

Evaluarea efectului antifungic al unui nou derivat de propiconazol față de 64 tulpini levurice izolate din micoze vaginale

MIHAI MAREȘ¹, ALINA ȘTEFANACHE², IULIANA POPOVICI², FLIUR MACAEV³,
DUMITRU BUIUC⁴

(1) *Catedra de Microbiologie, Facultatea de Medicină Dentară, Universitatea „Petre Andrei” Iași,*

(2) *Facultatea de Farmacie, Universitatea de Medicină și Farmacie „Gr. T. Popa” Iași*

(3) *Institutul de Chimie Organică, Chișinău, Republica Moldova*

(4) *Facultatea de Medicină, Universitatea de Medicină și Farmacie „Gr. T. Popa” Iași*

Primit (Received): 14.08.2007 / Acceptat (Accepted) : 10.09.2007

Evaluation of the antifungal effect of a new propiconazole derivate against 64 yeast strains isolated from vaginal mycoses

Abstract: *Aim.* The aim of this paper is to present the evaluation of the antifungal activity of a new triazole derivative – propiconazole nitrate, under in vitro conditions resembling the vaginal microenvironment. *Material and method.* We performed the susceptibility testing in a vagina-simulative medium using the CLSI M27-A2 standard guidelines and 64 clinical yeast strains. The range of tested concentrations has varied between 0.0625-16 mg/L. The minimal inhibitory concentration (MIC) was considered the lowest concentration of the drug which corresponds to 80% reduction in turbidity compared with that of the drug-free growth control. *Results.* We obtained a MIC₉₀ of 0.5 mg/L and a MIC₅₀ of 0.0625 mg/L respectively. *Discussion.* The tests exhibited a strong antifungal effect of this new azole compound which may be useful for the treatment of mycotic vaginitis. These results encourage the future researches in order to determine the interpretative breakpoints, to evaluate the in vitro – in vivo correlations, and to find the appropriate doses in order to start clinical trials.

Keywords: *propiconazole nitrate, antifungal, vaginitis*

Rezumat: *Scop.* Scopul acestui articol este de a prezenta evaluarea activității antifungice a unui nou derivat triazolic – nitratul de propiconazol, în condiții de biomimetism similare mediului vaginal. *Material și metodă.* Testările s-au realizat într-un mediu sintetic similar compozițional cu fluidul vaginal, utilizând recomandările standardului CLSI M27-A2 și 64 izolate clinice. Concentrațiile testate au variat între 0,0625-16 mg/L. Concentrația minimă inhibitorie (CMI) a fost considerată cea mai redusă concentrație de antifungic care a produs o reducere de 80% a turbidității comparativ cu cea a matorului liber de antifungic. *Rezultate.* S-a obținut o CMI₉₀ de 0,5 mg/L și o CMI₅₀ de 0,0625 mg/L. *Discuții.* Testele efectuate au indicat un puternic efect antifungic al noului derivat de propiconazol, ceea ce poate fi util în tratamentul micozelor vaginale. Rezultatele obținute încurajează cercetările viitoare în direcția determinării punctelor de ruptură, a determinării gradului de corelație in vitro – in vivo și a stabilirii dozelor corespunzătoare în vederea începerii studiilor clinice.

Cuvinte cheie: *propiconazol nitrat, antifungice, vaginită*

Introducere

Propiconazolul este un derivat azolic conceput și lansat pe piață de Janssen Pharmaceutics (Belgia) în 1979 și a fost folosit în agricultură ca fungicid foliar. Noul derivat de propiconazol (propiconazolul nitrat) a fost sintetizat după o metodă originală de către cercetători din cadrul Institutului de Chimie al Academiei de Științe din Republica Moldova și studiat din punct de vedere farmaceutic la Institutul Național de Farmacie din Chișinău de către V. Valica. Metoda de obținere și purificare, precum și identificarea și dozarea prin diverse metode a nitratului de propiconazol au făcut obiectul unei teze de doctorat (1).

Datorită toxicității reduse care caracterizează acest nou derivat azolic - DL₅₀ = 389,7 ± 65,2 mg/kg greutate vie la șoareci (1), există premisele utilizării sale în terapia diverselor micoze, în condițiile în care se poate demonstra prin dovezi obiective activitatea antifungică constantă și exercitată la concentrații cât mai reduse față de o gamă variată de agenți etiologici fungici.

În vederea evaluării posibilităților de folosire a nitratului de propiconazol în terapia micozelor vulvovaginale s-a recurs la efectuarea unor studii *in vitro* utilizând tulpini levurice cu o astfel de proveniență și un mediu de testare lichid similar fluidului vaginal. Am considerat că utilizarea acestuia este benefică pentru obținerea unor rezultate cât mai relevante deoarece condițiile de testare *in vitro* imită condițiile existente *in vivo* (compoziție chimică, pH), adică sunt asigurate condiții similare celor din focarul infecțios.

Material și metodă

- *Tulpini levurice* izolate din vaginite micotice (n = 64)
- *Propiconazol nitrat* - pulbere, puritate 99,4%, proveniență: Institutul de Chimie al Academiei de Științe din Republica Moldova.
- *Medii și reagenți*:
 - a) Agar Sabouraud (Biokar Diagnostics, Franța), turnat în plăci Petri
 - b) Mediu SVSM (Synthetic Vagina-Simulative Medium) preparat după metoda citată de Moosa *et al.* (2)

Compoziție: clorură de sodiu 3,5g, hidroxid de potasiu 1,4g, hidroxid de calciu 0,22g, albumină serică bovină 18 mg, acid lactic 90% 2,2g, acid acetic glacial 1,0g, glicerol 50% 0,32g, uree 0,4g, glucoză 5g și apă deionizată până la 1000 ml.

Preparare și păstrare: ingredientele (cu excepția celor termosensibile – albumina și ureea) au fost solubilizate în apa deionizată, apoi soluția astfel obținută a fost sterilizată prin autoclavare 15 minute la 121°C. După răcire, am adăugat și componentele termosensibile, în proporțiile recomandate, obținându-se mediul gata de utilizare. pH-ul acestuia a fost ajustat la 4,2 folosindu-se după caz, fie soluție 1M acid clorhidric, fie soluție 40 mM hidroxid de sodiu. Mediul astfel preparat a fost păstrat în condiții de refrigerare (2°-8°C) până în momentul utilizării.

- c) soluție salină sterilă (0,85% NaCl)
- d) dimetil-sulfoxid (DMSO) (Fluka, Germania)

- e) standard 0,5 McFarland (bioMérieux, Franța)
 - a) *Dispozitive și aparate* pH-metru electronic (Denver Instruments, SUA)
 - b) spectrofotometru UV-Vis Cary 50 Conc (Varian, SUA)
 - c) balanță analitică GR-200 (A&D Company, Japonia)
 - d) pipete automate
 - e) hotă cu flux laminar TWO-30 (Faster, Italia)
 - f) incubator termoreglabil IP200 (Mettler, Germania)
- *Mod de lucru*. Am utilizat metoda de testare M27-A2 recomandată de CLSI (3), parcurgând următoarele etape:

- a) *prepararea soluției-stoc a derivatului de propiconazol*.

Cantitatea de agent antifungic necesară preparării soluției-stoc am calculat-o după formula:

$$\text{Cantitatea (mg)} = \frac{\text{Volumul necesar (ml)} \times \text{Concentrația dorită (mg/ml)}}{\text{Puritatea substanței antifungice}}$$

- b) *pregătirea seriilor de diluții ale agentului antifungic*.

Deoarece concentrațiile finale alese pentru testare sunt 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125 și 0.0625 μg/ml, am preparat mai întâi soluții de 100 ori mai concentrate (3200, 1600 ... 6.25 μg/ml) utilizând soluția-stoc (3200 μg/ml) și volume corespunzătoare de DMSO. Apoi, din fiecare concentrație astfel pregătită, am pipetat 100 μl în fiole cu volum corespunzător și am adăugat 900 μl mediu SVSM obținând o diluție de 1:10 a agentului antifungic și a DMSO (concentrațiile intermediare: 320, 160 ... 0.625 μg/ml). Diluția finală (1:100) se obține prin adăugarea inoculului (suspensia levurică în mediu SVSM) în volum de 900 μl peste 100 μl din fiecare concentrație intermediară a agentului antifungic. Am obținut astfel concentrațiile finale dorite ale nitratului de propiconazol (32, 16, ... 0.0625 μg/ml) și o diluare a DMSO de 1:100.

- c) *Pregătirea inoculului*. Etapele urmate în pregătirea inoculului:

➤ *Obținerea de subculturi pe PDA pentru tulpinile de testat*, utilizând culturile-stoc purificate păstrate la temperatura de refrigerare.

- Temperatura de incubare a fost de $35^{\circ} \pm 0,1^{\circ}\text{C}$.
- *Obținerea inoculului-stoc* prin suspensionarea a 5 colonii cu diametrul de aproximativ 1 mm, în vârstă de cca. 24 ore, în soluție salină.
 - *Ajustarea densității suspensiei* prin adăugarea de soluție salină sterilă, astfel încât absorbanta determinată spectrofotometric să corespundă celei produse de standard-ul 0,5 McFarland la o lungime de undă de 530 nm. Încărcătura finală a inoculului-stoc astfel pregătit variază între 1×10^6 și 5×10^6 celule/ml.
 - *Prepararea suspensiei de lucru sau a inoculului propriu-zis* prin diluarea 1:100 a inoculului-stoc în soluție salină sterilă, urmată de o nouă diluare 1:20 în SVSM a suspensiei obținute; rezultă o încărcătură în celule levurice/ml între $0,5 \times 10^3$ și $2,5 \times 10^3$.
- d) *Inocularea flacoanelor conținând diluții ale agentului antifungic* (fig. 1). Într-un interval de maxim 15 minute după standardizarea spectrofotometrică, din inocul am transferat câte 0,9 ml în fiecare flacon al seriei de diluții conținând 0,1 ml din concentrațiile intermediare menționate, respectiv în flaconul martor conținând 0,1 ml diluție 1:10 DMSO. Am obținut astfel o diluție 1:10 a fiecărei concentrații a agentului antifungic și o diluare cu 10% a inoculului. În paralel, am utilizat pentru fiecare tulpină testată și un martor de creștere obținut prin adăugarea unui volum de 900 μl inocul peste 100 μl diluție 1:10 DMSO în SVSM (diluția finală a DMSO – 1:100).
- e) *Incubarea flacoanelor inoculate* 46-52 ore la $35^{\circ} \pm 0,1^{\circ}\text{C}$, fără agitare.
 - f) *Citirea rezultatelor*. Gradul de creștere în flacoanele conținând agent antifungic l-am interpretat prin comparație cu cel existent în flacoanele martor (fără agent antifungic). Deoarece derivații azolici permit o creștere reziduală a levurilor în mediul de testare, se consideră că o inhibiție de 80% a creșterii indică o acțiune antifungică satisfăcătoare. Astfel, am comparat vizual turbiditatea fiecărui flacon conținând agentul antifungic cu turbiditatea unei diluții 1:4 în SVSM a martorului de creștere (ceea ce corespunde unei inhibiții de 80% a creșterii). CMI s-a considerat a fi cea mai mică concentrație a agentului antifungic care produce o inhibiție de 80% a creșterii (turbiditate identică sau mai slabă ca a martorului de control diluat 1:4).
 - g) *Interpretarea rezultatelor*. Deoarece nu se cunosc încă „punctele de ruptură” utile în interpretarea efectului antifungic al propiconazolului nitrat față de diversele tulpini aparținând genului *Candida*, este destul de dificil și hazardat de emis un rezultat cert privind sensibilitatea sau rezistența acestor tulpini. Singurele aprecieri cu caracter pragmatic sunt cele referitoare la concentrațiile minime inhibitorii pentru 50%, respectiv pentru 90% dintre tulpinile testate (CMI_{50} , respectiv CMI_{90}), precum și aflarea *frecvenței cumulative a CMI-urilor*. Pentru calcularea acestor indicatori statistici am utilizat programul **Excel** (*Microsoft Office XP Professional*), funcțiile „FREQUENCY” și „PERCENTILE”.

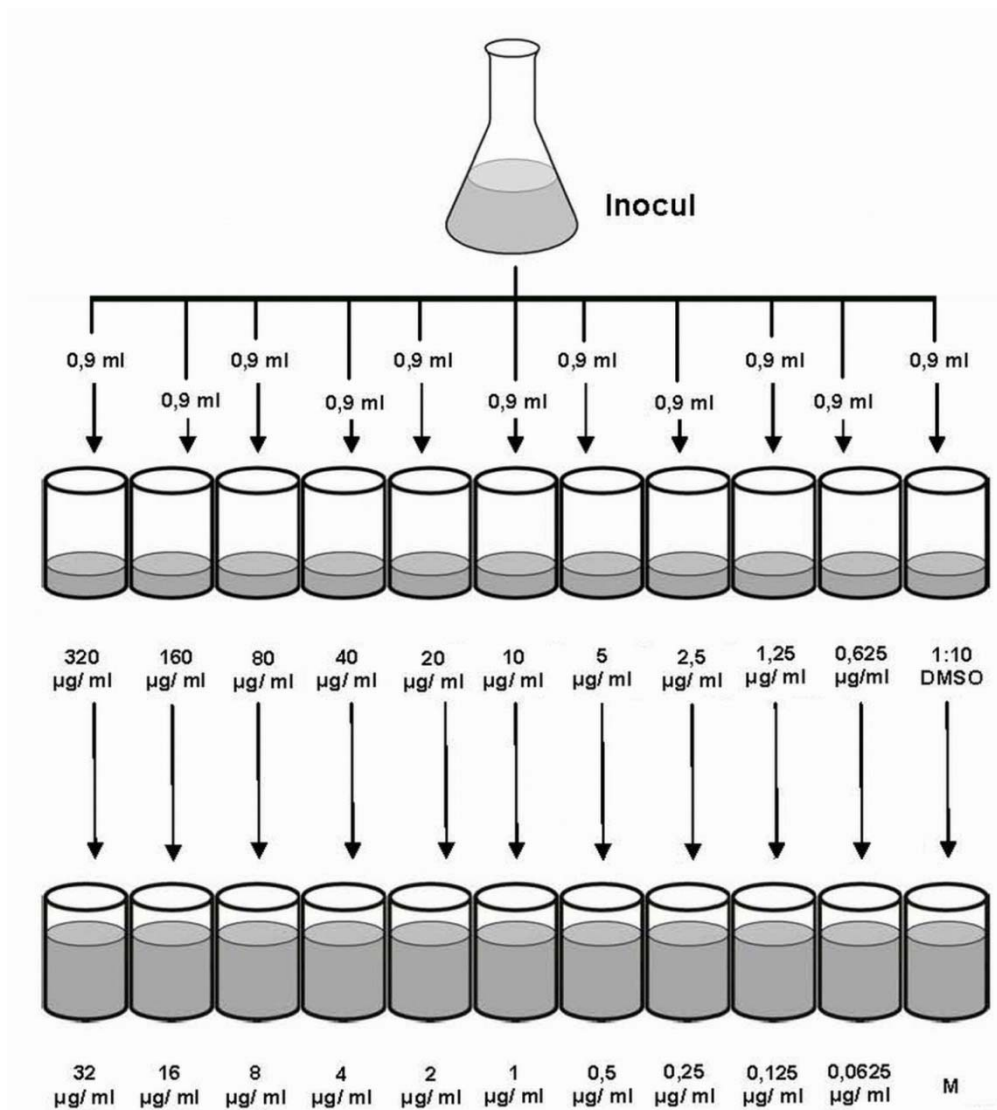


Figura nr. 1 Inocularea flacoanelor conținând diluțiile intermediare de propiconazol nitrat

Rezultate

Frecvența CMI-urilor nitrului de propiconazol în cazul celor 64 izolate levurice vaginale este prezentată în tabelul 1.

Tabelul 1

Frecvența CMI-urilor pentru tulpinile testate

Concentrația µg/ml	0.0625	0.125	0.25	0.50	1	2	4	8	16	32
Frecvența relativă (%)	51,36	18,92	18,92	2,70	8,10	0	0	0	0	0

Pe baza reprezentării grafice a frecvenței cumulative a CMI-urilor celor 64 izolate aparținând genului *Candida* (fig. 2) s-au determinat valorile CMI_{50} și CMI_{90} (0,0625 µg/ml, respectiv 0,5 µg/ml).

Variabilitatea procentului de tulpini inactivate depinde de concentrația propiconazolului nitrat în proporție de 87,70 %, coeficientul de corelație multiplă având valoarea $R^2 = 0,877$ (fig. 2). Regresia procentului de tulpini inactivate dependent de concentrația antifungicului are următoarea ecuație: $y = 0.3953Ln(x) + 0.1916$.

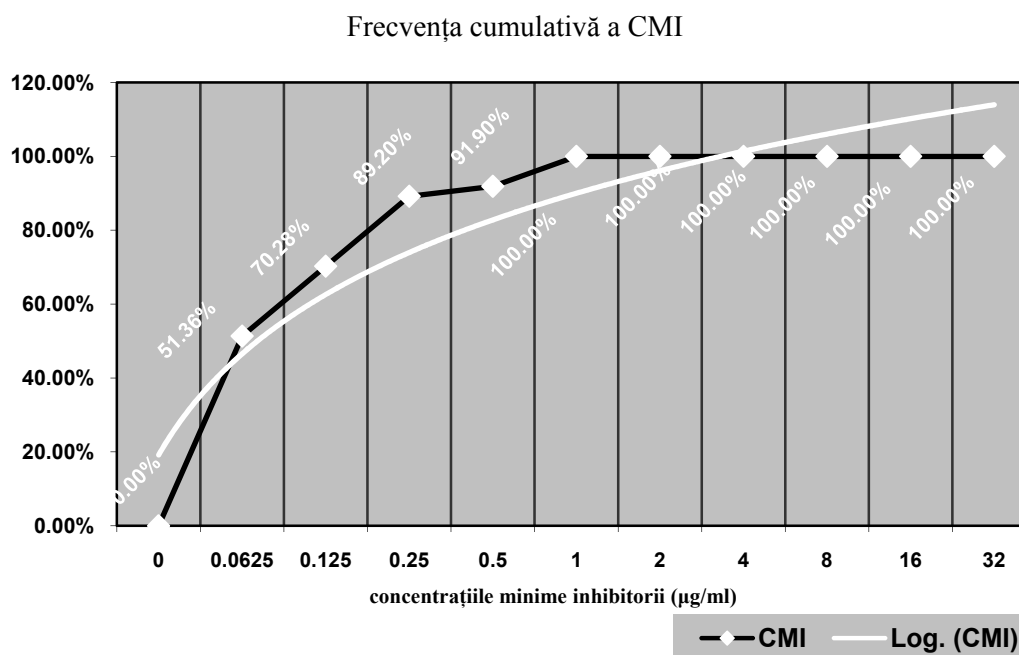


Figura nr. 2 Reprezentarea grafică a frecvenței cumulative a CMI-urilor

Discuții

Caracteristica principală a CMI-urilor este valoarea lor redusă (0,0625 ... 1,00 µg/ml), exprimată în condițiile unui mediu de testare similar celui vaginal. Aceasta poate constitui un avantaj în cazul folosirii topice a nitrului de propiconazol ca posibil agent terapeutic al micozelor vulvovaginale. Deoarece acidul acetic 17mM exercită o acțiune sinergică cu fluconazolul asupra tulpinilor de *Candida albicans* izolate din vulvovaginite candidozice determinând o reducere accentuată a CMI-urilor acestui antifungic (2) este posibil ca și în cazul nitrului de propiconazol să intervină același mecanism care ar explica valoarea scăzută a CMI-urilor. Rămâne însă de demonstrat prin studii comparative *in vitro* dacă întradevăr structura mediului de testare are repercusiuni majore asupra valorii CMI.

În ceea ce privește evaluarea efectului antifungic al acestui nou derivat de propiconazol într-un mediu sintetic similar celui vaginal, studiile întreprinse au prioritate mondială, consultarea literaturii de specialitate nerelevând prezența unor studii similare.

Rezultatele obținute sunt încurajatoare și impun continuarea studiilor atât în direcția determinării “punctelor de ruptură” necesare cuantificării comportamentului diferitelor izolate

levurice față de propiconazolul nitr, cât și în direcția obținerii de forme farmaceutice cu biodisponibilitate adecvată a substanței active, utilizabile în terapia micozelor cu diverse localizări.

Bibliografie

1. Valica V. *Teză de doctorat*. Universitatea de Medicină și Farmacie „N. Testemițanu” Chișinău; 2003.
2. Moosa M-Y S, Sobel J D, Elhalis H, Du W, Akins R - Fungicidal activity of fluconazole against *Candida albicans* in a synthetic vagina-simulative medium; *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2004; 48(1):161-167.
3. CLSI. *Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts M27-A2*. Approved Standard – second edition; Wayne; Pa; 2002.
4. Mareş M, Stefanache Alina, Patras Xenia, Valica V, Lupascu Maria, Levarda Camelia, Popovici Iuliana. Antifungal activity of a novel propiconazole derivative. In *Proceedings of 12th Panhellenic Pharmaceutical Congress*; Athens (Greece); 2005.