

## Wrażliwość na mikonazol i itraconazol szczepów grzybów z rodzaju *Candida* wyodrębnionych od pacjentów hospitalizowanych i leczonych w trybie ambulatoryjnym<sup>1</sup>

### Susceptibility to miconazole and itraconazole of *Candida* strains isolated from hospitalized and outpatient clinic patients

Agnieszka K. Kurnatowska, Jolanta Kwaśniewska

Zakład Leczenia Chorób Pasożytniczych i Grzybic, Katedra Biologii i Parazytologii Lekarskiej, Uniwersytet Medyczny, pl. Gen. J. Hallera 1, 90-647 Łódź; E-mail: katbiol@poczta.onet.pl

**ABSTRACT.** It is known that fungi representing different genera and species can cause organ-limited or systemic infections after disrupting of the natural defense mechanisms in a human organism. The treatment of mycoses still encounters considerable difficulties. Therefore, *in vitro* assessment of the susceptibility of fungal strains to the antifungal agents now in use and to new drugs is needed more urgently than ever before. It should be emphasized that we treat the fungal susceptibility to antifungal drugs as a quantitative feature of the strain examined. The aim of the presently reported study was the evaluation of the antimycotic action of two azole compounds – miconazole and itraconazole (Janssen) against 205 *Candida* strains isolated from the various biological specimens of two groups of patients – hospitalized (group 1) and examined in outpatient clinic (group 2); differentiation of species and codes of these strains; analysis of dose-response curves and parameters of polygons of the azoles minimal inhibitory concentrations (MIC). The susceptibility to miconazole and itraconazole was estimated with the agar diffusion test on 3% Sabouraud's agar – the method developed in our laboratory, using several different concentrations of the drug, which made the plotting of dose-response curves possible. The lowest concentration inhibiting the growth of fungal strain (MIC) was calculated using a transformed equation of rectilinear regression according to Kadłubowski. Species and fungal codes of isolated strains were evaluated according to the guidelines worked out in our department with the use of different media and biochemical tests (bioMérieux). Among 89 strains isolated from the hospitalized patients, six species of the genus *Candida* were found; one strain belonged to *Trichosporon cutaneum* species. The most frequently encountered species was *Candida albicans* (73%), which significantly dominated over *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. lipolytica* and *C. famata*. All strains from the second group of patients belonged to *C. albicans* species. In all *C. albicans* strains from both groups of patients, the most frequent assimilation code (2576174) was found. The miconazole MIC values for *Candida* strains isolated from the group 1 were characterized by a wide range of variation, from 0.0247mg/l to 6.826 mg/l, from group 2 – 0.0277 to 0.719 mg/l. The itraconazole MIC values were 0.011 to 2.813 mg/l, and 0.0103 to 0.718 mg/l, respectively. The analysis of mean values ( $\bar{x}$ ) of miconazole and itraconazole MICs and other parameters allowed us to find that the strains isolated from the patients of group 1 were significantly less susceptible to both drugs in comparison with the strains of the group 2 patients. Also, *C. albicans* strains from this group of patients had a significantly lower ( $\bar{x}$ ) MIC in comparison to the mean values for the most of *Candida* species isolated from the hospitalized patients ( $P < 0.001$ ). In conclusion, we have found that the most *Candida* strains from both groups of patients were susceptible to the examined antifungal agents. The strains isolated from the outpatient clinic patients were generally more susceptible especially to itraconazole in comparison with strains from hospitalized patients.

**Key words:** *Candida*, azoles, miconazole, itraconazole

<sup>1</sup>Praca finansowana z działalności statutowej UM w Łodzi nr 503-2013-1

## Wstęp

W ciągu ostatnich kilkunastu lat odnotowano wzrastającą liczbę, zagrażających życiu, zarażeń grzybiczych. Profil epidemiologiczny infekcji wywoływanych przez grzyby chorobotwórcze uległ zmianom, jednak gatunki z rodzaju *Candida* pozostały jednym z głównych czynników etiologicznych grzybic powierzchniowych i układowych. Szczepy grzybów charakteryzują się dużym zróżnicowaniem cech morfologicznych i biochemicznych, co pozwala im na adaptację do warunków środowiska, zmieniających się także pod wpływem stosowanych leków.

Obecnie największą grupę chemioterapeutyków przeciugrzybiczych stanowią leki azolowe. Ich działanie polega na blokowaniu etapu demetylacji 14 $\alpha$ -lanosterolu w procesie biosyntezy ergosterolu stabilizującego błonę komórkową grzyba. Następstwem zahamowania syntezy ergosterolu, jak również nagromadzenia jego prekursorów, są zaburzenia w przepuszczalności błony komórkowej grzyba, co w konsekwencji prowadzi do zmian w syntezie RNA, białek oraz metabolizmie lipidów. W grupie leków azolowych znajdują się pochodne imidazolu starszej generacji, np. mikonazol oraz nowsze pochodne triazolu, takie jak wprowadzony w latach 90. ubiegłego stulecia itraconazol. Obydwa leki są stosowane zarówno w leczeniu otwartym, jak i zamkniętym; itraconazol po podaniu doustnym wchłania się z przewodu pokarmowego, mikonazol zaś zaleca się miejscowo. Itraconazol ma szeroki zakres działania, bowiem jest aktywny nie tylko wobec szczepów grzybów z rodzaju *Candida*, ale także *Aspergillus*, *Cryptococcus*, *Blastomyces*, *Histoplasma*, *Coccidioides*, *Paracoccidioides*, *Sporothrix*, *Pseudoallescheria*.

Zaproponowanie schematu skutecznego leczenia grzybicy nie jest łatwe, powinno bowiem obejmować ustalenie zakresu inwazji na podstawie objawów klinicznych, badań laboratoryjnych i mikologicznych, rozpoznanie gatunku grzyba i ocenę właściwości szczepu, do których należy, m.in. wrażliwość *in vitro* na preparaty przeciugrzybicze. Badanie to jest szczególnie ważne dla powodzenia terapii, gdyż uwzględnia zjawisko coraz częściej występującej zmniejszonej wrażliwości grzybów na stosowane leki.

Celem pracy było zbadanie wrażliwości *in vitro* na mikonazol i itraconazol szczepów wyodrębnionych od pacjentów z dwóch grup klinicznych: hospitalizowanych i leczonych ambulatoryjnie, okre-

ślenie gatunków i kodów numerycznych wyizolowanych szczepów oraz porównanie zmienności wartości najmniejszego stężenia hamującego wzrost grzyba (MIC) szczepów pochodzących z dwóch grup pacjentów.

## Materiały i metody

Użyte w doświadczeniach 206 szczepów grzybów zostało wyodrębnionych z różnych materiałów biologicznych pacjentów Wojewódzkiego Specjalistycznego Szpitala im. M. Pirogowa, Uniwersyteckiego Szpitala Klinicznego Nr 1 w Łodzi, Wojewódzkiego Zespołu Opieki Zdrowotnej Centrum Leczenia Chorób Płuc i Rehabilitacji w Łodzi i Tuszynie (grupa 1) i pacjentów leczonych w trybie ambulatoryjnym w Zakładzie Diagnostyki i Leczenia Chorób Pasożytniczych i Grzybic Katedry Biologii i Genetyki Medycznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi (grupa 2). Wśród szczepów pochodzących od pacjentów hospitalizowanych 29 wyizolowano z płwociny, 19 z moczu, 7 z kału, 7 z wymazu z rany, 5 z wydzieliny oskrzelowej, 5 z bronchoaspiratu, 4 z ucha, po 3 szczepy z jamy ustnej i gardła, 2 z krwi oraz po jednym szczepie z wymazu ze stomy, ścią, płynu mózgowo-rdzeniowego, popłuczyn oskrzelowo-pęcherzykowych i torbieli trzustki. U pacjentów grupy 2, leczonych ambulatoryjnie, 32 szczepy pochodziły z treści jamy ustnej, 14 z kału, 7 z wymazu z odbytu, 17 z treści pochwy, 13 z okolicy sromu, 15 z wymazu spod napletka, 13 z okolicy żołądka, 5 z ejakulatu i 1 z moczu. Na przeprowadzenie badań wyraziła zgodę Uczelniana Komisja Bioetyki (uchwała nr RNN/89/08/KE z 22.04. 2008). Gatunki szczepów akseńskich – bezbakteryjnych oznaczono według opracowanego i stosowanego od lat w Katedrze Biologii i Genetyki Medycznej UM w Łodzi schematu postępowania [1], obejmującego ocenę: cech makroskopowych wyizolowanych kolonii grzybów, takich jak: barwa, kształt, połysk, brzegi, struktura powierzchni, stosunek do powierzchni agaru, zmiana jego barwy; cech mikroskopowych, w preparatach bezpośrednich i mikrodowłach, takich jak: wielkość komórek wegetatywnych, obecność strzępek lub pseudostrzępek, blastospor, „germ tubes”; wybranych właściwości biochemicznych poszczególnych szczepów, a mianowicie zdolności fermentacji i asymilacji węgla z różnych związków za pomocą testu API 20 C AUX (bioMérieux), który jest biochemicznym szeregiem identyfikacyjnym służącym do precyzyjnego oznaczenia najczęściej spotykanych gatunków

grzybów. Wchodzący w skład zestawu API 20 C AUX pasek zawiera 20 mikropróbówek (pierwsza próbówka stanowi kontrolę) z odwodnionymi substratami, umożliwiającymi przeprowadzenie 19 testów oceniających zdolność grzybów do przyswajania węgla z 19 związków, a mianowicie: z glukozy (GLU), glicerolu (GLY), 2-keto-D-glukonianu wapnia (2 KG), L-arabinozy (ARA), D-ksylozy (XYL), adonitolu (ADO), ksylitolu (XLT), D-galaktozy (GAL), inozytolu (INO), D-sorbitolu (SOR), metylo- $\alpha$ -D-glukopiranozydu (MDG), N-acetylo-glukozaminy (NAG), D-celobiozy (CEL), D-laktozy (LAC), D-maltozy (MAL), D-sacharozy (SAC), D-trehalozy (TRE), D-melezytozy (MLZ), D-rafinozy (RAF). Testy API 20 C AUX przeprowadzono dla 206 zbadanych szczepów grzybów, a uzyskane wyniki porównywano z katalogiem Analytical Profile Index (bioMérieux), z którego odczytywano właściwy dla danego gatunku i szczepu grzyba kod numeryczny. Różnicowanie *Candida albicans* przeprowadzono w oparciu o wytwarzanie chlamydospor na zmodyfikowanym podłożu Nickersona z błękitem metylenowym oraz na podłożu R. A. T (bioMérieux).

Najmniejsze stężenie (MIC) mikonazolu i itrakonazolu (substancje czyste firmy Janssen) hamujące wzrost badanego szczepu grzyba, wyznaczono za pomocą zmodyfikowanej metody dyfuzji w żelu agarowym [2]. W tym celu z każdego szczepu sporządzono, inkubowaną w temp. 37°C, 24-h hodowlę na podłożu płynnym Sabourauda o pH=5,6. Następnie posiewano 1 milion komórek grzyba w 1 ml bulionu Sabourauda na płytce Petriego o średnicy 10 cm, zawierające po 30 ml 3% agaru Sabourauda o pH=5,6. W celu równomiernego rozprowadzenia zawiesiny na płytce z agarem używano jałowych, zagiętych bagietek szklanych. Płytki inkubowano w cieplarni w temp. 37°C. Po godzinie inkubacji wycinano jałowym korkoborem studzienki o średnicy 10 mm, do których wkraplano pipetą automatyczną po 100  $\mu$ l odpowiedniego stężenia badanych leków. Płytki umieszczano na 23 godziny w cieplarni o temp. 37°C. Po upływie tego czasu, oceniano strefy zahamowania wzrostu, mierząc największą i prostopadłą do niej przeprowadzoną w połowie pierwszej, średnicę pola zahamowania wzrostu. Otrzymane krzywe działania leku na określony szczep grzyba umieszczono w układzie współrzędnych prostokątnych, w którym na osi x odkładano zlogarytmowane wartości stężenia leku, a na osi y średnicę (w milimetrach) pola zahamowania wzrostu po 24 godzinach. Analizie poddano odcinek

krzywej działania o przebiegu zbliżonym do prostoliniowego, wyrażający wprost proporcjonalną, w granicach błędu, zależność między średnicą pola zahamowania wzrostu grzyba na agarze a stężeniem badanego leku. Najmniejsze stężenie hamujące wzrost grzyba (MIC) obliczono z przekształconego równania regresji prostoliniowej według Kadłubowskiego [2,3]. Otrzymane z krzywych działania badanych leków MIC zestawiono w szereg rozdzielczy, z którego odczytywano zakres zmienności MIC dla danej liczby szczepów. Następnie obliczono średnią arytmetyczną najmniejszego stężenia hamującego oraz inne parametry rozkładu wartości MIC. Zakresy stężeń badanych leków ustalono w oparciu o metodę rozcieńczeń zalecaną przez The Clinical and Laboratory Standard Institute, Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing (2002). Jako rozpuszczalnika użyto jałowego 10% roztworu DMSO (dimetylosulfotlenek), natomiast kolejne rozcieńczenia sporządzono jałową wodą destylowaną, w postępie arytmetycznym od 160,0 mg/l do 0,078125 mg/l dla obu leków. Wyniki badań poddano analizie statystycznej wykorzystując program Statgraphics Plus 5.1.

## Wyniki i ich omówienie

Wśród 89 szczepów pochodzących od pacjentów hospitalizowanych 65 (73,03%) zaliczono do gatunku *Candida albicans*, po 7 (7,87%) do *C. tropicalis* i *C. parapsilosis*, 5 (5,62%) do *C. glabrata*, 3 (3,37%) do *C. lipolytica*; dwa pojedyncze szczepy oznaczono jako *C. famata* oraz *Trichosporon cutaneum*. Warto dodać, że z krwi i płynu mózgowo-rdzeniowego wyizolowano *C. parapsilosis*, zaś szczep *T. cutaneum* – z bronchoaspiratu. Wszystkie szczepy (117) pochodzące od pacjentów leczonych w trybie ambulatoryjnym należały do gatunku *C. albicans*. Analizując kody numeryczne zbadanych szczepów przekonano się, że – w odniesieniu do *C. albicans* – u większości szczepów wyodrębnionych od pacjentów grupy 1 (53 szczepy) i od pacjentów grupy 2 (73 szczepy) oznaczono kod 2576174. Kodami wspólnymi dla szczepów z tego gatunku w obu grupach zbadanych osób były 2566174, 2576134 i 6576174; pozostałe kody były różne (Tabela 1).

Co się tyczy szczepów z pozostałych gatunków pochodzących od pacjentów hospitalizowanych u *C. tropicalis* oznaczono 5 kodów (2576171, 2556175, 2576175, 6556171, 6156175), 3 u *C. parapsilosis* (6756135, 6756175, 2756175), po 2

u *C. lipolytica* (6000104,6000004) i *C. glabrata* (2000040, 2000044) oraz po 1 u *C. famata* (2576773) i *T. cutaneum* (2740775). Analizując wartości najmniejszego stężenia hamującego w odniesieniu do szczepów wzorcowych przekonano się, że MIC mikonazolu wyniósł dla *C. albicans* ATCC24433 – 0,0746 mg/l, dla *C. glabrata* ATCC90030 – 0,527 mg/l, *C. parapsilosis* – 0,287 mg/l, natomiast MIC itraconazolu dla *C. albicans* ATCC24433 wyniósł 0,0738 mg/l, *C. glabrata* ATCC90030 – 0,184 mg/l i dla *C. parapsilosis* – 0,0188 mg/l. Do oceny wartości najmniejszych stężeń hamujących mikonazolu i itraconazolu, obliczonych z 410 krzywych działania dla 205 zbadanych szczepów z rodzaju *Candida* zastosowano własny tryb analizy, uwzględniający, m.in. porównanie wartości MIC w szeregach rozdzielczych, pozwalających na zgrupowanie dużej liczby uzyskanych wyników. Przekonano się, że zakres zmienności MIC mikonazolu dla 88 szczepów *Candida*, pochodzących od pacjentów hospitalizowanych wahał się w szerokich granicach – od 0,0247 do 6,827 mg/l, a iloraz uzyskany po podzieleniu przez siebie tych wartości wyniósł aż 276. Zakres zmienności MIC mikonazolu dla zbadanych szczepów od pacjentów grupy 2 wahał się od 0,0277

do 0,719 mg/l, a iloraz tych wartości był prawie 11 razy niższy, niż w przypadku szczepów wyizolowanych od pacjentów grupy 1, wynosił bowiem 26. Zakres zmienności MIC itraconazolu dla szczepów pochodzących od pacjentów hospitalizowanych wynosił od 0,011 do 2,813 mg/l, a iloraz uzyskany po podzieleniu przez siebie tych wartości także był wysoki, wynosił bowiem 256. Dla szczepów wyodrębnionych od pacjentów leczonych w trybie ambulatoryjnym zakres zmienności MIC itraconazolu mieścił się w granicach od 0,0103 do 0,718 mg/l, a iloraz wyniósł 69, był więc około 4 razy niższy. Porównując wartości średnie MIC mikonazolu, uzyskane dla szczepów *Candida* wyodrębnionych od pacjentów obu grup przekonano się, że szczepy pochodzące od chorych grupy 1 były istotnie mniej wrażliwe na ten lek niż szczepy od pacjentów grupy 2 ( $P=0,026$ ); podobną różnicę wrażliwości wykazano w odniesieniu do itraconazolu ( $P<0,001$ ) (Tabela 2).

Zakres zmienności MIC mikonazolu wyłącznie dla szczepów z gatunku *C. albicans* pochodzących od pacjentów grupy 1 wyniósł od 0,0247 do 6,827 mg/l, dla szczepów od pacjentów grupy 2 od 0,0277 do 0,719 mg/l, a wartości średnie – odpowiednio 0,0281 i 0,125 mg/l i nie różniły się między

Tabela 1. Kody numeryczne szczepów *C. albicans* wyodrębnionych od pacjentów hospitalizowanych (grupa 1) i leczonych w trybie ambulatoryjnym (grupa 2)

Table 1. Assimilation codes of *C. albicans* strains isolated from hospitalized (group 1) and outpatient clinic patients (group 2)

Gatunek Species	Kod Code	Liczba szczepów/Number of strains			
		Grupa 1/Group 1		Grupa 2/Group 2	
		n	%	n	%
<i>C. albicans</i>	2576174	53	81,5	73	62,4
<i>C. albicans</i>	2566174	4	6,2	5	4,3
<i>C. albicans</i>	2556174	2	3,1	0	0
<i>C. albicans</i>	2546174	1	1,5	0	0
<i>C. albicans</i>	2564174	1	1,5	0	0
<i>C. albicans</i>	6776174	1	1,5	0	0
<i>C. albicans</i>	6576174	1	1,5	6	5,1
<i>C. albicans</i>	6576134	1	1,5	0	0
<i>C. albicans</i>	2576134	1	1,5	6	5,1
<i>C. albicans</i>	2572174	0	0	8	6,8
<i>C. albicans</i>	6566174	0	0	5	4,3
<i>C. albicans</i>	2172174	0	0	4	3,4
<i>C. albicans</i>	2476174	0	0	4	3,4
<i>C. albicans</i>	2560154	0	0	2	1,7
<i>C. albicans</i>	2540154	0	0	2	1,7
<i>C. albicans</i>	2566134	0	0	2	1,7
Razem szczepów Total strains		65	100	117	100

Tabela 2. Ważniejsze parametry analizy rozkładu wartości najmniejszych stężeń hamujących (MIC) mikonazolu i itraconazolu dla szczepów różnych gatunków z rodzaju *Candida* wyodrębnionych od pacjentów hospitalizowanych (grupa 1) i leczonych w trybie ambulatoryjnym (grupa 2)

Table 2. Some parameters of the analysis of miconazole and itraconazole minimal inhibitory concentration polygons for strains from different *Candida* species isolated from hospitalized (group 1) and outpatient clinic patients (group 2)

Parametry Parameters	MIC mg/l			
	Mikonazol/Miconazole		Itraconazol/Itraconazole	
	Grupa 1/Group 1	Grupa 2/Group 2	Grupa 1/Group 1	Grupa 2/Group 2
Zakres zmienności MIC mg/l MIC variability range mg/l	0,0247–6,827	0,0277–0,719	0,011–2,813	0,0103–0,718
Średnia arytmetyczna ( $\bar{x}$ ) Mean ( $\bar{x}$ )	0,432*	0,125*	0,215**	0,0679**
Mediana (Me) Median (Me)	0,138	0,106	0,086	0,035
Odchylenie standardowe ( $\delta$ ) Standard deviation ( $\delta$ )	1,016	0,085	0,413	0,089

\* $P=0,026$ ; \*\* $P<0,001$

sobą istotnie ( $P>0,05$ ). Zakres zmienności MIC itraconazolu dla szczepów *C. albicans* wyodrębnionych od pacjentów hospitalizowanych wyniósł od 0,011 do 1,320 mg/l, zaś dla szczepów wyizolowanych od pacjentów leczonych w trybie ambulatoryjnym od 0,0103 do 0,718 mg/l; wartości średnie MIC wyniosły odpowiednio 0,172 i 0,0679 mg/l i różniły się między sobą ( $P<0,001$ ), co wskazuje na wyższą wrażliwość na ten lek szczepów *C. albicans*, pochodzących od pacjentów grupy 2.

Analizując wartości średnie najmniejszych stężeń hamujących obu leków w odniesieniu do szczepów z różnych gatunków *Candida*, wyodrębnionych od pacjentów hospitalizowanych wykazano, że szczepy *C. albicans* były istotnie bardziej wrażliwe na mikonazol niż szczepy *C. lipolytica* ( $P=0,021$ ) i *C. parapsilosis* ( $P=0,034$ ); brak było istotnych różnic w odniesieniu do *C. glabrata*

i *C. tropicalis*. Co się tyczy itraconazolu, to szczepy *C. albicans* były mniej wrażliwe na ten lek niż szczepy *C. parapsilosis* ( $P=0,057$ ), a pozostałe gatunki cechowała podobna wrażliwość ( $P>0,05$ ). Porównując wartości średnie najmniejszego stężenia hamującego dla szczepów *C. albicans* wyodrębnionych od pacjentów leczonych ambulatoryjnie ze szczepami różnych gatunków *Candida* pochodzących od pacjentów hospitalizowanych wykazano, że szczepy *C. albicans* pochodzące od pacjentów grupy 2 były bardziej wrażliwe na mikonazol niż szczepy *C. lipolytica* ( $P=0,0182$ ) i *C. parapsilosis* ( $P=0,0165$ ); brak było istotnych różnic wrażliwości w odniesieniu do *C. glabrata* i *C. tropicalis*. Co się tyczy wrażliwości na itraconazol, to wartość średnia MIC tego leku dla szczepów *C. albicans*, pochodzących od pacjentów grupy 2, była istotnie niższa niż wartość MIC uzyskana dla szczepów *C. glabrata*

Tabela 3. Porównanie wartości średnich najmniejszego stężenia hamującego (MIC) mikonazolu i itraconazolu dla szczepów z różnych gatunków *Candida* pochodzących od pacjentów hospitalizowanych (grupa 1) ze szczepami *C. albicans* wyodrębnionymi od pacjentów leczonych w trybie ambulatoryjnym (grupa 2)

Table 3. Comparison of mean values of miconazole and itraconazole minimal inhibitory concentrations (MIC) for different *Candida* species from hospitalized patients (group 1) and for *C. albicans* strains isolated from outpatient clinic patients (group 2)

Lek Drug	Wartość średnia ( $\bar{x}$ ) MIC mg/l Mean ( $\bar{x}$ ) MIC mg/l				
	Grupa 1/Group 1				Grupa 2/Group 2
	<i>C. glabrata</i>	<i>C. lipolytica</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. albicans</i>
Mikonazol Miconazole	0,215	2,007 ( $P=0,0182$ )	0,507	0,388 ( $P=0,0165$ )	0,125
Itraconazol Itraconazole	1,120 ( $P=0,0086$ )	0,211 ( $P=0,0145$ )	0,173 ( $P=0,0108$ )	0,043	0,0679

( $P=0,0086$ ), *C. lipolytica* ( $P=0,0145$ ) i *C. tropicalis* ( $P=0,0108$ ); nie stwierdzono natomiast różnicy ( $P>0,05$ ) między wartościami średnimi MIC itrakonazolu dla szczepów *C. albicans* pochodzących od pacjentów leczonych w trybie ambulatoryjnym i szczepów *C. parapsilosis* wyodrębnionych od pacjentów hospitalizowanych (Tabela 3).

Porównując odsetki szczepów *C. albicans*, w klasach zakresu zmienności najmniejszego stężenia hamującego zbadanych leków w obu grupach pacjentów, przekonano się, że odsetki te różniły się między sobą istotnie ( $P<0,001$ ), bowiem wartości najmniejszego stężenia hamującego itrakonazolu, zawierające się w granicach od 0,01–0,1 mg/l uzyskano dla 38 (58,5%) szczepów *C. albicans* wyizolowanych od pacjentów grupy 1 i 95 (81,2%) szczepów od pacjentów grupy 2. Wartości MIC itrakonazolu, zawierające się w granicach od 0,1 do 1,0 mg/l otrzymano dla 26 (40,0%) szczepów wyodrębnionych od pacjentów hospitalizowanych i 22 (18,8%) szczepów od pacjentów leczonych w trybie ambulatoryjnym; odsetki szczepów także różniły się statystycznie między sobą ( $P<0,002$ ). Wyniki te wskazują na istotnie mniejszą wrażliwość na itrakonazol szczepów *C. albicans* wyizolowanych od pacjentów grupy 1. W odniesieniu do wrażliwości *C. albicans* na mikonazol, nie obserwowano różnicy statystycznie istotnej ( $P>0,05$ ) między odsetkami szczepów *C. albicans* w klasach zakresu zmienności MIC (Tabela 4).

## Dyskusja

W badaniach własnych, szczepy grzybów pochodzące z różnych materiałów od pacjentów hospi-

talizowanych zaklasyfikowano do rodzajów *Candida* i *Trichosporon*, zaś w obrębie rodzaju *Candida* – do 6 gatunków, spośród których w najwyższym odsetku stwierdzono *C. albicans*; dalsze pozycje zajmowały *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* i *C. glabrata*. W piśmiennictwie zwraca się uwagę na coraz częstsze występowanie innych – poza *C. albicans* – gatunków z tego rodzaju u chorych z grup podwyższonego ryzyka zarażenia grzybami [4,5]. Dane uzyskane przez autorów niemieckich, dotyczą 512 szczepów *Candida*, wyodrębnionych od ponad 420 pacjentów hospitalizowanych; 174 szczepy wyizolowano z krwi, końcówek kateterów, płynu mózgowo-rdzeniowego, płynu z jamy opłucnej i otrzewnej. Z oceny gatunków tych szczepów wynika, że najczęściej (43,0%) rozpoznawano *C. albicans*, następnie *C. glabrata* (31,3%), *C. tropicalis* (11,7%), rzadziej – *C. parapsilosis* (5,7%) i *C. krusei* (3,7%); 4,6% szczepów stanowiło 13 dalszych gatunków z tego rodzaju, m.in. *C. lusitaniae*, *C. famata* i *C. kefyri* [6]. Wśród 351 szczepów grzybów z rodzaju *Candida*, wyodrębnionych z krwi pacjentów *C. albicans* była najczęściej występującym gatunkiem (51,0%) w zbadanym materiale; wysoką prewalencję obserwowano także w odniesieniu do *C. parapsilosis* (23,0%); rzadziej różnicowano *C. tropicalis* (10,0%), *C. glabrata* (9,0%) oraz *C. krusei* (4,0%), inne zaś gatunki w pojedynczych przypadkach [7]. Podejmuje się próby wyjaśnienia coraz częstszego występowania innych niż *C. albicans* gatunków grzybów stosowaniem pochodnych azolowych w profilaktyce zarażeń grzybami u pacjentów poddawanych immunosupresji; lek azolowy działa prawdopodobnie jako czynnik selekcyjny [8]. Zwiększanie się odsetka szczepów z tych gatun-

Tabela 4. Porównanie odsetka szczepów *C. albicans* od pacjentów hospitalizowanych (grupa 1) i leczonych w trybie ambulatoryjnym (grupa 2) w klasach zakresu zmienności wartości MIC zbadanych leków

Table 4. Comparison of percentages of *C. albicans* strains isolated from both groups of patients in the classes of miconazole and itraconazole MIC values

Zakres zmienności MIC mg/l MIC variability range mg/l	Odsetek szczepów w klasach (%) /Percentage of strains in the classes (%)			
	Mikonazol/Miconazole		Itrakonazol/Itraconazole	
	Grupa 1/Group 1	Grupa 2/Group 2	Grupa 1/Group 1	Grupa 2/Group 2
0,00–0,01	0,0	0,0	0,0	0,0
0,01–0,1	41,5	47,0	58,5	81,2*
0,1–1,0	53,9	53,0	40,0	18,8**
1,0–10,0	4,6	0,0	1,5	0,0
>10,0	0,0	0,0	0,0	0,0

\* $P<0,001$ ; \*\* $P<0,002$

ków, jako czynnika etiologicznego grzybicy, jest istotne z klinicznego punktu widzenia, bowiem *C. glabrata* jest pierwotnie oporny *in vitro* na ketokonazol, a *C. krusei* na flukonazol [4,9,10]. Wydaje się, że istotnym źródłem pochodzenia tych szczepów może być także transmisja endogenna w obrębie organizmu pacjenta; za najczęstsze siedlisko grzyba uważa się przewód pokarmowy [11–14]. Warto dodać, że szczepy wyodrębnione od pacjentów leczonych w trybie ambulatoryjnym należały wyłącznie do gatunku *C. albicans*.

Nawiązując do wcześniejszych badań nad różnicowaniem wewnątrzgatunkowym szczepów grzybów [15,16], wykorzystano w doświadczeniach własnych zasadę numerycznej identyfikacji, pozwalającą na ustalenie asymilacyjnych kodów liczbowych wyodrębnionych szczepów. Wykazano dużą różnorodność tych kodów w odniesieniu do szczepów z gatunków innych, niż *C. albicans*, co wskazuje na ich zmienność. Wśród szczepów *C. albicans* w obu grupach pacjentów stwierdzono znaczną dominację szczepów o kodzie 2576174, bowiem 81,5% wyizolowanych od pacjentów hospitalizowanych i 62,4% szczepów *C. albicans* wyodrębnionych od pacjentów leczonych w trybie ambulatoryjnym posiadało ten kod, co jest interesujące w aspekcie epidemiologicznym.

Problemem ostatnich lat stało się nie tylko występowanie w ustroju człowieka potencjalnie chorobotwórczych grzybów z różnych rodzajów i gatunków, ale także szczepów o zmniejszonej wrażliwości na niektóre leki przeciwgrzybicze, wywołujących zagrożające życiu chorego grzybicy narządowe lub uogólnione [17–20]. Wprowadzono wprawdzie do terapii grzybic nowe, skuteczne leki, mające punkt uchwytu nie tylko w błonie komórkowej, ale i w ścianie komórki grzyba, nie rozwiązuje to jednak całkowicie problemu, ponieważ wrażliwość na te leki tego samego gatunku, a nawet różnych szczepów w jego obrębie, waha się w szerokich granicach [6,7]. Dlatego też celowe jest, zarówno z poznawczego, jak klinicznego punktu widzenia, badanie wrażliwości na leki wyhodowanych od chorych szczepów metodą, pozwalającą na uzyskanie powtarzalnych wartości MIC. Wrażliwość szczepu grzyba na lek należy rozpatrywać nie tylko w aspekcie praktyczno-lekarskim, ale także jako jedną z właściwości charakteryzujących szczep grzyba. Już wcześniej opracowaliśmy dający powtarzalne wyniki system, w którym przyjęto, że wrażliwość na czynnik chemiczny szczepów grzybów może być potraktowana jako cecha ilościowa, pod warunkiem obli-

czenia wartości najmniejszego stężenia hamującego wzrost grzyba, co pozwala na analizę zmienności tych wartości, m.in. w odniesieniu do różnych gatunków z rodzaju *Candida* [2,3]. W piśmiennictwie ustalono dla różnych leków wartości graniczne, pozwalające uznać szczep grzyba za wrażliwy (S; ang. susceptible), wrażliwy w zależności od dawki (S-DD; ang. susceptible dose dependent) i oporny (R; ang. resistant). Dla itrakonazolu wartości te wynoszą odpowiednio  $\leq 0,12$  mg/l (S), 0,25–0,5 mg/l (S-DD) i  $\geq 1,0$  mg/l (R) [21]. Badając wrażliwość izolowanych z krwi pacjentów, 351 szczepów grzybów z rodzaju *Candida* na 6 leków, m.in. itrakonazol, worykonazol i kaspofunginę, wykazano wysoką aktywność pochodnych azolowych wobec większości szczepów. Wartość średnia MIC itrakonazolu wyniosła 0,03 mg/l. Analizując wrażliwość poszczególnych gatunków na ten lek uzyskano dla *C. parapsilosis* wartość MIC itrakonazolu wynoszącą 0,06 mg/l, dla *C. tropicalis* – 8,0 mg/l, *C. glabrata* – 0,5–2,0 mg/l oraz dla *C. krusei* – 0,125–0,25 mg/l [7]. W naszych badaniach szeroki zakres zmienności MIC itrakonazolu (0,011–2,813 mg/l) uzyskany dla szczepów *Candida* wyodrębnionych od pacjentów hospitalizowanych, wskazywał na obecność szczepów wrażliwych, jak i o zmniejszonej wrażliwości na ten lek. Natomiast górna granica zakresu zmienności MIC (0,718 mg/l) itrakonazolu dla szczepów pochodzących od pacjentów leczonych ambulatoryjnie nie przekraczała 1,0 mg/l, co według podanego wcześniej kryterium [21] świadczy o dużej wrażliwości szczepów na tę pochodną triazolu. Wykazano także różnice wrażliwości na itrakonazol w zależności od gatunku grzyba oraz istotnie mniejszą wrażliwość szczepów *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. lipolytica* i *C. tropicalis* pochodzących od pacjentów hospitalizowanych w porównaniu z wrażliwością szczepów *C. albicans* uzyskanych od pacjentów leczonych w trybie ambulatoryjnym. Co się tyczy wartości MIC mikonazolu dla 4 szczepów wzorcowych ATCC, to wahały się one od  $\geq 0,0002$  do 1,0 mg/l. Dla szczepów *C. albicans* wrażliwych na flukonazol wartości MIC wyniosły  $\geq 0,0002$ , zaś dla szczepów z tego samego gatunku mniej wrażliwych na flukonazol – 1,0 mg/l; należy jednak dodać, że zakres zmienności MIC mikonazolu był bardzo szeroki i wahał się od 0,0002 do 128,0 mg/l [22]. Badając *in vitro* wrażliwość szczepów *Candida*, wyodrębnionych od pacjentów z kandydozą nawracającą przekonano się – na podstawie analizy rozkładu wartości MIC klotrimazolu, mikonazolu i ekonazolu, że zakres zmienności MIC

mikonazolu wahał się od 0,2 do 35,0 mg/l, zaś wartość średnia wyniosła 1,7 mg/l [23]. W prezentowanej pracy zakres zmienności MIC mikonazolu dla szczepów *Candida*, wyizolowanych od chorych grupy 1 także był szeroki, a jego górna wartość wyniosła 6,827 mg/l. Podobnie, jak w przypadku itraconazolu, także i w odniesieniu do mikonazolu wykazano, że szczepy *Candida* pochodzące od chorych hospitalizowanych były w większości istotnie mniej wrażliwe na ten lek niż szczepy od pacjentów leczonych w trybie ambulatoryjnym.

Ocena wrażliwości szczepu grzyba na lek powinna ułatwić przewidywanie wyniku terapii z dokładnością, którą można podsumować jako „regułę 90–60” [21]. Zgodnie z nią, w grzybicach wywołanych przez szczepy wrażliwe można oczekiwać skuteczności około 90%, natomiast w przypadku szczepów opornych – około 60%. Oceniając działanie pięciu pochodnych imidazolu u 369 chorych z rozpoznaną kandydozą wieloogniskową uzyskano dla wszystkich leków odsetek skuteczności od 80,6% do 94,1%; dla mikonazolu odsetek ten wyniósł 80,6%. W badaniach *in vitro* wykazano, że zakres zmienności MIC tego leku wahał się od 0,244 do 9,06 mg/l, zaś wartość średnia MIC wyniosła 2,72 mg/l. Uzyskane wskaźniki wyleczeń uznano za dobre, gdyż dotyczyły chorych, leczonych wcześniej bezskutecznie różnymi preparatami. Tym samym potwierdzono zbieżność między działaniem przeciwgrzybiczym *in vitro* i *in vivo*. Inne opinie spotykane na ten temat w piśmiennictwie, zwłaszcza w odniesieniu do pochodnych azolowych, wiążą się niewątpliwie z wyznaczeniem wartości MIC z jednego tylko punktu, np. w szeregu rozcieńczeń związku [24]. Podsumowując, warto przypomnieć, że obniżona wrażliwość (oporność) na leki przeciwgrzybicze może być pierwotna – bez wcześniejszej ekspozycji na lek, lub wtórna – nabyta w wyniku podawania leku. Zatem badanie wrażliwości *in vitro* odgrywa istotną rolę w diagnostyce grzybic i ocenie procesu selekcji pod działaniem leku. W oporności pierwotnej badanie aktywności przeciwgrzybiczej *in vitro* nie prowadzi do istotnych dla procesu terapeutycznego ustaleń, natomiast w przypadku oporności wtórnej otrzymane wartości najmniejszych stężeń hamujących preparatu mają znaczenie w leczeniu grzybic, gdy są znane przed rozpoczęciem kuracji.

## Wnioski

Większość zbadanych szczepów z rodzaju *Can-*

*did*a była wrażliwa na mikonazol i itraconazol, aczkolwiek zaobserwowano znaczną dyspersję wartości najmniejszych stężeń hamujących obu leków.

Szczepy *C. albicans* pochodzące od pacjentów leczonych w trybie ambulatoryjnym były bardziej wrażliwe na mikonazol i itraconazol niż szczepy różnych gatunków *Candida* wyodrębnione od pacjentów hospitalizowanych.

## Literatura

- [1] Kurnatowska A., Kurnatowski P. 2006. Mikologia medyczna. Promedi, Łódź.
- [2] Kadłubowski R., Kurnatowska A. 1971. Właściwości mikostatyczne nowych pochodnych chinaldiny. *Annales Academiae Medicae Lodzensis* 13, Suppl.7: 101-106.
- [3] Kurnatowska A., Kadłubowski R., Horwatt-Bożyczko E. 1998. Orungal – ocena wrażliwości *in vitro* szczepów *Candida albicans* wyodrębnionych z inwazji wieloogniskowych. *Mikologia Lekarska* 5, suppl.1: 47-50.
- [4] Fidel P.L. jr., Vazquez J.A., Sobel J.D. 1999. *Candida glabrata*: review of epidemiology, pathogenesis and clinical disease with comparison to *C. albicans*. *Clinical Microbiology Review* 12: 80-96.
- [5] Nowakowska D., Kurnatowska A., Wilczyński J. 2002. Biotypy szczepów *C. albicans* wyizolowanych od ciężarnych z cukrzycą typu 1 i cukrzycą ciężarnych, w oparciu o analizę aktywności wybranych hydrofaz. *Medycyna Wieku Rozwojowego* 6: 73-81.
- [6] Fleck R., Dietz A., Hof H. 2007. *In vitro* susceptibility of *Candida* species to five antifungal agents in a German university hospital assessed by the reference broth microdilution method and Etest. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 59: 767-771.
- [7] Cuenca-Estrella M., Rodriguez D., Almirante B., Morgan J., Planes A.M., Almela M., Mensa J., Sanchez F., Ayats J., Gimenez M., Salvado M., Warnock D.W., Pahissa A., Rodriguez-Tudela J.L. 2005. *In vitro* susceptibilities of bloodstream isolates of *Candida* species to six antifungal agents: results from a population-based active surveillance programme, Barcelona, Spain, 2002–2003. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 55: 194-199.
- [8] Singh S., Sobel J.D., Bhargava P., Boikov D., Vazquez J.A. 2002. Vaginitis due to *Candida krusei*: epidemiology, clinical aspects and therapy. *Clinical Infectious Diseases* 35: 1066-1070.
- [9] Perea S., Patterson T.F. 2002. Antifungal resistance in pathogenic fungi. *Clinical Infectious Diseases* 35: 1073-1080.
- [10] Loeffler J., Stevens D.A. 2003. Antifungal drug resistance. *Clinical Infectious Diseases* 36: 31-41.
- [11] Pfaller M.A. 1996. Nosocomial candidiasis: emerging species, reservoirs and modes of transmission.



- Clinical Infectious Diseases* 22: 89-94.
- [12] Kauffman C.A. 2001. Fungal infections in older adults. *Clinical Infectious Diseases* 33: 550-555.
- [13] Stephan F., Bah M.S., Desterke C., Rezaigula-Delclaux S., Foulet F., Duvaldestin P., Bretagne S. 2002. Molecular diversity and routes of colonization of *Candida albicans* in a surgical intensive care unit, as studied using microsatellite markers. *Clinical Infectious Diseases* 35: 1477-1483.
- [14] Samonis G 2004. Gut: portal of entry of fungi in the immunocompromised hosts. *Mikologia Lekarska* 11: 105-107.
- [15] Kurnatowska A., Białasiewicz D., Głowacka A., Horwatt E., Kwaśniewska J., Różga A., Sosnowska E. 1985. Ocena identyczności szczepów grzybów wyizolowanych z zarażeń rodzinnych, a grzybice nawracające narządów płciowych u dziewcząt. Materiały V Ogólnopolskiego Sympozjum Ginekologii Dziecięcej, Łódź: 196-203.
- [16] Kurnatowska A., Białasiewicz D., Głowacka A., Horwatt E., Kwaśniewska J., Różga A., Sosnowska E. 1987. Różnice wewnątrzgatunkowe *Candida* jako ważny składnik analizy inwazji rodzinnych. Materiały naukowe XXXI Zjazdu Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów, Olsztyn: 141.
- [17] Richardson M.D. 2005. Changing patterns and trends in systemic fungal infections. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 56, suppl. S1: i5-i11.
- [18] Dismukes W.E. 2006. Antifungal therapy: lessons learned over the past 27 years. *Clinical Infectious Diseases* 42: 1289-1296.
- [19] Spellberg B.J., Fillers S.G., Edwards J.E. Jr. 2006. Current treatment strategies for disseminated candidiasis. *Clinical Infectious Diseases* 42: 244-251.
- [20] O'Shaughnessy E.M., Meletiadis J., Stergiopoulou T., Demchok J.P., Walsh T.J. 2006. Antifungal interactions within the triple combination of amphotericin B, caspofungin and voriconazole against *Aspergillus* species. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 58:1168-1176.
- [21] Alexander B.D., Pfaller M.A. 2006. Contemporary tools for the diagnosis and management of invasive mycoses. *Clinical Infectious Diseases* 43: 15-27.
- [22] Martinez-Suarez J.V., Rodriguez-Tudela J.L. 1995. Patterns of *in vitro* activity of itraconazole and imidazole antifungal agents against *Candida albicans* with decreased susceptibility to flukonazol from Spain. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 39: 1512-1516.
- [23] Kurnatowska A., Kwaśniewska J. 1993. Analiza krzywych działania na szczepy *Candida in vitro* klotrimazolu, mikonazolu i ekonazolu oraz skuteczności tych leków w kandydozach nawracających. *Przegląd Dermatologiczny* 80: 279-282.
- [24] Kurnatowska A., Kwaśniewska J. 1990. Ocena działania pochodnych imidazolu w kandydozie błon śluzowych i skóry. *Postępy Dermatologii* 7: 281-286.

Wpłynęło 5 czerwca 2009

Zaakceptowano 14 sierpnia 2009