

şak sefalosporinler kadar etkilidir (1,12).

Bu çalışmada, Göğüs, Kalp ve Damar Cerrahisi Yoğun Bakım Ünitesinde yatan hastalardan izole edilen klinik izolatlarla karşı sefepimin in-vitro aktivitesi incelenmiştir.

GEREÇ VE YÖNTEM

Ocak 1997 - Şubat 1998 arasında Göğüs, Kalp ve Damar Cerrahisi Yoğun Bakım Ünitesinde yatan hastalardan nozokomiyal infeksiyon etkeni olarak izole edilen 11 *Pseudomonas aeruginosa*, 18 *Klebsiella pneumoniae*, 13 *Acinetobacter* spp, 18 *Staphylococcus aureus*, 15 *Staphylococcus epidermidis* olmak üzere toplam 75 bakteri suşu çalışma kapsamına alınmıştır. Suşların 27'si trakeal aspirasyon sıvısı, 19'u yara materyali, 14'ü kan, altısı idrar, dördü balgam, üçü peritoneal sıvı, ikisi boğaz sürüntüsünden izole edilmiştir.

Antibiyotik duyarlılık testlerinde toz hammadde olarak sağlanan sefepimin (Bristol Myers Squibb) 0.5-256 µg/ml arasındaki konsantrasyonları denenmiştir. Suşların minimal inhibitör konsantrasyon (MIC) değerleri NCCLS mikrobroth dilüsyon yöntemi kullanılarak belirlenmiştir (10).

McFarland 0.5 bulanıklığındaki bakteri süspansiyonu 1/100 oranında sulandırılarak 10⁶ CFU/ml yoğunlukta bakteri süspansiyonu elde edilmiş, önceden 1-512 µg/ml seri sulandırım yapılmış 50'şer µl antibiyotik çözeltisi içeren kuyucuklara 50'şer µl bakteri süspansiyonu eklenmiştir. Mikropleytlar 35°C'de 16-20 saat inkübe edilmiş, gözle üreme saptanmayan en düşük antibiyotik konsantrasyonu MIC olarak belirlenmiştir. MIC değerleri ≥32 olan suşlar dirençli, ≤8 olanlar duyarlı olarak kabul edilmiştir.

BULGULAR

In-vitro sefepim duyarlılıkları araştırılan toplam 75 bakteri suşunun MIC değerlerinin dağılımı, sefepim duyarlılık oranları tabloda gösterilmiştir.

Tablo . Sefepim ile alınan sonuçlar.

Bakteri	Suş sayısı	MIC aralıkları (µg/ml)	Duyarlı	Dirençli
<i>P. aeruginosa</i>	11	<0.5-128	7 (% 64)	4 (% 36)
<i>K.pneumoniae</i>	18	<0.5->256	13 (% 72)	5 (% 28)
<i>Acinetobacter</i> spp.	13	1->256	5 (% 39)	8 (% 61)
MRSA	10	1->256	3 (% 30)	7 (% 70)
MSSA	8	1-128	4 (% 50)	4 (% 50)
MRSE	10	2->256	3 (% 30)	7 (% 70)
MSSE	5	<0.5-64	4 (% 80)	1 (% 20)

Denenen bakterilerin in-vitro sefepim duyarlılık oranları, *P.aeruginosa*'da % 64, *K.pneumoniae*'de % 72, *Acinetobacter* spp.'de % 39, metisiline dirençli *S.aureus* (MRSA) suşlarında % 30, metisiline duyarlı *S.aureus* (MSSA) suşlarında % 50, metisiline dirençli *S.epidermidis* (MRSE) suşlarında % 30, metisiline duyarlı *S.epidermidis* (MSSE) suşlarında ise % 80 olarak bulunmuştur.

TARTIŞMA

Yoğun bakım ünitelerinde yatan hastaların % 80'inde antibiyotik kullanılması dirençli etkenlerin artmasına yol açmakta, infeksiyonların tedavisini güçleştirmektedir (2). Sefepim, geniş antibakteriyel spektrumu, güçlü Gram pozitif etkinliği nedeniyle bugün hastane kaynaklı deri, solunum sistemi ve üriner sistem infeksiyonlarında sıklıkla kullanılır hale gelmiştir.

Çalışmamızda, *P.aeruginosa* suşlarının % 64'ü, *K.pneumoniae* suşlarının % 72'si, *Acinetobacter* suşlarının % 39'u, MRSA suşlarının % 30'u, MSSA suşlarının % 50'si, MRSE suşlarının % 30'u, MSSE suşlarının % 80'i in-vitro olarak sefepime duyarlı bulunmuştur. Bu sonuçlar sefepimin *K.pneumoniae*, *P.aeruginosa*, metisiline duyarlı *S.epidermidis* türleri üzerinde etkili olduğunu göstermektedir. Liu ve ark.'nın (9) 1994'te yaptıkları bir çalışmada, *K.pneumoniae* suşlarının % 100'ü, *Acinetobacter* suşlarının % 66'sı, *P.aeruginosa* suşlarının % 85'i, MRSA suşlarının % 13'ü, MRSE suşlarının % 96'sı sefepime duyarlı olarak bulunmuştur. Gülay ve ark.'nın (7) yaptıkları çalışmada, sefepim duyarlılığı *P.aeruginosa* için % 68.8, *Acinetobacter* suşları için % 55, MRSA suşları için % 48, MSSA suşları için ise % 98 olarak bildirilmiştir. Watanabe ve ark.'nın (13) çalışmasında ise *P.aeruginosa* suşlarında sefepim direnci % 37.4 olarak tespit edilmiştir. Sönmez ve ark. (11) *Pseudomonas* suşlarında sefepim direnç oranını % 20 olarak bulmuşlardır.

Çalışmamızdaki duyarlılık oranları bu çalışmalarla paralellik göstermektedir. Ancak duyarlılık oranlarımız Liu ve ark.'nın yaptığı çalışmaya göre daha düşüktür. Bu durum suşlarımızın izole edildiği yerin yoğun bakım ünitesi olmasına, antibiyotik kullanım politikasına, suşlarımızdaki direnç paternlerine ve yıllar içerisinde direnç oranlarının artmasına bağlı olabilir.

Er ve ark. (6) Gram pozitif bakterilerde sefepim direncini % 20, Gram negatif bakterilerde ise % 7 olarak bildirilmiştir. Büyükbaba ve ark. (3) inceledikleri *Pseudomonas* ve *Enterobacter* suşlarında direnç bildirmemişlerdir. Çalışmamızdaki oranların yüksek bulunması suşların daha dirençli olabileceği yoğun bakım ünitesinden izole edilmesiyle açıklanabilir. Karayay ve ark. (8) *Enterobacteriaceae*'de sefepim direncini % 1.3, non-fermentatif Gram negatif çomaklarda % 36.4 olarak tespit etmişlerdir.

Sefepim hastane dışı ve hastane kaynaklı infeksiyonlarda potansiyel kullanım alanı olan bir antibiyotik olmasına karşın, çalışmamızda da görüldüğü gibi, özellikle *Acinetobacter* ve metisiline dirençli stafilokoklarda yüksek oranda dirençli suşa rastlanmaktadır. Ancak, direnç durumunun belirlenebilmesi için daha çok suşun incelendiği çalışmalara gereksinim vardır. Direnç oranlarının giderek artabileceği düşünüldüğünde, bu tür antibiyotiklerin uygun durumlarda ve uygun sürelerde kullanılması gerekliliği ortaya çıkmaktadır.

Sonuç olarak, özellikle yoğun bakım ünitelerinden izole edilen dirençli suşlar için antibiyotik duyarlılık testlerinin yapılarak sonuçlarına göre uygun antibiyotiğin kullanılması gerektiği görüşü benimsenmelidir.

KAYNAKLAR

- 1- Baltch AL, Smith RP, Ritz W: Comparative antimicrobial activity of FK 037, cefpirome, ceftazidime and cefepime against aminoglycoside-sensitive and aminoglycoside-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas* spp, *Chemotherapy* 40:391 (1994).
- 2- Biberöglü K: Yoğun bakım ünitesi infeksiyonları, *Flora* 2:79 (1997).

İn-vitro etkinlik spektrumu içinde aerop ve anaerop organizmalar bulunmaktadır. Tonsillit ve faranjit, alt solunum yolu infeksiyonları, akut ve rekürren otitis media, deri ve yumuşak doku infeksiyonları ve komplike olmayan akut üriner sistem infeksiyonlarında kullanılmaktadır (6,14,17,21).

Bu çalışmada akut otitis media tedavisinde amoksisilin ve sefprozil ile elde edilen tedavi sonuçları karşılaştırılmış ve iki ilacın çocukluk çağındaki klinik etkinliği, güvenilirliği ve yan etkileri değerlendirilmiştir.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmaya Çocuk Polikliniğine başvuran ve akut otitis media tanısı konulan 2-14 yıl yaş grubundaki 61 çocuk alınmıştır. Son iki hafta içinde herhangi bir nedenle antimikrobiyal tedavi almış olan, penisilin ya da sefalosporinlere aşırı duyarlılığı bulunan olgular çalışma dışı bırakılmıştır. İlacın emilimini etkileyebilecek gastrointestinal hastalığı bulunanlar, böbrek veya karaciğer yetmezliği bulunanlar, bağışıklık sistemini etkileyecek steroid, kemoterapi tedavisi altında olan ya da immün yetmezliği bulunan olgular da çalışmaya alınmamıştır.

Otitis media tanısı ateş ($>38^{\circ}\text{C}$), otalji ve irritabileden oluşan herhangi bir komplikasyonun saptanması ve timpan zarında dolgunluğun eşlik ettiği hiperemi tespit edilmesi ile konulmuştur.

Olgular rastgele iki gruba ayrılarak 30'una (Grup I) amoksisilin, 50 mg/kg dozunda 8 saatte bir; 31'ine (Grup II) sefprozil, 30 mg/kg dozunda 12 saatte bir olmak üzere verilmiştir. Her iki grupta ilaçlar 10 gün süre ile ve oral yoldan uygulanmıştır. İzlem sırasında amoksisilin alan gruptan 5, sefprozil alan gruptan 4 olgu ikinci değerlendirme için kontrol getirilmemesi nedeniyle değerlendirme dışı bırakılmıştır.

Tedavi öncesi ve tedavi bitiminde klinik bulgular kaydedilip, eritrosit sedimentasyon hızı, beyaz küre sayısı, C-reaktif protein (CRP) düzeyi ölçülmüştür. Olgularda tedavi öncesi tüm bulguların kaybolmuş olması "şifa-tam iyileşme"; belirti ve bulguların kısmen iyileşmiş olması "kısmi iyileşme"; tedavi öncesindeki belirti ve bulgularda değişiklik olmaması veya kötüleşme "başarısız tedavi" olarak değerlendirilmiştir. Tedavi sırasında ortaya çıkan yan etkiler kaydedilmiştir.

Verilerin istatistiksel analizinde gruplar arası farklılıklar ki-kare testi ile, gruplar arası parametrik değişkenler student-t testi ile karşılaştırılmıştır. Sonuçlar, ortalama \pm standart sapma olarak gösterilmiştir. Analizlerde $p=0.05$ anlamlılık düzeyi esas alınmıştır.

BULGULAR

Altmışbir hasta ile başlanan çalışma, yaşları ortalama 5.4 ± 2.8 yıl olan (2-13 yıl) 28'i kız, 24'ü erkek 52 hasta ile tamamlanmıştır. Amoksisilin alan 25 olgunun yaş ortalaması 6.1 ± 3.1 , sefprozil alan 27 olgunun yaş ortalaması 4.7 ± 2.3 yıl idi ($p>0.05$). Tüm olguların % 65'inde ($n=34$) ilk atak, % 35'inde ($n=18$) ikinci ya da daha fazla olan atak saptanmıştır. Grup I'de 16 olguda (% 64), Grup II'de 18 olguda (% 67) ilk otitis media atağı bulunuyordu ($p>0.05$). Yine Grup I'de 17, Grup II'de 19 olgu olmak üzere tüm olguların 36'sında (% 69) tek taraflı, 16 olguda (% 31) çift taraflı tutulum vardı.

Olguların başvurudaki başlıca yakınmasını % 81 ile ateş oluşturuyordu. Bunu % 29 ile rinit, % 16 ile kulak ağrısı, % 11 ile öksürük, % 7 ile kusma, % 4 ile irritabilite ve % 2 ile ishal izliyordu.

Çalışma sonunda 33 olguda tam iyileşme, 11 olguda kısmi iyileşme, 3 olguda tedavide başarısızlık saptanmıştır. Gruplar arası değerlendirme yapıldığında tam iyileşme, kısmi iyileşme ve başarısızlık oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır (Tablo 1) ($p>0.05$).

Tedavi öncesi ve tedavi sonrası yapılan laboratuvar incelemelerinde, iki grupta da sedimentasyon, CRP ve beyaz küre sayısında aynı derecede düşüş saptanmıştır (Tablo 2).

Tablo 1. Olguların tedaviye yanıtları.

	Amoksisilin (n=25)		Sefprozil (n=27)		Toplam (n=52)	
	sayı	%	sayı	%	sayı	%
Klinik sonuç						
Şifa	16/23	70	17/24	71	33/47	70
İyileşme	5/23	22	6/24	25	11/47	23
Tedaviye yanıt	21/23	91	23/24	96	44/47	94
Başarısızlık	2/23	9	1/24	4	3/47	6
İlacın kesildiği olgu	2/25	8	3/27	11	5/52	10

Bütün yanıtlarda $p>0.05$.

Tablo 2. Olguların tedavi öncesi ve tedavi sonrası laboratuvar değerlerindeki değişiklikler.

	Amoksisilin grubu				Sefprozil grubu			
	Tedavi öncesi	Tedavi sonrası	% değişim	p	Tedavi öncesi	Tedavi sonrası	% değişim	p
Sedimentasyon (mm/saat)	29±15	16±6	45	<0.05	27±12	16±3.6	39	<0.05
CRP (IU/ml)	18±5	2.3±5	87	<0.01	17.3±7	1.2±2	93	<0.001
Beyaz küre sayısı (/mm ³)	±	±	34	<0.05	±	±	42	<0.05
	3800	2000			4500	1000		

Olgulardaki atak sayısına göre tedavi sonuçları değerlendirildiğinde, tüm olgularda ilk atak sonrası tam iyileşme oranı % 84 iken, rekürren atak geçirenlerde bu oran % 44 olarak bulunmuştur ($p<0.01$). Kısmi iyileşme oranı rekürren atak grubunda daha fazla (% 44'e karşın % 13) olmasına rağmen tedaviye başarılı yanıt alma (tam+kısmi iyileşme) oranı ilk atak geçirenlerde % 97, rekürren atak geçirenlerde % 88'dir ($p<0.05$).

Tedavi grupları kendi arasında değerlendirildiğinde, amoksisilin alan ve ilk atak geçiren hastalarda başarılı yanıt alma oranı ile sefprozil alan ve ilk atak geçiren hastalardaki başarılı yanıt alma oranı arasında fark bulunmamıştır (Tablo 3). Tekrarlayan otitis media atakları ile gelen olgular incelendiğinde; tam iyileşme sefprozil alan grupta, kısmi iyileşme amoksisilin alan grupta daha fazla iken, tedaviye başarılı yanıt alma oranı her iki grupta da aynı bulunmuştur (Tablo 3).

Tablo 3. Klinik sonuçların atak sayısına göre iki tedavi grubundaki dağılımı.

	Grup I (amoksisilin)		Grup II (sefprozil)		p	Toplam
	n	%	n	%		
İlk atak	16		18			34
Şifa	13/15	87	13/16	81	>0.05	26
Kısmi iyileşme	1/15	7	3/16	19	<0.05	4
Başarısızlık	1/15	7	0/16	0	<0.05	1
Tedaviye olumlu yanıt	14/15	93	16/16	100	>0.05	30
İlacın kesildiği olgu	1/16	6	2/18	11	>0.05	3
Tekrarlayan atak	9		9			18
Şifa	3/8	37.5	4/8	50	<0.05	7
Kısmi iyileşme	4/8	50	3/8	37.5	<0.05	7
Başarısızlık	1/8	12.5	1/8	12.5	>0.05	2
Tedaviye olumlu yanıt	7/8	87.5	7/8	87.5	>0.05	14
İlacın kesildiği olgu	1/9	11	1/9	11	>0.05	2

Tek ya da çift taraflı otit olmasına göre olgular ayrıca değerlendirildiğinde, iki antimikrobiyal tedavi şekli ile de tek taraflı tutulum olan olguların hiçbirinde başarısız yanıt alınmamıştır. Yine bilateral tutulum gösteren olgularda başarı amoksisilin ile % 71, sefprozil ile % 83'tür ve iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ($p>0.05$).

Yan etki oranı amoksisilin alan olgularda % 24, sefprozil alan olgularda % 18 olarak bulunmuştur. Bunlar bulantı-kusma, karın ağrısı, diyare ve cilt döküntüleri şeklinde görülmüştür. Grup I'de 2 olguda (% 8), Grup II'de 3 olguda (% 11) karın ağrısı ve diyare nedeni ile ilaç değiştirilmiştir. Yan etki açısından gruplar arası fark bulunmamıştır ($p>0.05$).

TARTIŞMA

Çocukluk çağında görülen akut otitis media tedavisinde ilk tercih edilen ilaçlardan biri amoksisilindir (1,16). Ancak son yıllarda *H.influenzae*, *M.catarrhalis* gibi sık rastlanan patojenlerde amoksisiline direnç artışı nedeniyle yeni tedavi arayışları gündeme gelmektedir (19). Sefprozil *S.pneumoniae*, *H.influenzae*, *S.aureus* ve *M.catarrhalis*'i de içeren solunum sistemi patojenlerine karşı etkin olan geniş spektrumlu bir oral sefalosporindir (2,9,13,15). Çalışmamızda amoksisilin ile bu tedaviye alternatif olarak son yıllarda gündeme gelen sefprozilin akut otitis mediadaki klinik etkinliği karşılaştırılmıştır. İki grupta da tedaviye aynı oranda başarılı yanıt alınmıştır. Amoksisilin grubunda tedaviye yanıt % 91 iken, sefprozil grubunda % 96 olarak bulunmuştur ($p>0.05$).

Çok merkezli bir çalışmada akut otitis mediada sefprozile klinik cevap % 83, amoksisilin/klavulanik aside % 81 olarak bulunmuştur (11). Arguedas ve ark. (3) tarafından efüzyonlu akut otitis media saptanan ve değerlendirmeye alınan 122 çocukta, sefprozil tedavisi ile başarılı yanıt % 91.7, amoksisilin/klavulanik asit tedavisi ile başarılı yanıt % 77.4 olarak bulunmuş ve sefprozilin etkinliğinin istatistiksel olarak daha fazla olduğu belirtilmiştir.

Sefprozil, akut bronşit ve kronik bronşitin akut alevlenmesi döneminde verilerek sefaklor, sefuroksim aksetil ve amoksisilin/klavulanik asit tedavileri ile karşılaştırılmıştır. Bu çalışmalarda sefaklor ve amoksisilin/klavulanik asit ile aynı klinik etkinlikte bulunmuş

(4,25), sefuroksim aksetilden ise klinik olarak daha etkin olduğu bildirilmiştir (5).

Otitis media'lı çocuklarda gerçekleştirilen bir araştırmada, sefprozil; amoksisilin/klavulanik asit ile karşılaştırılmıştır. *S.pneumoniae*'nin sorumlu olduğu infeksiyonlarda sefprozil ile anlamlı olarak daha tatminkâr klinik yanıt alındığı, *H.influenzae* ve *M.catarrhalis*'de yanıtların benzer olduğu saptanmıştır (22).

Çalışmamızda ilk otit atağı ile gelenlerde iyileşme oranı, rekürren atak geçirenlere göre daha fazla bulunmuştur. Tedaviye başarılı yanıt alma oranının ilk ya da rekürren atak geçirenlerde iki tedavi grubunda da aynı derecede olduğu saptanmıştır. Genel olarak ilk atak olgularında tedaviye yanıt alınma şansının rekürren olgulara göre daha yüksek olduğu ve atak sayısı ile antimikrobiyal tedavinin başarısının ilişkili olacağı söylenebilir.

Çeşitli çalışmalarda sefprozil ile yan etki oranının % 10'lar civarında olduğu bildirilmektedir (4,5,13). Çalışmamızda sefprozil ile % 18, amoksisilin ile % 24 oranında yan etki gözlenmiştir. Gözlenen yan etkilerin çoğu iki ilaç grubunda da gastrointestinal sistemi ilgilendiren bulantı, karın ağrısı, diyare gibi bulgulardır.

Sonuç olarak, otitis media gibi çocukluk çağının sık rastlanan bir hastalığında amoksisilin ve seprozilin klinik olarak tedaviye yanıt veya başarısız tedavi oranları ve yan etki açısından aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. Çalışma grubumuz küçük olmasına karşın amoksisilin, antibiyotik direncinin giderek arttığı günümüzde, halen akut otitis media tedavisinde klinik cevap açısından başarılı gibi gözükmektedir. Sefprozil ise çocuklarda otitis media tedavisinde iyi bir seçenek olarak değerlendirilmiştir.

KAYNAKLAR

- 1- Akyol MU, Sözeri B: Otitis media, *Prospect Tıp Derg* 2:58 (1997).
- 2- Aldridge KE, Schiro DD, Sanders CV: Comparative in vitro activity of the new oral cephalosporin BMY-28100, *Eur J Clin Microbiol* 6:170 (1987).
- 3- Arguedas AG, Zaleska M, Stutman HR: Comparative trial of cefprozil vs. amoxicillin/clavulanate potassium in the treatment of children with acute otitis media with effusion, *Pediatr Infect Dis J* 10:375 (1991).
- 4- Barbarash RA, Solomon F, Thieneman AC, et al: Cefprozil vs. amoxicillin/clavulanate potassium in mild to moderate lower respiratory tract infections: a focus on bronchitis, *Infect Med* 9:40 (1992).
- 5- Bonnet JP, Ginsberg D, Nolen T, et al: Cefprozil vs. cefuroxime axetil in mild to moderate lower respiratory tract infections: a focus on bronchitis, *Infect Med* 9:48 (1992).
- 6- Brook I: Microbiology and management of upper respiratory tract infections in children, *Infect Med* 14:69 (1997).
- 7- Croteau N, Hai-Vu Pless IB, Rivard IC: Trends in medical visits and surgery for otitis media among children, *Am J Dis Child* 144:535 (1990).
- 8- Doern GV, Jorgensen JH, Thornsberry C, et al: National Collaborative Study of the prevalence of antimicrobial resistance among clinical isolates of Haemophilus influenzae, *Antimicrob Agents Chemother* 32:180 (1988).
- 9- Hiraoka M, Masuyoshi S, Tomatsu K, Inoue M, Mitsuhashi S: In vitro activity and beta-lactamase stability of the oral cephalosporin BMY-28100, *Eur J Clin Microbiol* 6:559 (1987).
- 10- Howie V, Syriopoulou V, Scheifle D, et al: Incidence of amoxicillin-resistant Streptococcus pneumoniae in otitis media, *J Pediatr* 89:839 (1976).

- 11- Kafetzis DA: Multi-investigator evaluation of the efficacy and safety of cefprozil, amoxicillin/clavulanate, cefixime and cefaclor in the treatment of acute otitis media, *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 13:857 (1994).
- 12- Kayaalp SO: Penisilin ve penisilin türevleri, "Kayaalp SO: *Tıbbi Farmakoloji*, 6. baskı" kitabında s. 911, Feryal Matbaacılık, Ankara (1994).
- 13- Kayser FH: Comparative antibacterial activity of the new oral cephalosporin BMY-28100, *Eur J Clin Microbiol* 6:309 (1987).
- 14- Liu YC, Huang WK, Chen DL: Antibacterial activity of cefprozil in vitro. *Chemotherapy* 41:427 (1995).
- 15- Mazzuli T, Simor AE, Jaeger R, Fuller S, Low DE: Comparative in vitro activities of several new fluoroquinolones and beta-lactam antimicrobial agents against community isolates of *Streptococcus pneumoniae*, *Antimicrob Agents Chemother* 34:467 (1990).
- 16- Mehta S, Mehra YN: Otitis media of childhood, *Indian J Pediatr* 59:341 (1992).
- 17- Pelletier LL: The safety profile of cefprozil and other antimicrobial agents, *Infect Med* 14:23 (1997).
- 18- Pichichero ME: Assessing the treatment alternatives for acute otitis media, *Pediatr Infect Dis J* 13:27 (1994).
- 19- Pichichero ME, Pichichero CL: Persistent acute otitis media: II. Antimicrobial treatment, *Pediatr Infect Dis J* 14:922 (1995).
- 20- Senturia BH, Bluestone CD, Klein OJ, et al: Report of the Ad Hoc Committee on definition and classification of otitis media and otitis media with effusion, *Ann Otol Rhinol Laryngol* 89:3 (1980).
- 21- Shyu WC, Haddad J, Reilly J, Khan WN, Campbell DA: Penetration of cefprozil into middle ear fluid of patients with otitis media, *Antimicrob Agents Chemother* 38:210 (1994).
- 22- Stutman HR, Arguedas AG: Comparison of cefprozil with other antibiotic regimens in the treatment of children with acute otitis media, *Clin Infect Dis* 14:204 (1992).
- 23- Syriopoulou V, Scheifle D, Smith AL, et al: Increasing incidence of ampicillin-resistance in *Haemophilus influenzae*, *J Pediatr* 92:888 (1978).
- 24- Teele DW, Klein JO, Rosner BA: Epidemiology of otitis media during the first seven years of life in children in greater Boston, a prospective cohort study, *J Infect Dis* 160:83 (1989).
- 25- Wilber RB, Hamilton H, Leroy A, et al: Cefprozil vs. cefaclor in the treatment lower respiratory tract infections, *Infect Med* 9:44 (1992).

THE IN-VITRO EFFECTS OF ANTIFUNGAL AGENT COMBINATIONS AGAINST CANDIDA ALBICANS

A. Nedret KOÇ, Neşe EVRENSEL, Selma GÖKAHMETOĞLU,
Müge OĞUZKAYA

SUMMARY

The high rates of polyene toxicities and the development of azole resistance have raised the issue of using antifungal agents of these classes in combination, despite theoretical concerns regarding antagonism between such agents. This study was designed to evaluate the in-vitro effect of antifungal agent combinations on 20 strains of *Candida albicans* by broth microdilution method. Against *Candida albicans*, amphotericin B exhibited the most potent antifungal activity. Amphotericin B, fluconazole, ketoconazole, and miconazole gave MIC₉₀ values of 0.25 µg/ml, 0.5 µg/ml, 1 µg/ml, and 1 µg/ml, respectively. Fifty percent synergistic but no antagonistic effect was observed in amphotericin B-miconazole combination. The combination of amphotericin B-fluconazole, and amphotericin B-ketoconazole showed synergistic effects against 2 (10 %) and 3 (15 %) strains, respectively. The applicability of our in-vitro findings requires further in-vivo and in-vitro studies.

ÖZET

Candida albicans'a karşı antifungal kombinasyonlarının in-vitro etkisi.

Poliyen toksisitesinin yüksek olması ve azolleré direncin gelişmesi, teorik olarak bu ajanlar arasında antagonizm bulunduğunun kabul edilmesine rağmen, bu antifungallerin kombinasyonlarının kullanılabilirliğini tartışılır kılmaktadır. Bu çalışmada, 20 *Candida albicans* suşuna antifungal ajanların kombinasyonlarının in-vitro etkisinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. *Candida albicans* suşlarına amfoterisin B en etkili antifungal olarak bulunmuştur. Amfoterisin B, flukonazol, ketokonazol ve mikonazolün sırasıyla MIC₉₀ değerleri 0.25 µg/ml, 0.5 µg/ml, 1 µg/ml ve 1 µg/ml olarak saptanmıştır. Amfoterisin B-mikonazol kombinasyonu antagonizm göstermezken, % 50 sinerjik aktivite göstermiştir. Amfoterisin B-flukonazol ve amfoterisin B-ketokonazol kombinasyonları sırasıyla 2 (% 10) ve 3 (% 15) suş için sinerjik aktivite göstermiştir. Bu in-vitro bulguların uygulanabilirliği için in-vivo ve in-vitro daha fazla çalışmaya gereksinim vardır.

INTRODUCTION

The incidence of serious fungal infections continues to increase. Until the recent years, amphotericin B was the drug available for therapy in patients with serious fungal infections. With the recent availability of the newer azoles, however, this situation is likely to change (1,11). There has been a recent interest in the use of combinations of antifungal agents for chemotherapy in attempts to broaden the antifungal spectrum, enhance the efficacy of the available agents and reduce the toxicity of drugs (9,17). There have been many reports documenting such combination therapy, and the potential beneficial effects derived

from the synergistic interaction of certain drugs have been reported (2,15). The combination of amphotericin B and flucytosine for the treatment of cryptococcal meningitis indicate that the duration of the treatment could be shorter than that required for amphotericin B monotherapy (2). Amphotericin B and the azole drugs are being used clinically in combinations (16). In-vivo studies more often show synergy while in-vitro studies frequently show antagonism (20,22).

In this study, we examined the in vitro activities of antifungal agent combinations against 20 *Candida albicans* by using microdilution method in order to develop improved clinical combination therapies.

MATERIALS AND METHODS

Organisms: Susceptibility testing was carried out on 20 *C.albicans* clinical isolates from variety of sources (blood, sputum, cerebrospinal fluid, and urine). The organisms had been identified by standard methods (23) and were stored in tryptic soy broth including 10% glycerin at -70°C and subcultured before standing the study.

Quality control was performed by testing the following strains according to the recommendations of the National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) Document M27-T (12): *C.albicans* ATCC 90028, *C.albicans* ATCC 64547.

Drugs: Drugs were obtained from their manufacturers as laboratory powders, and 1280 $\mu\text{g/ml}$ stock solutions of amphotericin B (Sigma Co.), ketoconazole (Bilim Co.), and miconazole (Sigma Co.) dissolving in dimethyl sulfoxide and fluconazole (Fako Co.) in sterile water were prepared and stored at -70°C until used.

In vitro antifungal agents susceptibility test: MIC were determined by the broth microdilution method based on the standard method for antifungal susceptibility testing proposed by NCCLS with RPMI 1640 medium (Sigma Co.). Sterile flat-well microtiter plates were used. The drug solution were serially diluted two fold to give final concentrations from 32-0.03 $\mu\text{g/ml}$ with RPMI 1640 medium buffered to pH 7.0 with 0.165 M morpholinopropanesulfonic acid (MOPS (Sigma Co.)). Yeasts were grown on Sabouraud dextrose agar at 35° for 48 h. The wells were inoculated with 100 μl of the culture suspension diluted to a final inoculum of 2.5×10^3 cells per ml with RPMI 1640 medium. Fungal growth was observed at 35°C for 48 h. The MICs of amphotericin B was the lowest drug concentration at which there was an absence of visible fungal growth. The MICs of azoles were the lowest drug concentration that resulted in a visible turbidity less than or equal to 80% inhibition compared with the control fungal growth.

Checkerboard assay for antifungal combinations: The combinations effect of amphotericin B-fluconazole, amphotericin B-ketoconazole, and amphotericin B-miconazole were determined by checkerboard titration and expressed as a fractional inhibitory concentration (FIC index) (5). The concentrations tested for each antifungal typically range from 4 to 5 dilution below the MIC to twice the MIC, twofold dilution in RPMI 1640 medium. One of the antifungals were diluted along the abscissa and other along the ordinate, thereby providing possible two-fold combinations of the antifungal concentrations. Microtiter plates were inoculated and MIC were determined after incubation as described above. The concentration of drug or drugs in the wells containing the lowest concentration of a drug or drugs in combination that completely suppressed all fungal growth, as judged by visual inspection, was recorded as the MIC. Drug interaction was measurement of the fractional inhibitory concentration (FIC). This is the concentration of each drug in combination that produces inhibitory of growth expressed as a fraction of the concentration that inhibits growth when the drug is used alone. $\text{FIC} = (\text{MIC of drug A in combination} / \text{MIC of drug A alone})$

drug A alone)+(MIC of drug B in combination/MIC of drug B alone). A FIC index of ≤ 0.5 represents marked synergy, a FIC index of between 0.5 and 4.0 indicates an additive or indifferent, and a FIC index of ≥ 4.0 indicates antagonism.

RESULTS

Susceptibility studies: The MICs of the five antifungals against clinical isolates are shown in table 1. Amphotericin B was the most active antifungal in-vitro against clinical isolates, showing the lowest MIC. The MICs of amphotericin B ranged between 0.03-0.5 $\mu\text{g/ml}$ and MIC_{90} was 0.25 $\mu\text{g/ml}$. Other antifungals were also active in-vitro against isolates at MIC_{90} . MIC_{90} of fluconazole, ketoconazole, and miconazole were 0.5 $\mu\text{g/ml}$, 1 $\mu\text{g/ml}$, and 1 $\mu\text{g/ml}$, respectively. For fluconazole, in-vitro one susceptible-dose dependent isolate of *C.albicans* showed a MIC of $\geq 8 \mu\text{g/ml}$. All isolates were susceptible to amphotericin B.

The MICs for the two control organisms were within a close range for microdilution methods (for *C.albicans* ATCC 90028: fluconazole, 0.25 to 0.5 $\mu\text{g/ml}$; ketoconazole, 0.125 to 0.25 $\mu\text{g/ml}$; amphotericin B, 0.25 to 0.5 $\mu\text{g/ml}$).

Table 1. MICs of antifungal agents for 20 strains of yeasts^a.

Antifungals	MIC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)	MIC_{90} ($\mu\text{g/ml}$)	MIC Range
Amphotericin B	0.125	0.25	0.03-0.5
Fluconazole	0.5	0.5	0.125-16
Ketoconazole	0.12	1	0.03-2
Miconazole	1	1	0.03-16

^aMICs were determined by the RPMI broth microdilution method. 50% and 90%, MICs at which 50 and 90% of isolates were inhibited, respectively.

Checkerboard assay: The results of checkerboard assay of the four combinations are summarized in table 2. Amphotericin B-miconazole combination showed 50% synergistic activity against clinical yeast isolates. Amphotericin B-fluconazole and amphotericin B-ketoconazole produced synergistic interactions on 10% and 15% of all isolates, respectively. Antagonistic interaction was not obtained by amphotericin B-miconazole combination.

Table 2. Checkerboard assay of four combination against 20 strains of yeasts^a.

FIC index	A-F ^b		A-K ^b		A-M ^b		Results
	No. of isolates	%	No. of isolates	%	No. of isolates	%	
≤ 0.5	2	10	3	15	10	50	synergy
$>0.5, <1.0$	5	25	8	40	7	35	additive
$>1, <4$	9	45	4	20	3	15	indifference
≥ 4	4	20	5	25	0	-	antagonism

^aThe combination effect was assessed by checkerboard titration and was expressed as FIC index. An index of ≤ 0.5 implied marked synergy, an index of between 0.5 and 4.0 implied a additive or indifference, and an index ≥ 4 implied antagonism.

^bA-F: Amphotericin B- fluconazole, A-K: Amphotericin B-ketoconazole, A-M: Amphotericin B-miconazole.

DISCUSSION

The combination of amphotericin B with azoles for clinical yeasts isolates had been examined, but the situation is unclear. The studies evaluating their interactions have given conflicting results, ranging from antagonism (10), to no effect (18), to an additive or synergistic effect (13,17). The reasons for these conflicting results include differences in media, pH, temperature, and inoculum size, as well as evaluating of the results for one azole to other azoles. We used RPMI-1640 medium, the microdilution method, and 48 h incubation time for our susceptibility and combination study, because the highest agreement among laboratories, including the range order of susceptibility was obtained with RPMI-1640 medium at 35°C and after 48 h incubation time with antifungal compounds.

Currently, there is standardized method for performing susceptibility test with antifungal agents, and there are recommended breakpoints available for interpretation to amphotericin B, fluconazole, itraconazole, and flucytosine (1,12). However, the breakpoint values for ketoconazole and miconazole used in this study has not proposed in the NCCLS. Because of this, we evaluated that in-vitro all 20 strains were susceptible for amphotericin B and one susceptible-dose dependent strain for fluconazole showed a MIC of $\geq 8 \mu\text{g/ml}$.

In-vitro susceptibility testing may involve the testing of combinations of antifungal agents. Such studies are usually conducted in a checkerboard titration, in which two antifungal agents are tested together in all concentrations in a series of serial dilution. The purpose of the titration is to determine the concentration of each drug alone and in all combinations with each other that produce an endpoint of no growth. A checkerboard titration is typically conducted using two drugs (11). Amphotericin B can be used in combination with other antimicrobics, particularly either 5-FC, rifampin or azoles (2,8). Antagonism between fluconazole and amphotericin B has been reported recently (10,19). In 1991, Petrou and Rogers (14) reported that fractional inhibition coefficients (FICs) of 2.0-4.0 (amphotericin B-fluconazole) were found by agar checkerboard technique. Qualitatively, this antagonism was obtained in every azoles-susceptible strain of *Candida* spp. with amphotericin B versus fluconazole, ketoconazole, and itraconazole (19). Our result also showed that the combination of amphotericin B-fluconazole and amphotericin B-ketoconazole, produced rate of antagonistic interaction on 20% and 25% against *C.albicans* strains, respectively. Although the observed antagonistic effect of amphotericin B with azoles have been known as teorically, there have been suggestions that ketoconazole, miconazole, itraconazole may show synergism with amphotericin B in-vivo and in-vitro (4,8,9,13). Ghannoum et al. (7) demonstrated that amphotericin B-fluconazole combinations had additive effects against *C.albicans* in-vitro over a wide range of clinically relevant drug concentrations. Of critical importance, no in-vitro antagonism was observed in combinations employing these two agents (7). To confirm these findings in-vivo, another study showed that the survival of neutropenic mice with disseminated candidiasis was prolonged when animals were treated with a combinations of amphotericin B-fluconazole (17). Additionally, both amphotericin B monotherapy and amphotericin B-fluconazole therapy was more efficacious than fluconazole alone in clearing *Candida* from the kidneys. Similar findings were reported by Sugar et al. (21) studying combination therapy in experimental invasive candidiasis. Ernst et al. (6) indicated that this antagonism of amphotericin B activity by fluconazole by staggered administration was dependent on the exposure time to fluconazole and the concentration of amphotericin B and this antagonism was a reversible process. After removal of fluconazole from the vial, amphotericin B activity was partially delayed but fungicidal activity was restored. The lack of in-vitro antagonism between amphotericin B and miconazole was demonstrated against *As-*

pergillus spp. in another study (9). Similarly, it has also been reported that amphotericin B and miconazole can be synergistic, additive, or indifferent (13). Our data also showed that amphotericin B-miconazole combination was synergistic (50%), additive (35%), or indifferent (15%) but not antagonistic. The simplest explanation for this observation is that the interactions between azoles and amphotericin B are potentially multifactorial and complex (22). Bolard and Milhaud (3) suggested that the antifungal activity of amphotericin B does not solely depend on binding to ergosterol and portion of the fungal membrane. The saturation of fatty acyl chains as it relates to lipid peroxidation may play a key role in the interaction of amphotericin B with fungal membrane.

In conclusion, our in vitro results demonstrated a non effective interaction between amphotericin B and fluconazole against *C.albicans*. In contrast, amphotericin B and miconazole combination revealed a striking degree of synergistic interaction in-vitro against yeasts (50%). Additivity was achieved that the combination of amphotericin B and ketoconazole showed more beneficial effect than amphotericin B-fluconazole. However, further studies are needed regarding the interactions between azoles and amphotericin B prior to using such combination in human trials.

REFERENCES

- 1- Anaissie EJ, Paetznick VL, Ensing LG, Espinel-Ingnoff A, Galgiani JN, Hitchcock CA, Larocco M, Patterson T, Pfaller MA, Rex JH, Rinaldi MG: Microdilution antifungal susceptibility testing of *Candida albicans* and *Cryptococcus neoformans* with and without agitation: an eight-center collaborative study, *Antimicrob Agents Chemother* 40:2387 (1996).
- 2- Bennett JE, Dismukes WE, Duma RJ, Medoff G, Sande UA, Gallis H, Leonard J, Fields BT, Bradshaw M, Haywood H, McGee ZA, Cate TR, Cobbs CG, Warner JF, Alling DW: A comparison of amphotericin B alone and combined with flucytosine in the treatment of cryptococcal meningitis, *N Engl J Med* 301:126 (1979).
- 3- Bolard J, Milhaud J: Interaction of the anti-*Candida* amphotericin B (and other polyene antibiotics) with lipids, "Prasad R, Ghannoum MA (eds): *In Lipid Pathogenic Fungi*" kitabında s. 253, CRC Press Inc, Boca Raton (1996).
- 4- Dennning DW, Hanson LH, Perlman AM, Stevens DA: In vitro susceptibility and synergy studies of *Aspergillus* species to conventional and new agents, *Diagn Microbiol Infect Dis* 15:21 (1992).
- 5- Eliopoulos GM, Moellering RC: Antimicrobial combination, "Lorian VS (ed): *Antibiotics in Laboratory Medicine*" kitabında s. 432, Williams and Wilkins, Baltimore (1991).
- 6- Ernst EJ, Klepser ME, Pfaller MA: In vitro interaction of fluconazole and amphotericin B administered sequentially against *Candida albicans*: Effect of concentration and exposure time, *Diagn Microbiol Infect Dis* 32:205 (1998).
- 7- Ghannoum MA, Fu Y, Ibrahim AS, Mortara LA, Shafiq MC, Edward JE, Criddle RS: In vitro determination of optimal antifungal combinations against *Cryptococcus neoformans* and *Candida albicans*, *Antimicrob Agents Chemother* 39:2459 (1995).
- 8- Goetz MB, Jones JM: Combined ketoconazole and amphotericin B treatment of acute disseminated histoplasmosis in a renal allograft recipient, *South Med J* 78:1368 (1985).
- 9- Maesaki S, Kohno S, Kaku M, Koga H, Hara K: Effects of antifungal agent combinations administered simultaneously and sequentially against *Aspergillus fumigatus*, *Antimicrob Agents Chemother* 38:2843 (1994).

- 10- Martin E, Maier F, Bhakdi S: Antagonistic effects of fluconazole and 5-fluorocytosine on candidacidal action of amphotericin B in human serum, *Antimicrob Agents Chemother* 38:1331 (1994).
- 11- McGinnis MR, Rinaldi MG: Antifungal drugs: Mechanisms of action, drug resistance, susceptibility testing, and assays of activity in biological fluids, "Lorian V (ed): *Antibiotics in Laboratory Medicine*" kitabında s. 198, Williams and Wilkins, Baltimore (1991).
- 12- National Committee for Clinical Laboratory Standards: Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing for yeasts, *Proposed Standard M27-T*, National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova (1995).
- 13- Odds FC: Interactions among amphotericin B, 5-fluorocytosine, ketoconazole, and miconazole against pathogenic fungi in vitro, *Antimicrob Agents Chemother* 22:763 (1982).
- 14- Petrou MA, Rogers TR: Interactions in vitro between polyenes and imidazoles against yeasts, *J Antimicrob Chemother* 26:491 (1991).
- 15- Polak A: Combination therapy for systemic mycosis, *Infection* 17:203 (1989).
- 16- Rex JH, Rinaldi MG, Pfaller MA: Resistance of *Candida* species to fluconazole, *Antimicrob Agents Chemother* 39:1 (1995).
- 17- Sanati H, Ramos CF, Bayer AS, Ghannoum MA: Combination therapy with amphotericin B and fluconazole against invasive candidiasis in neutropenic-mouse and infective-endocarditis rabbit models, *Antimicrob Agents Chemother* 41:1345 (1997).
- 18- Scheven M, Scheven ML: Interaction between azoles and amphotericin B in treatment of candidiasis, *Clin Infect Dis* 20:1079 (1995).
- 19- Scheven M, Senf L: Quantitative determination of fluconazole-amphotericin B antagonism to *Candida albicans* by agar diffusion, *Mycoses* 37:205 (1994).
- 20- Sugar AM: Use of amphotericin B with azole antifungal drug: what are we doing?, *Antimicrob Agents Chemother* 39:1907 (1995).
- 21- Sugar AM, Hitchcock CA, Troke PF, Ricard M: Combination therapy of murine invasive candidiasis with fluconazole and amphotericin B, *Antimicrob Agents Chemother* 39:598 (1995).
- 22- Vazquez JA, Arganoza MT, Vaishampayan JK, Akins RA: In vitro interaction between amphotericin B and azoles in *Candida albicans*, *Antimicrob Agents Chemother* 40:2511 (1996).
- 23- Waren NG, Hazen KC: *Candida*, *Cryptococcus*, and other yeast of medical importance, "Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH (eds): *Manual of Clinical Microbiology*, 5. baskı" kitabında s. 723, American Society of Microbiology, Washington (1995).