ve C₁₄ demetilasyonunun baskılanmasıdır. Azo antifungaller, ergosterol biyosentezinde görevli bir enzim olan lanesterol demetilaz ile etkileşime girerek ergosterol biyosentezini baskılar (22).

Terbinafin, sentetik antifungallerden allilamin sınıfı içindedir ve kimyaca ve etki mekanizmasıyla klinikte kullanılmakta olan diğer sistemik antimikotiklerden farklıdır (10). Karakteristik bir etki mekanizmasına sahip olan TBF, ergosterol biyosentezini, skualen 2,3-epoksidazın dönüşümünü baskılayarak engeller. Skualen epoksidaz enziminin aktivitesi TBF tarafından bloke edilir ve sonuçta skualen birikerek ergosterolün özüllü üretimine yol açar. Azoller; lanesterolün -demetilaza metilasyonunu baskılayarak mantarın ergosterol biyosentezini bundan bir sonraki aşamada durdururlar (23). Allilaminlerin etkisiyle hücrede skualen birikir ve bu da özüllü ergosterol üretimine yol açar (23, 24). TBF ve azollerin, mantarın aynı ergosterol biyosentezi yolunu farklı aşamalarda baskılaması bu sinerjizmin olası destekleyici sebebi olmalıdır.

Terbinafin ve diğer triazolollerin, söz gelimi ITZ (7, 14) ve vorikonazolün (25) *C. albicans* karşısındaki *in vitro* sinerjistik ve aditif etkileşimi de bildirilmiştir. Ayrıca, TBF ve FLZ

kombinasyonunun, flukonazole dirençli *C. albicans* kökenlerine *in vivo* etkili olabileceğine ilişkin deliller de bildirilmiştir (26).

Bizim sonuçlarımız da daha önceki bildirilenlere (7, 14) benzer bulunmuştur. Terbinafin ve FLZ kombinasyonunun klinik *C. albicans* kökenleri karşısındaki *in vitro* etkinliğinde tek başlarına gösterdikleri etkinliğe oranla bir artış gözlemledik. Bu iki ilaç, *C. albicans* karşısında birbirinin *in vitro* aktivitesini artırdı.

Sonuç olarak, bulgular da daha önceki bildirimleri doğrularak, TBF ve FLZ kombinasyonunun *C. albicans* kökenleri karşısında etkili olduğunu gösterdi. Bu sonuçlar cesaret verici olmakla birlikte, sonuçların *in vitro* ve *in vivo* uyumunun klinik olarak araştırılması gereklidir. Bu bulgu özellikle flukonazole dirençli ve/veya terbinafin MIC değerlerinin yüksek olduğu *C. albicans* suşlarına bağlı gelişen infeksiyonların tedavisinde önem taşıyabilir.

KAYNAKLAR

1. Pfaller M. Epidemiology and control of fungal infections. *Clin Infect Dis* 1994; 19 (Suppl 1): S8-13.
2. Como JA, Dismukes WE. Oral azole drugs as systemic antifungal therapy. *N Engl J Med* 1994; 330: 263-72.
3. Grant SM, Clissold SP. Fluconazole. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic potential in superficial and systemic mycosis. *Drugs* 1990; 39: 877-916.
4. Broken D, Swindells S, Rinaldi M. Fluconazole resistant *Candida albicans*. *Clin Infect Dis* 1993; 17: 1018-21.
5. Edwards JE Jr. International conference for the development of a consensus on the management and prevention of severe candidal infections. *Clin Infect Dis* 1997; 25: 43-59.
6. Ng TT, Denning DW. Fluconazole resistance in *Candida* in patients with AIDS: a therapeutic approach. *J Infect* 1993; 263: 117-25.
7. Barchiesi F, di Francesco LF, Scalise G. *In vitro* activities of terbinafine in combination with fluconazole and itraconazole against isolates of *Candida albicans* with reduced susceptibility to azoles. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 8: 1812-4.
8. Johnson EM, Richardson MD, Warnock DW. *In vitro* resistance to imidazole antifungals in *Candida albicans*. *J Antimicrob Chemother* 1984; 13: 547-58.
9. Petranyi G, Meigassner JG, Mieth H. Antifungal activity of the allylamine derivative terbinafine *in vitro*. *Antimicrob Agents Chemother* 1987; 31: 1365-8.
10. Ryder NS, Favre B. Antifungal activity and mechanism of action of terbinafine. *Rev Contemp Pharmacother* 1997; 8: 775-87.
11. Ryder NS, Wagner S, Leitner I. *In vitro* activities of terbinafine against cutaneous isolates of *Candida albicans* and other pathogenic yeasts. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42: 1057-61.
12. Ryder NS, Leitner I. *In vitro* activity of terbinafine (Lamisil): an update. *J Dermatol Treatment* 1998; 9: S23-28.
13. Ryder N. Activity of terbinafine against serious fungal pathogens. *Mycoses* 1999; 42 (Suppl 2): 115-9.
14. Barchiesi F, di Francesco LF, Compagnucci P, Arzeni D, Giacometti A, Scalise G. *In vitro* interaction of terbinafine with amphotericin B, fluconazole and itraconazole against clinical isolates of *Candida albicans*. *J Antimicrob Chemother* 1998; 1: 59-65.
15. National Committee for Laboratory Standards. *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing for Yeasts*. Approved Standard; Document M27-A. Villonova, Pa: National Committee for Laboratory Standards, 1997.
16. Pfaller MA, Grant C, Mortland V, Rhine-Chalberg J. Comparative evaluation of alternative methods for broth dilution susceptibility testing of fluconazole against *Candida albicans*. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 506-9.
17. Pfaller MA, Bale M, Buschelman B, Lancaster M, Espinel-Ingroff A, Rex JH, Rinaldi MG. Selection of candidate quality control isolates and tentative quality control ranges for *in vitro* susceptibility testing of yeast isolates by National Committee for Clinical Laboratory Standards: proposed standard methods. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 1650-3.
18. Rex MJ, Pfaller MA, Lancaster M, Odds FC, Bolmstrom A, Rinaldi MG. Quality control guidelines for National Committee for Clinical Laboratory Standards - Recommended broth macrodilution testing of ketoconazole and itraconazole. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 816-7.
19. Espinel-Ingroff A, Kish CW Jr, Kerkering TM, et al. Collaborative comparison of broth macrodilution and microdilution antifungal susceptibility tests. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 3138-45.

20. **Pfaller MA, Dupont B, Kobayashi GS, et al.** Standardized susceptibility testing of fluconazole: an international collaborative study. *Antimicrob Agents Chemother* **1992**; 36: 1805-9.
21. **Eliopoulos GM, Moellering GC Jr.** Antimicrobial combinations. In: Lorian VS, ed. *Antibiotics in Laboratory Medicine*. 4th ed. Baltimore: Williams and Wilkins, **1996**: 330-96.
22. **Wynn RL, Jabra Rizk MA, Meiller TF.** Antifungal drugs and antifungal resistance: The need for a new generation of drugs. *General Dentistry*, **1999**; 47: 352-5.
23. **Ghannoum MA, Rice LB.** Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacteria resistance. *Clin Microbiol Rev* **1999**; 12: 501-7.
24. **White TC, Marr KA, Bowden RA.** Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. *Clin Microbiol Rev* **1998**; 11: 382-402.
25. **Weig M, Muller FM.** Synergism of voriconazole and terbinafine against *Candida albicans* isolates from human immunodeficiency virus-infected patients with oral candidiasis. *Antimicrob Agents Chemother* **2001**; 45: 966-8.
26. **Ghannoum MA, Elewski B.** Successful treatment of fluconazole-resistant oropharyngeal candidiasis by a combination of fluconazole and terbinafine. *Clin Diagn Lab Immunol* **1999**; 6: 921-3.