

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA**

**FACOLTÀ DI SCIENZE MM.FF.NN.**

**Laurea di primo livello in Biologia Molecolare**



**Elaborato di Laurea**

**SPETTRI DI SENSIBILITÀ DI CEPPI DI *Candida albicans*,  
ISOLATI DA MATERIALE BIOLOGICO,  
NEI CONFRONTI DI UN NUOVO FARMACO ANTIFUNGINO**

**Tutor: Ch.mo Prof. Giulio Bertoloni**

**Dipartimento di Istologia, Microbiologia e Biotecnologie Mediche**

**Laureanda: Elisabetta Zacchello**

**ANNO ACCADEMICO 2006/2007**

## INDICE

ABSTRACT

INTRODUZIONE	pag.1
<i>Candida albicans</i>	pag.1
Suscettibilità agli antifungini	pag.3
Scopo della tesi	pag.5
MATERIALI E METODI	pag.6
Isolati	pag.6
Allestimento delle colture di <i>Candida albicans</i>	pag.6
Sospensioni cellulari	pag.6
Agente antifungino	pag.7
Determinazione della Minima Concentrazione Inibente (MIC)	pag.7
Determinazione della Minima Concentrazione Fungicida (MCF)	pag.8
RISULTATI E DISCUSSIONE	pag.9
BIBLIOGRAFIA	pag.14

## ABSTRACT

Negli ultimi anni l'incidenza delle micosi è incrementata drammaticamente. Un esempio è fornito da *Candida albicans*, un fungo opportunisto responsabile di gravi micosi a livello cutaneo, mucocutaneo e sistemico tra cui la vulvovaginite recidivante (RVVC), infezione molto diffusa nella popolazione femminile. L'emergere di effetti collaterali e l'insorgere di resistenze nei confronti degli agenti antifungini correntemente in uso hanno stimolato la comunità scientifica ad intensificare la ricerca di nuovi agenti antifungini. Il posaconazolo è il nuovo triazolo in III fase di sperimentazione di cui si vuole saggiare l'attività nei confronti di ceppi di *C.albicans* isolati da RVVC e di cui si vuole comparare l'efficacia con l'amfotericina B, il fluconazolo, l'itraconazolo, il ketoconazolo ed il voriconazolo. I test di suscettibilità sono stati svolti attraverso il metodo delle microdiluizioni in brodo in RPMI 1640 seguendo le linee guida suggerite dalla NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards). I risultati ottenuti sono stati soddisfacenti: i valori di MIC<sub>50</sub> e MIC<sub>90</sub> rispettivamente 0.0039µg/ml e 0.031µg/ml, hanno dimostrato la maggiore sensibilità dei ceppi di *C.albicans* nei confronti del posaconazolo rispetto agli altri antifungini e che la terapia con azoli non sembra indurre la comparsa di ceppi resistenti.



## INTRODUZIONE

Negli ultimi 20 anni l'incidenza delle micosi ed in particolare di quelle sistemiche è incrementata drammaticamente (1).

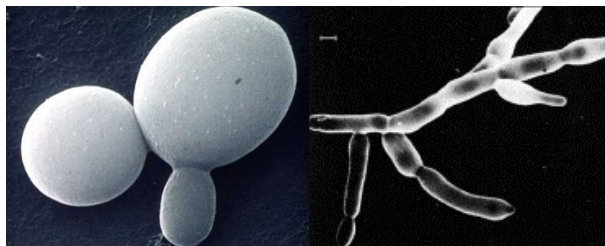
Un esempio è fornito dalla *Candida albicans*, quarto agente di infezione nosocomiale: la sola candidemia occorre con un tasso di infezione di 8-10 persone su 100 mila all'anno ed è associata ad una mortalità del 30-50% (2,3). Le ragioni sono da ricondurre principalmente all'aumentato numero di individui a rischio: quelli con un sistema immunitario compromesso (AIDS); i malati oncologici sottoposti a radio- e chemioterapia; i trapiantati trattati con farmaci immunosoppressivi. Altri fattori predisponenti sono rappresentati dall'aumentato impiego di dispositivi intravenosi, lo sviluppo di tecniche chirurgiche più aggressive, la prolungata degenza nelle unità di cura intensiva e la somministrazione di terapie antibatteriche, che alterano la normale flora microbica (1).

Attualmente le terapie antifungine prevedono l'impiego di composti polienici ed azolici, ma l'emergere rispettivamente di effetti collaterali e resistenze, unitamente a quanto detto precedentemente, hanno stimolato la comunità scientifica ad intensificare la ricerca di nuovi, più sicuri ed efficienti mezzi per combattere le infezioni fungine.

### *Candida albicans*

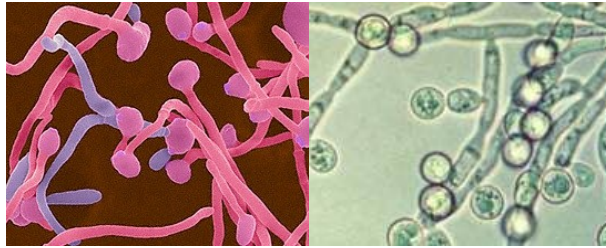
*Candida albicans*, microrganismo appartenente al Phylum *Ascomycota* Ordine *Saccharomycetales*, è presente come commensale sulla cute, nella cavità orale, nel tratto intestinale e in quello urogenitale dell'uomo. È un organismo diploide con 8 paia di cromosomi per complessive 32Mb, che si sviluppa in modo ottimale ad una temperatura di 20°- 40°C e in ambienti in cui il pH è compreso tra 2 e 8 (4).

Essendo un fungo dimorfico può crescere come lievito o come muffa a seconda delle condizioni di coltura: lo troviamo sottoforma di cellule lievitiforni ovali gemmanti (diametro variabile 3-8 x 2-7µm) sulla superficie di un terreno ricco, mentre negli strati più profondi o in ambiente anaerobico si presenta in forma miceliale (fig.1).



**Figura 1:** cellule lievitiforni a sinistra, forma miceliale costituita da vere ife a destra.

Alcune caratteristiche, che permettono di differenziare la specie *C.albicans* dalle altre, sono la produzione del tubo germinativo, di clamidospore (fig.2) nonché la produzione di vere ife (fig.1) sia nei tessuti parassitati che “in vitro” (5).



**Figura 2:** tubo germinativo a sinistra e clamidospore a destra.

Nei comuni terreni di coltura le colonie di *C.albicans* appaiono inizialmente lisce, cremose, di colore bianco, simili a quelle dei batteri, mentre le colonie più vecchie e più grandi rugose e scanalate (fig.3).



**Figura 3:** colonie di *C.albicans* (da sinistra verso destra): colonie giovani, comparsa di micelio in colonie vecchie e variazione fenotipica.

Si riproduce per via asessuale attraverso la gemmazione delle blastospore, ma recenti studi hanno rilevato geni per la differenziazione sessuale, con la conseguente rielaborazione delle relazioni filogenetiche (6).

### **Patogenesi e virulenza delle infezioni da *Candida***

*C.albicans* è un patogeno opportunisto: è un microrganismo che non causa malattia in un contesto normale, ma solo quando introdotto in un sito non protetto (per esempio circolo ematico, tessuti); in tal caso però scatena una serie di infezioni, che, in base alle aree dell'organismo colpite, prendono il nome di candidosi cutanea, mucocutanea e sistemica.

*C.albicans* è la responsabile del 75% delle candidosi.

**Candidosi cutanea.** Sono compresi in questo gruppo l'intertrigine, l'onichia, la paronichia, il mugghetto orale e la vulvovaginite: patologie superficiali a carico della cute, delle unghie e delle mucose orali ed urogenitali.

**Candidosi mucocutanea.** È una micosi superficiale che comprende, oltre le candidosi sopraccitate, quella respiratoria e gastrointestinale. Insorge principalmente in bambini affetti da immunodeficienza con compromissione dei meccanismi immunitari T-dipendenti o da leucemia o endocrinopatie.

**Candidosi sistemica.** È la micosi che fa registrare il maggior numero di decessi, ed essendo il microrganismo diffuso per via ematica, coinvolge molti organi. I fattori predisponenti sono l'impiego della fleboclisi e delle terapie a base di farmaci antibatterici e immunosoppressivi, l'introduzione di droghe per via endovenosa, gli interventi di cardiocirurgia e chirurgia addominale, l'AIDS e i prolungati periodi di ospedalizzazione.

Delle micosi precedentemente nominate, la **candidosi vulvovaginale (VVC)** è quella presa in esame nella presente tesi. Essa si manifesta con un'inflammazione locale con emissione di un essudato giallo-biancastro e comparsa di pseudomembrane, provocando prurito e bruciore. Colpisce tre donne su quattro almeno una volta in età fertile, agevolata da fattori quali la gravidanza, il diabete, l'assunzione di ormoni o di terapie antibatteriche prolungate. Ma anche le abitudini alimentari, sessuali e l'igiene personale, che nel 5% delle donne concorrono alla comparsa della VVC recidivante (RVVC). Si parla di RVVC quando ricorrono almeno quattro episodi di VVC in un anno (4).

Perché le infezioni da *C.albicans* possano aver luogo, è necessario che il fungo esprima dei fattori detti di virulenza. Essi variano in base al tipo di infezione (mucosale o sistemica), al sito, allo stadio dell'infezione e alla natura della risposta dell'ospite. Fra questi troviamo il dimorfismo, i fattori di adesione, lo *switching* fenotipico e l'attività lipolitica o proteolitica extracellulare.

Si ritiene, però, che questi fattori di virulenza agiscano anche allo stadio non patogenico (commensalità o colonizzazione) oltre che a quello patogenico (candidosi), non a caso, lo stato fisiologico dell'ospite sembra essere la condizione primaria che governa l'eziologia delle candidosi (7).

### **Suscettibilità agli antifungini**

La resistenza agli agenti antimicotici correntemente in uso, polieni ed azoli, sta assumendo importanti implicazioni riguardo la morbilità, la mortalità e l'alto costo della degenza ospedaliera. L'attenzione si è perciò concentrata sullo sviluppo di un'accurata comprensione dei meccanismi di resistenza, sul miglioramento dei metodi di analisi, sullo studio dei meccanismi con cui essa si innesca verso nuove molecole, sui metodi per prevenirne la diffusione e sulla ricerca di nuovi antifungini.

I *polieni* sono macrolidi ciclici la cui azione consiste nell'interazione con gli steroli di membrana, che porta alla formazione di pori acquosi responsabili della fuoriuscita di componenti citoplasmatici vitali. Un valido rappresentante di questo gruppo è l'amfotericina B, molto efficace, ma anche altamente nefrotossica.

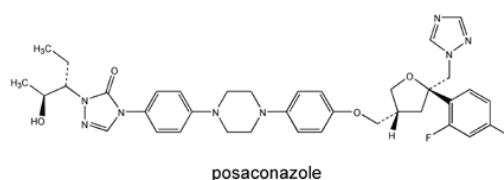
Gli *azoli* sono farmaci di sintesi suddivisi in due classi: gli imidazoli (ketoconazolo) aventi due atomi di azoto negli anelli azolici e i triazoli (itraconazolo, fluconazolo e voriconazolo) che invece ne hanno tre. Essi danneggiano la membrana citoplasmatica dei funghi inibendo l'enzima 14- $\alpha$ -

demetilasi, un enzima microsomiale citocromo P450-dipendente codificato dal gene ERG11, che catalizza la rimozione del gruppo 14- $\alpha$ -metilico dal lanosterolo, causando l'accumulo di 14- $\alpha$ -steroli metilati e la diminuzione dell'ergosterolo, principale componente steroideo presente nella membrana citoplasmatica. L'effetto finale è il blocco della replicazione dei miceti e, nel caso della *Candida*, anche l'inibizione della trasformazione delle cellule di lievito in ife.

La resistenza agli azoli è un fenomeno complesso causato principalmente da mutazioni puntiformi plurime o dalla sovraespressione di ERG11, ma anche dei geni (CDR1,CDR2) che codificano le pompe di efflusso per i farmaci antifungini (8).

### Posaconazolo

Il posaconazolo è un nuovo triazolo, strutturalmente correlato con l'itraconazolo, in III fase di sperimentazione, caratterizzato da un ampio spettro d'azione contro varie specie di funghi e muffe.



Questa molecola ha inoltre dimostrato di avere una specificità maggiore ed una tossicità minore rispetto agli altri azoli in quanto molto più affine agli enzimi del citocromo P450 fungino rispetto ai corrispondenti enzimi umani.

Da studi effettuati "in vivo" sono emersi dati confortanti: nel 43% degli individui affetti da infezione fungina invasiva refrattaria si è osservato un responso clinico positivo. Il posaconazolo veniva assunto sotto forma di sospensione orale con dosi di 400mg x 2 die assieme a cibo (meglio se ricco di grassi) per migliorarne l'assorbimento; inoltre mostrava una lunga emivita (35h) e raggiungeva la concentrazione costante dopo 7-10gg di somministrazione (9).

Il posaconazolo è inoltre risultato essere dotato di bassa tossicità, ottima biodisponibilità e ben tollerato: gli effetti collaterali (problemi gastrointestinali e cefalea) sono molto limitati e le interazioni farmacologiche (es. farmaci immunosoppressivi) sono minime; l'eliminazione avviene soprattutto per via intestinale in forma immodificata (10).



### **Scopo della tesi**

Nel presente lavoro sono stati presi in considerazione 115 ceppi di *C.albicans* isolati da pazienti affette da candidosi vulvovaginale recidivante (RVVC), sostenuta da *Candida albicans*, al fine di: i) determinare lo spettro di sensibilità nei confronti di un nuovo farmaco antifungino ancora in fase di sperimentazione, il posaconazolo, sia come minima concentrazione inibente che come minima concentrazione fungicida; ii) comparare i risultati ottenuti con i valori di MIC determinati in precedenza sugli stessi ceppi di *Candida* nei confronti di amfotericina B, fluconazolo, itraconazolo, ketoconazolo e voriconazolo.

Con questo lavoro si voleva stabilire la validità del nuovo farmaco nella terapia delle RVVC che attualmente non rispondono alle terapie attuate con composti azolici.

## MATERIALI E METODI

### Isolati

I ceppi di *Candida albicans* sono stati isolati ed identificati da campioni di essudato vaginale, raccolti ed analizzati nel laboratorio di microbiologia dell'ospedale di Vicenza.

Le pazienti da cui provenivano i ceppi risultavano tutte affette da vulvovaginite recidivante da *Candida* (RVVC) documentata. I criteri di esclusione erano invece i seguenti: gravidanza in atto o allattamento, sistema immunitario compromesso in seguito a malattie (es. AIDS), presenza nell'essudato vaginale del protozoo *Trichomonas vaginalis*, diabete, uso di antibiotici o antimicotici nella settimana precedente alla raccolta.

I ceppi di *C.albicans* sono pervenuti nel nostro laboratorio in provette CRYOBANK (Mast Diagnostic, UK) e conservate a -20°C.

### Allestimento delle colture di *Candida albicans*

Per ogni ceppo è stata allestita una subcoltura su piastre di Sabouraud agar (1%(p/v) di digerito enzimatico di caseina, 2%(p/v) di destrosio, 1.5%(p/v) di agar, pH 5.6) e incubate a 35°C. Dopo 24 ore venivano allestite le sospensioni cellulari, partendo da colonie ben isolate, da utilizzare nei saggi di suscettibilità al posaconazolo.



**Figura 4:** colonie di *C.albicans* su piastra di Sabouraud agar.

### Sospensioni cellulari

Le sospensioni cellulari sono state preparate prelevando con un'ansa le colonie dalle piastre Petri e stemperandole in provette contenenti 5ml di soluzione fisiologica (NaCl 0.9%) sterile. Le densità di tutte le sospensioni cellulari sono state regolate a 0.5 Unità McFarland come previsto dalla NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) (11).

### **Agente antifungino**

Il posaconazolo in polvere, gentilmente fornito dalla Schering-Plough S.p.a. Milano, è stato sciolto in dimetilsolfossido a una concentrazione di 1mg/ml e conservato in aliquote di 1ml a 4°C, che venivano scongelate per l'utilizzo a temperatura ambiente.

### **Determinazione della Minima Concentrazione Inibente ( MIC )**

La minima concentrazione inibente è definita come la concentrazione più bassa del composto in esame in grado di inibire la crescita di un dato organismo.

Nel caso specifico, la determinazione dell'attività antimicotica del Posaconazolo, su ciascun ceppo, è stata eseguita utilizzando il metodo delle microdiluizioni in brodo su micropiastre da 96 pozzetti con due differenti terreni di crescita: Sabouraud liquido contenente 1%(p/v) di digerito enzimatico di caseina, 2%(p/v) di destrosio ed RPMI 1640 (Sigma) contenente 0.3%(p/v) di L-glutammina, 2%(p/v) di glucosio e MOPS 0.165M (Gibco Laboratories, Milano, Italia) a un pH 7.0.

In entrambi i casi le micropiastre contenevano in ciascun pozzetto 200µl di brodo a cui era stato addizionato l'antifungino diluito a fattore 2.

Per ogni ceppo il test è stato effettuato su 24 pozzetti, l'ultimo dei quali veniva destinato al controllo positivo di crescita: l'ambito di concentrazione del posaconazolo era compreso tra 0.000015-64µg/ml in Sabouraud e tra 0.0000019-8µg/ml in RPMI.

Infine si è proceduto con l'inoculo della sospensione cellulare con una quantità compresa tra 5-10µl per ottenere una concentrazione finale di 1.5-8 x 10<sup>3</sup> UFC/ml. Ultimato l'allestimento le micropiastre, chiuse con il loro coperchio, sono state avvolte in stagnola e incubate a 35°C in ambiente umido.

Le MIC lette dopo 24 ore di incubazione sono state determinate per mezzo di un lettore di micropiastre ( $\lambda=620$ ) come la più bassa concentrazione di farmaco che produceva una torbidità pari al 50% rispetto al pozzetto di controllo.

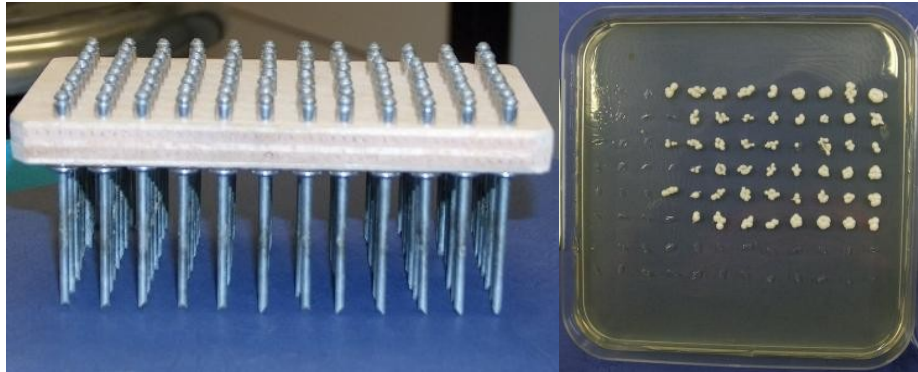
I test di suscettibilità sono stati svolti seguendo le linee guida della NCCLS.

Come ceppi di controllo sono stati usati la *Candida krusei* ATCC® 6258 e la *Candida parapsilosis* ATCC® 22019 (American Type Culture Collection) (11).

### **Determinazione della Minima Concentrazione Fungicida ( MCF )**

Al fine di determinare l'attività fungicida del posaconazolo, dopo la lettura delle MIC sono stati trasferiti circa 10 $\mu$ l di ciascun pozzetto, di alcune micropiastre, in piastre di Sabouraud agar.

Dopo 24 ore di incubazione a 35°C si svolgeva la lettura della minima concentrazione fungicida come la minore concentrazione in cui non si riscontrava alcuna crescita del fungo.



**Figura 5:** dispenser a sinistra ed una piastra di Sabouraud agar usata per la determinazione dell'attività fungicida a destra.

## RISULTATI E DISCUSSIONE

Nel presente lavoro sono stati presi in considerazione 115 ceppi di *C.albicans* su 138 che in precedenza erano stati sottoposti a test di suscettibilità nei confronti di amfotericina B, fluconazolo, itraconazolo, ketoconazolo e voriconazolo. I risultati ottenuti dimostravano che: per la maggior parte dei ceppi le Minime Concentrazioni Inibenti (MIC) rientravano negli intervalli di concentrazione definiti come sensibili dalla NCCLS, tali valori erano compresi fra 0.016 e 0.125µg/ml per l' amfotericina B, fra <0.125 e 16µg/ml per il fluconazolo, fra 0.008 e 1µg/ml per l'itraconazolo e fra 0.008 e 0.5µg/ml per il ketoconazolo ed il voriconazolo.

	Intervallo MIC	Media	MIC <sub>50</sub>	MIC <sub>90</sub>	Intervallo MCF	Media
<b>Amfotericina B</b>	0,016-0,125	0,06	0,06	0,06	0,06->16	0,63
<b>Fluconazolo</b>	<0,125-16	0,737	0,25	0,5	0,25->256	33,88
<b>Itraconazolo</b>	<0,008-1	0,063	0,016	0,06	0,016->16	5,063
<b>Ketoconazolo</b>	<0,008-0,5	0,018	0,008	0,008	<0,008->16	1,144
<b>Voriconazolo</b>	<0,008-0,5	0,019	0,008	0,008	<0,008->16	2,774

**Tabella 1:** intervallo entro cui si estendono i valori di MIC e MCF dei farmaci e relativa media.

Un solo ceppo era risultato essere resistente all'itraconazolo e 7 su 138 (5.07%) avevano fornito valori di MIC che li facevano inserire nel gruppo dei sensibili dose dipendente nei confronti di almeno un farmaco.

Prendendo in considerazione i singoli farmaci, tutti i ceppi presentavano dei valori di MIC molto inferiori a quelli stabiliti dalla NCCLS riguardo l'amfotericina B, il ketoconazolo e il voriconazolo; 3 ceppi (2.17%) erano risultati sensibili dose dipendente nei confronti di fluconazolo e 6 ceppi (4.34%) nei confronti dell'itraconazolo. Anche i dati ottenuti dal calcolo della MIC<sub>50</sub> (Minima Concentrazione Inibente il 50% dei ceppi) e della MIC<sub>90</sub> (Minima Concentrazione Inibente il 90% dei ceppi) (tab.1) avevano ribadito la buona sensibilità dei ceppi saggiati nei confronti di tutti i farmaci.

Inoltre, dalla valutazione della Minima Concentrazione Fungicida (MCF) era emersa l'efficacia, anche a basse concentrazioni, di amfotericina B, itraconazolo, ketoconazolo e voriconazolo, rispettivamente con valori compresi fra 0.06 e 16µg/ml, 0.016 e 16µg/ml, 0.008 e 16µg/ml e nuovamente 0.008 e 16µg/ml.

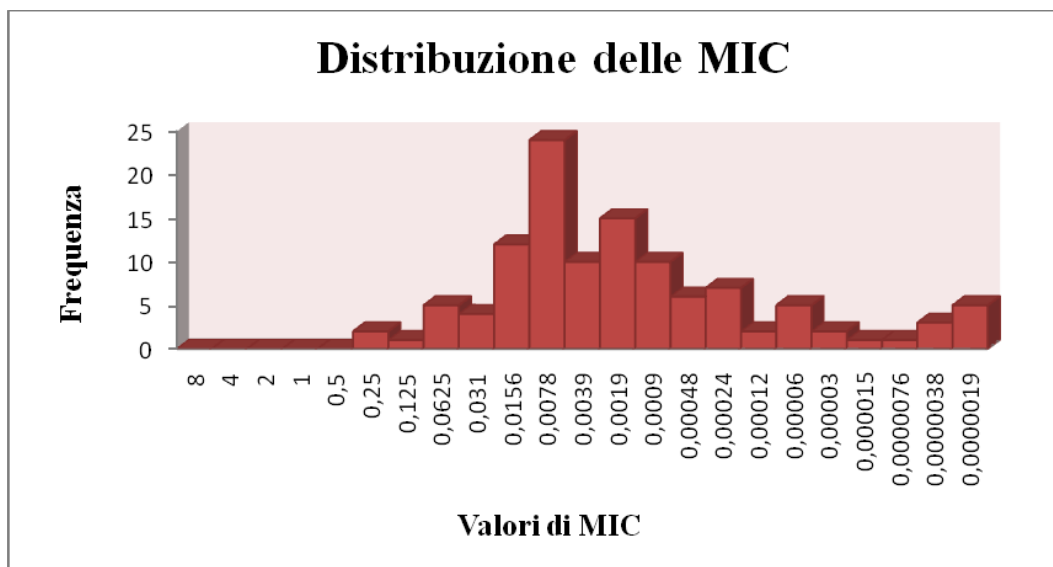
I test di sensibilità sono stati effettuati su kit commerciale specifico per lieviti (Sensitre Yeastone, Diagnostic System, England).

Invece per quanto riguarda il presente lavoro, i valori di MIC misurati in RPMI, esposti in tabella 2 e 3, dimostrano che nessuno dei 115 ceppi presi in esame risulta essere resistente al posaconazolo. Infatti, tutti i valori di MIC misurati sono molto bassi, sottolineando così l'elevata attività antifungina del posaconazolo.

Al contrario, le MIC misurate in Sabouraud sono risultate abbastanza omogenee fra loro, ma sempre superiori a quelle ottenute in RPMI.

Ceppo	MIC		Ceppo	MIC		Ceppo	MIC	
	SAB	RPMI		SAB	RPMI		SAB	RPMI
1	0,000015	0,031	67	16	0,00006	132	0,00024	0,0078
7	0,031	0,0156	68	0,5	0,0078	133	8	0,00048
8	32	0,031	69	32	0,0078	134	32	0,0019
9	32	0,0078	72	32	0,0078	135	32	0,0009
10	16	0,0156	74	4	0,25	136	0,25	0,0078
11	32	0,0156	76	32	0,0078	137	0,0078	0,0000038
12	32	0,0156	77	0,5	0,25	138	8	0,0000076
13	16	0,0156	78	32	0,0078	140	0,00024	0,0000019
14	16	0,0078	79	32	0,0039	142	8	0,0000019
15	32	0,0078	80	8	0,0078	143	16	0,0078
16	16	0,125	83	32	0,0019	145	16	0,0156
22	0,000015	0,0019	84	32	0,00024	146	8	0,0000019
23	8	0,00024	86	32	0,0625	148	64	0,0019
24	16	0,0156	87	32	0,0039	150	16	0,0039
28	16	0,0019	88	64	0,0039	151	16	0,0009
29	16	0,0039	90	32	0,0625	152	64	0,0019
30	16	0,0019	91	32	0,0156	153	16	0,0078
31	16	0,0019	94	32	0,00048	154	32	0,00003
32	16	0,0009	96	32	0,0039	155	16	0,0078
34	32	0,0078	97	32	0,00048	156	16	0,0000038
35	16	0,0009	98	32	0,000015	157	8	0,0078
37	8	0,0039	99	32	0,0039	158	8	0,0078
38	0,000015	0,0078	100	32	0,0019	161	8	0,00012
40	8	0,0000019	101	32	0,0019	162	8	0,0009
43	16	0,0009	102	32	0,00006	164	16	0,00024
46	16	0,0000038	103	32	0,031	166	32	0,00048
47	32	0,0625	105	32	0,0039	167	64	0,00006
48	32	0,0078	107	32	0,0039	168	32	0,0156
49	16	0,0078	108	32	0,00006	169	64	0,0156
50	16	0,031	110	64	0,0009	170	32	0,0078
51	16	0,00048	111	32	0,0078	172	32	0,0156
52	16	0,0078	114	16	0,0009	173	16	0,0019
55	16	0,0156	116	16	0,0019	174	32	0,0625
58	16	0,00024	117	16	0,0009	177	32	0,00012
60	16	0,0078	119	16	0,0009	178	32	0,00024
61	16	0,00048	126	4	0,0019	180	0,0625	0,0625
62	0,031	0,00006	127	0,031	0,00024	181	32	0,00024
63	16	0,00003	130	32	0,0019	<i>C.p.*</i>	-	0,0000019
64	16	0,0000019	131	64	0,0019	<i>C.k.**</i>	-	0,0625

**Tabella 2:** ceppi analizzati e relative MIC. (*C.parapsilosis\** e *C.krusei\*\**).



**Tabella 3:** distribuzione delle MIC in RPMI elencate in tab.2.

Ceppo	MCF		Ceppo	MCF	
	SAB	RPMI		SAB	RPMI
1	4	-	87	-	0,25
8	64	-	88	-	0,0039
11	>64	-	90	-	>8
15	>64	-	91	-	2
22	16	-	103	64	4
62	>64	2	105	32	0,125
69	32	1	107	32	4
72	>64	2	108	32	0,125
74	-	8	110	>64	2
76	-	>8	111	32	0,0625
77	8	4	114	32	1
78	-	>8	116	16	2
79	>64	4	117	16	1
80	-	1	119	32	2
83	-	1	126	8	1
84	-	0,0019	135	32	-
86	-	>8			

**Tabella 4:** ceppi analizzati e relative MCF.

Infatti, le Minime Concentrazioni Inibenti ottenute in Sabouraud sono comprese fra 0.000015 e 64µg/ml, mentre quelle ottenute in RPMI sono comprese tra 0.0000019 e 0.25µg/ml. Per quanto riguarda i valori di MIC<sub>50</sub> e MIC<sub>90</sub>, essi sono rispettivamente 16µg/ml e 32µg/ml in Sabouraud e 0.0039µg/ml e 0.031µg/ml in RPMI. Mentre per la MCF i valori rilevati sono compresi tra 4 e >64µg/ml in Sabouraud e tra 0.0019 e >8µg/ml in RPMI (tab.5).

	Intervallo	Media	MIC <sub>50</sub>	MIC <sub>90</sub>	Intervallo	Media
	MIC				MCF	

<b>RPMI 1640</b>	0,0000019- 0,25	0,0132	0,0039	0,031	0,0019->8	2,762
<b>Sabouraud</b>	0,000015-64	22,20	16	32	4 ->64	43,82

**Tabella 5:** intervallo entro cui si estendono i valori di MIC e MCF del posaconazolo e relativa media.

Nonostante i ceppi saggiati in Sabouraud ed RPMI siano gli stessi e le prove siano state effettuate nelle medesime condizioni, le differenze dei valori ottenuti nei due terreni sono notevoli.

Una così evidente differenza di risultati suggerisce un'interazione del terreno Sabouraud o di un suo componente col farmaco; sarà perciò interessante, successivamente, capire come il terreno può modificare l'effetto del farmaco.

La scelta di svolgere i test di sensibilità con un altro terreno, oltre all'RPMI consigliato dalla NCCLS, è stata presa allo scopo di individuarne uno alternativo più semplice e di pari validità; un'idea già presa in considerazione in precedenti studi (12).

Nel loro insieme, i dati rilevati in RPMI dimostrano che il posaconazolo è più efficace rispetto ai farmaci precedentemente saggiati.

Per quanto riguarda le MIC, intervallo, media e MIC<sub>50</sub> si accostano ai valori ottenuti con ketoconazolo e voriconazolo, mentre la MIC<sub>90</sub> è più simile a quella dell'amfotericina B e dell'itraconazolo. I valori della MCF, invece, si avvicinano per intervallo a quelli di ketoconazolo e voriconazolo, mentre la media al voriconazolo.

Fra le pazienti da cui sono stati isolati i ceppi, circa il 30% ha dichiarato di aver seguito in precedenza una terapia antimicotica, per lo più azolica. I dati ottenuti supportano l'ipotesi che la vulvovaginite recidivante non sia associabile con la resistenza nei confronti dei farmaci antifungini; l'uso di questi farmaci non sembra modificare gli spettri di sensibilità nei confronti degli azoli considerati.

Il fatto che, dall'analisi delle MIC, non siano stati rilevati ceppi resistenti agli azoli, ha portato a pensare che la terapia azolica seguita da molte pazienti sia valida e che la maggior parte delle vulvovaginiti recidivanti causate da *C.albicans* siano sostenute da ceppi non resistenti a tali farmaci. È molto probabile che l'efficacia del trattamento dipenda da altri fattori, quali la risposta immunitaria e la situazione locale dell'ospite e, non ultimo, la posologia prescritta dagli schemi terapeutici.



In conclusione, questo lavoro, seppure ancora incompleto, ci ha permesso di dimostrare: i) la maggiore sensibilità dei ceppi di *C.albicans* isolati da pazienti con RVVC nei confronti del posaconazolo rispetto gli altri antifungini; ii) che la terapia con azoli non sembra indurre la comparsa di ceppi resistenti; iii) che la non eradicazione dell'agente infettivo dipende più dalle caratteristiche dell'ospite che da quelle del parassita.

## BIBLIOGRAFIA

- 1) F. Sabatelli, R. Patel, P.A. Mann, C.A. Mendrick, C.C. Norris, R. Hare, D. Loebenberg, T.A. Black, P.M. McNicholas, (2006). *In vitro activities of posaconazole, fluconazole, itraconazole, voriconazole and amphotericin B against a large collection of clinically important molds and yeast*. Antimicrob Agents Chemoter. **50**(6):2009-2015.
- 2) X. Li, N. Brown, A.S. Chau, J.L. Lopez-Ribot, M.T. Ruesga, G. Quindos, C.A. Mendrick, R. Hare, D. Loebenberg, B. DiDomenico, P.M. McNicholas, (2004). *Changes in susceptibility to posaconazole in clinical isolates of Candida albicans*. J Antimicrob Chemother. **53**:74-80.
- 3) M.A. Pfaller, D.J. Diekema, D.J. Sheehan, (2006). *Interpretative breakpoints for fluconazole and Candida revisited: a blueprint for the future of antifungal susceptibility testing*. Clin Microbiol Rev. **19**(2):435-447.
- 4) R.F. Boyd, (1992). *Microbiologia generale*, seconda edizione italiana. Ed. Medical books. Cap.28:929-932.
- 5) M. La Placa, (2005). *Principi di microbiologia medica*, decima edizione. Ed. Società editrice Esculapio. Cap.41:413-414.
- 6) B.D. Davis, R. Dulbecco, H.N. Eisen, H.S. Ginsberg, (1995). *Microbiologia*, quarta edizione. Ed. Zanichelli. Cap.43:779-780.
- 7) Naglik, J. R., S.J. Challacombe, B. Hube, (2003). *Candida albicans secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis*. Microbiol Mol Biol. **67**:400-428.
- 8) F. Clementi, G. Fumagalli, R. Paletti, S. Nicosia, (2006). *Farmacologia generale e molecolare*, terza edizione. Ed. UTET. Cap.43:654-656.
- 9) A.J. Ullmann, O.A. Cornely, A. Burchardt, R. Hachem, D.P. Kontoyiannis, K. Töpelt, R. Courtney, D. Wexler, G. Krishna, M. Martinho, G. Corcoran, I. Raad, (2006). *Pharmacokinetics, safety and efficacy of posaconazole in patients with persistent febrile neutropenia or refractory invasive fungal infection*. Antimicrob Agents Chemoter. **50**(2):658-666.

- 10) T.J. Walsh, I. Raad, T.F. Patterson, P. Chandrasekar, G.R. Donowitz, R.E. Greene, R. Hachem, S. Hadley, R. Herbrecht, A. Langston, A. Louie, P. Ribaud, B.H. Segal, D.A. Stevens, J.A.H. van Burik, C.S. White, G. Corcoran, J. Gogate, G. Krishna, L. Pedicone, G. Hardalo, J.R. Perfect, (2007). *Treatment of invasive aspergillosis with posaconazole in patients who are refractory to or intolerant of conventional therapy: an externally controlled trial*. Clin Infect Dis. **44**:2-12.
  
- 11) National Committee for Clinical Laboratory Standards, (2002), *Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts*; Approved standard-Second edition. NCCLS document M27-A2. Wayne, PA. **22** n°15.
  
- 12) C. Gil-Lamaignere, R. Hess, S. Salvenmoser, K. Heyn, R. Kappe, F.M.C. Müller, (2005). *Effect of media composition and in vitro activity of posaconazole, caspofungin and voriconazole against zygomycetes*. J Antimicrob Chemother. **55**:1016-1019.