

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗ ΥΓΙΕΙΝΗ»
ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΑΣΦΑΛΕΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΥΔΑΤΩΝ
& ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ, ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

**Δημιουργία και αξιολόγηση μικροβιολογικής μεθόδου
προσδιορισμού των επιπέδων της ποζακοναζόλης στον
ορό του αίματος.**

ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ Κ. ΠΑΤΕΡΑ
Τεχνολόγος Ιατρικών Εργαστηρίων

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

ΛΑΡΙΣΑ 2015

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗ ΥΓΙΕΙΝΗ»
ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΑΣΦΑΛΕΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΥΔΑΤΩΝ
& ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ, ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

Δημιουργία και αξιολόγηση μικροβιολογικής μεθόδου
προσδιορισμού των επιπέδων της ποζακοναζόλης στον
ορό του αίματος.

ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ Κ. ΠΑΤΕΡΑ
Τεχνολόγος Ιατρικών Εργαστηρίων

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

ΛΑΡΙΣΑ 2015

ΕΠΙΒΛΕΠΟΝΤΕΣ:

Τιμολέων- Αχιλλέας Βυζαντιάδης

Αναπληρωτής καθηγητής Ιατρικής Βιοπαθολογίας - Μικροβιολογίας, Ιατρική Σχολή
Α.Π.Θ.

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Τιμολέων- Αχιλλέας Βυζαντιάδης

Αναπληρωτής καθηγητής Ιατρικής Βιοπαθολογίας - Μικροβιολογίας, Ιατρική Σχολή
Α.Π.Θ.

Σοφία Βακαλοπούλου

Αναπληρώτρια καθηγήτρια Αιματολογίας, Ιατρική Σχολή Α.Π.Θ.

Σπυρίδων Πουρνάρας

Αναπληρωτής καθηγητής Ιατρικής Μικροβιολογίας-Αφροδισίων Νοσημάτων Ιατρική
Σχολή Ε.Κ.Π.Α..

Περίληψη

Η ποζαконаζόλη είναι μια ισχυρή τριαζόλη με ευρύ φάσμα αντικυκητιακής δράσης. Χρησιμοποιείται στην προφύλαξη ή θεραπεία ασθενών με ανοσοκαταστολή. (*Hope WH et al., 2008 / Ullmann AJ, et al., 2007*) Με σκοπό να αποδειχθεί η επαρκής και σταθερή βιοδιαθεσιμότητά της και να επιβεβαιωθεί η αποτελεσματικότητα και η ασφάλεια της θεραπείας, είναι χρήσιμο να προσδιορίζονται τα επίπεδα του φαρμάκου στο αίμα. (*Andes D, et al., 2009 / Russell EL., 2011 / Howard SL, et al., 2012*) Οι μικροβιολογικές μέθοδοι παρακολούθησης των θεραπευτικών επιπέδων των αντιμυκητιακών φαρμάκων είναι απλούστερες και φθηνότερες, ενώ οι αναλυτικές είναι περισσότερο ευαίσθητες και ικανές να προσδιορίζουν και τους πιθανούς μεταβολίτες. (*Warnock DW, et al., 1988*) Όσον αφορά στην ποζαконаζόλη δεν υπάρχουν δραστικοί ή κλινικά σημαντικοί μεταβολίτες. (*Andes D, et al., 2009/ Kim H, et al., 2003*) Σκοπός είναι η δημιουργία και αξιολόγηση μικροβιολογικής μεθόδου για τον προσδιορισμό των επιπέδων της ποζαконаζόλης στον ορό του αίματος.

Abstract

Posaconazole is a potent triazole with broad spectrum of antifungal activity. It is used as a prophylactic or therapeutic agent in immunocompromised patients. In order to prove a sufficient and stable bioavailability and ascertain the efficacy and safety of treatment, the drug blood levels should be determined. Microbiological (bioassays) and analytical assays are in use for antifungal therapeutic drug monitoring (TDM). The first are simplest and less expensive, while analytical assays are more sensitive and able to determine the possible metabolites as well. Concerning posaconazole, there are not active or clinically significant metabolites. Aim of this study was the development and validation of a bioassay for the determination of posaconazole levels in blood serum.

Περιεχόμενα

Περίληψη.....	4
Αγγλική περίληψη (abstract).....	4
Περιεχόμενα.....	5
Ευχαριστίες.....	6
Εισαγωγή.....	7
Παρακολούθηση των θεραπευτικών επιπέδων.....	10
Η ποζακοναζόλη.....	12
Σκοπός.....	15
Μεθοδολογία.....	16
Υλικά.....	
Προετοιμασία θρεπτικού υλικού.....	
Προετοιμασία εναιωρήματος.....	
Προετοιμασία διαλύματος φαρμάκου (stock solution).....	
Προετοιμασία διαλύματος εργασίας (work solution).....	
Προετοιμασία συγκεντρώσεων καμπύλης βαθμονόμησης (standards).....	
Προετοιμασία δειγμάτων ποιοτικού ελέγχου (quality control- QC).....	
Προετοιμασία δείγματα ασθενών.....	
Εκτέλεση διαδικασίας.....	
Υπολογισμός διαμέτρων και τιμών.....	
Παράμετροι αξιολόγησης της μεθόδου.....	19
α) Γραμμικότητα της μεθόδου.....	
β) Σταθερότητα της ουσίας.....	
γ) Ευαισθησία της μεθόδου.....	
δ) Επαναληψιμότητα της μεθόδου.....	
ε) Ακρίβεια της μεθόδου.....	
ζ) Ανάκτηση της ουσίας.....	
Αποτελέσματα.....	21
Συζήτηση.....	31
Βιβλιογραφία.....	33

Κατάσταση Πινάκων

Πίνακας 1.1.....	σελ.11
Πίνακας 1.2.....	σελ.22
Πίνακας 2.1.....	σελ.23
Πίνακας 2.2.....	σελ.24
Πίνακας 2.3.....	σελ.25
Πίνακας 2.4.....	σελ.26
Πίνακας 2.5.....	σελ.27
Πίνακας 3.1.....	σελ.28
Πίνακας 3.2.....	σελ.28
Πίνακας 3.3.....	σελ.29
Πίνακας 4.....	σελ.30

Ευχαριστίες

Η παρούσα μεταπτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στο Α΄ Εργαστήριο Μικροβιολογίας του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης στα πλαίσια του μεταπτυχιακού προγράμματος σπουδών του τμήματος Δημόσιας Υγείας και Περιβαλλοντικής Υγιεινής και ασφάλειας τροφίμων και υδάτων της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κατά τη χρονική περίοδο Ιανουάριος 2011 – Ιούνιος 2013.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω από καρδιάς τον επιβλέποντα Τιμολέοντα-Αχιλλέα Βυζαντιάδη, αναπληρωτή καθηγητή του Τμήματος Ιατρικής του Α.Π.Θ., για την επιστημονική και προσωπική υποστήριξη και καθοδήγησή του κατά τη διάρκεια της εργασίας μου. Επίσης, θα ήθελα να τον ευχαριστήσω για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε και την ευκαιρία να συνεργαστώ μαζί του. Η ευγνωμοσύνη μου στο πρόσωπό του είναι απεριόριστη, αφενός για τη καθοδήγηση και την ουσιαστική επίβλεψη της εργασίας μου αφετέρου για τη συμπαράσταση που έδειξε και την άψογη συνεργασία.

Επιθυμώ να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στον διευθυντή του Α΄ Εργαστηρίου Μικροβιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Α.Π.Θ., καθηγητή κ. Νικόλαο Μαλισιόβα για τη δυνατότητα που μου προσέφερε να εκπονήσω την μεταπτυχιακή μου εργασία σε ένα ευχάριστο περιβάλλον.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την Δρ. Ευαγγελία Γιαννάκη, υπεύθυνη του Τμήματος Γονιδιακής και Κυτταρικής Θεραπείας, Αιματολόγο του νοσοκομείου Γ. Παπανικολάου, συνεργαζόμενη αναπληρώτρια καθηγήτρια του Πανεπιστημίου της Washington (Seattle), για τη συμβολή της στο πειραματικό κομμάτι της εργασίας μου. Όπως επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω και την αναπληρώτρια καθηγήτρια Αιματολογίας της Ιατρικής Σχολής του Α.Π.Θ. Βακαλοπούλου Σοφία καθώς και τον κύριο Πουρνάρα Σπυρίδων, αναπληρωτή καθηγητή Ιατρικής Μικροβιολογίας-Αφροδισίων Νοσημάτων Ιατρική Σχολή Ε.Κ.Π.Α., μέλη της τριμελούς μου επιτροπής.

Επίσης, αισθάνομαι ευγνώμων απέναντι στις Αναστασία Χατζημιχάλογλου, Μαργαρίτα Νασρ, Αλίκη Ιωακειμίδου, Μαρία Τσιαμίτα, για τη βοήθεια, τη συμπαράσταση και την υποστήριξή τους σε όλα τα επίπεδα καθώς και για τη συμβολή τους στο ευχάριστο περιβάλλον του εργαστηρίου.

Τέλος, ευχαριστώ την οικογένειά μου και τους φίλους μου για την υποστήριξη και τη συμπαράσταση που μου έδωσαν κατά τη χρονική περίοδο αυτή.

Εισαγωγή

Κατά τη διάρκεια των τελευταίων τριών δεκαετιών, η συχνότητα των μυκητιάσεων έχει αυξηθεί δραματικά. Αυτό οφείλεται κυρίως στην αύξηση του αριθμού των ατόμων υψηλού κινδύνου όπως αυτών που βρίσκονται σε ανοσοκαταστολή λόγω μεταμόσχευσης, αυτών που λαμβάνουν αντινεοπλασματικά χημειοθεραπευτικά σχήματα ή ασθενών που πάσχουν από AIDS. (Sabatelli F., 2006)

Οι λοιμώξεις από ευκαιριακά παθογόνους μύκητες συμβαίνουν σε ασθενείς που βρίσκονται σε ανοσοκαταστολή εξαιτίας κάποιας νόσου ή κάποιας θεραπείας και πολλές φορές έχουν δυσμενή εξέλιξη. Οι περισσότεροι ευκαιριακά παθογόνοι μύκητες βρίσκονται στο περιβάλλον, στο έδαφος και στον αέρα. Αν και συχνά, νέα είδη χαρακτηρίζονται ως αιτίες νόσου των ανοσοκατασταλμένων ασθενών, κυρίως τέσσερα είναι τα πιο συχνά αίτια εν τω βάθει λοίμωξης, οι ζυμομύκητες (κυρίως κάντινες), οι ασπέργιλλοι, οι κρυπτόκοκκοι και οι ζυγομύκητες. Παρουσιάζουν υψηλά ποσοστά θνητότητας και η συχνότητα εμφάνισης τους είναι μάλλον υποεκτιμημένη, καθώς σε πολλές περιπτώσεις υποδιαγιγνώσκονται ή δεν καταγράφονται. (Βυζαντιάδης Τ.Α., 2006)

Οι συστηματικές μυκητιάσεις συχνά ξεκινούν από τους πνεύμονες και στη συνέχεια μπορεί να επεκταθούν σε πολλά άλλα όργανα. Τις περισσότερες φορές είναι αποτέλεσμα εισπνοής σπορίων μυκήτων που βρίσκονται ως σαπρόφυτα στο έδαφος και σε οργανική ύλη που αποδομείται ή είναι παθογόνα φυτών. Οι μύκητες που προκαλούν συστηματική λοίμωξη διαχωρίζονται σε αληθώς ή πρωτοπαθώς παθογόνους, όπως το *Histoplasma capsulatum* και το *Coccidioides immitis*, που έχουν την ικανότητα να εισβάλουν και να αναπτύσσονται σε ιστούς υγιών ξενιστών χωρίς γνωστή προδιάθεση και σε ευκαιριακούς, λιγότερο παθογόνους όπως ο *Aspergillus fumigatus*, που εισβάλουν σε ιστούς κυρίως ανοσοκατεσταλμένων ξενιστών. (Βυζαντιάδης Τ.Α. 2006)

Ταυτοχρόνως με την αύξηση της συχνότητας των συστηματικών μυκητιάσεων ενισχύθηκε και το ενδιαφέρον της διεθνούς ιατρικής και γενικότερα της επιστημονικής κοινότητας για την ανάπτυξη νέων εργαστηριακών μεθόδων στη διάγνωση και παρακολούθηση αυτών των λοιμώξεων. (Barnes RA, et al., 1996) Αρκετοί παράγοντες καθορίζουν την έκβαση των λοιμώξεων αυτών, συμπεριλαμβανομένων της ανοσολογικής κατάστασης του ξενιστή και των μεταβλητών που σχετίζονται με το παθογόνο, όπως η ευαισθησία του στα φάρμακα, η θέση της λοίμωξης καθώς και ο χρόνος διάγνωσης σε σχέση με την έναρξη της αντιμυκητιακής κάλυψης.

Αντίστοιχα έχει επεκταθεί πάρα πολύ η χρήση των αντιμυκητιακών με την ταυτόχρονη προσθήκη νεότερων παραγόντων με σημαντική συστηματική δράση. Τέσσερις κύριες κατηγορίες συστηματικών αντιμυκητιακών φαρμάκων είναι διαθέσιμες σήμερα και περιλαμβάνουν τα πολυένια (αμφοτερικίνη, νυστατίνη, πυμαρικίνη) με σημαντικότερο εκπρόσωπο την αμφοτερικίνη Β, τις αζόλες (τριαζόλες όπως οι: φλουконаζόλη, ιτρακοναζόλη, βορικοναζόλη και ποζακοναζόλη) τις εχινοκανδίνες (κασποφουγκίνη, μикаφουγκίνη, ανιντουλαφουγκίνη) και τα πυραμιδινικά ανάλογα με κύριο εκπρόσωπο την φθοριοκυτοσίνη. (British Society for Antimicrobial Chemotherapy Working Party, 1991)

Οι αζόλες και τα πολυένια στοχεύουν στην εργοστερόλη (Sheehan DJ et al., 1999), αναστέλλοντας το ένζυμο της λανοστερόλης, 14^α-διμεθυλάση (CYP51), το οποίο καταλύει ένα σημαντικό βήμα στη βιοσύνθεση της εργοστερόλης, τη βασική στερόλη της κυτταρικής μεμβράνης των μυκήτων. Οι αζόλες αναστέλλουν το ένζυμο της λανοστερόλης, το 14^α-διμεθυλάση (CYP51) διαταράσσοντας τη ρευστότητα της κυτταρικής μεμβράνης του μύκητα, εμποδίζοντας έτσι τη σύνθεση της εργοστερόλης, με αποτέλεσμα τον κυτταρικό θάνατο του μύκητα. (Sheehan D.J. et al, 1999) Τα πολυένια συνδέονται με την εργοστερόλη στην επιφάνεια των μυκήτων με αποτέλεσμα τη διάνοιξη πόρων στην κυτταρική τους μεμβράνη. Ο θάνατος των μυκήτων προκαλείται από τη διαταραχή στη δομή και στη λειτουργία της κυτταρικής μεμβράνης (Dixon D.M. Et al, 1996) Τέλος, οι εχينوκανδίνες στοχεύουν στο κυτταρικό τοίχωμα του μύκητα, αναστέλλοντας τη σύνθεση της 1,3-β-D γλυκάνης, με αποτέλεσμα την καταστροφή του μυκητιακού κυττάρου. (Bennett JE 2006/ Douglas C.M. 1997)

Από τα πολυένια, η πιο σημαντική είναι η αμφοτερικίνη Β, η οποία δεσμεύεται από την εργοστερόλη στη πρωτοπλασματική μεμβράνη και οδηγεί στο σχηματισμό πόρων και στη διαρροή κυτταρικών συστατικών. Δυστυχώς, η συγγένεια των στερολών δεν είναι επιλεκτική και το φάρμακο συνήθως δεσμεύεται και στην χοληστερόλη εκτός της εργοστερόλης. Γι' αυτό και η αμφοτερικίνη Β θεωρείται νεφροτοξική και μπορεί να προκαλεί ανεπιθύμητες ενέργειες. Χρησιμοποιείται πλέον, κυρίως για συστηματικές μυκητιακές λοιμώξεις. (Prazynska M. & Gospodarek E., 2014)

Από τις τριαζόλες, η φλουконаζόλη παρέχει μια άριστη μακροπρόθεσμη ασφάλεια και απόδοση στη θεραπεία, είτε ως προφυλακτική, είτε ως εμπειρική θεραπεία, ή στη θεραπεία επιφανειακών και εν τω βάθει μυκητιακών λοιμώξεων. Παρακολούθηση των θεραπευτικών επιπέδων δεν απαιτείται λόγω του αποτελεσματικού φαρμακοκινητικού της προφίλ και του ευρέος θεραπευτικού της δείκτη. Ενδείκνυται η παρακολούθηση του φαρμάκου σε περιπτώσεις λοίμωξης σε περισσότερο εν τω βάθει σημεία, όπως το κεντρικό νευρικό σύστημα, σε περιπτώσεις μη αποδοτικής θεραπείας του ασθενή ή σε περιπτώσεις που η απορρόφηση του φαρμάκου δεν είναι η ανάλογη. Τέλος, παρακολούθηση θεραπευτικών επιπέδων μπορεί να απαιτηθεί και σε σοβαρές περιπτώσεις σε παιδιά και βρέφη. (Hope WH et al., 2008)

Η ιτρακοναζόλη, είναι ένα φάρμακο που ανήκει στην κατηγορία των τριαζολών. Συστήνεται σε περιπτώσεις προφύλαξης και θεραπείας οξείας και χρόνιας ασπεργίλλωσης καθώς και στην αλλεργική βρογχοκυψελιδική ασπεργίλλωση. Δραστική εμφανίζεται απέναντι σε ένα ευρύ φάσμα μυκητιάσεων που οφείλονται σε κάντινες, ασπέργιλλους καθώς και σε ενδημικούς μύκητες και δερματόφυτα. Είναι διαθέσιμη σε παρεντερική και πόσιμη μορφή. Από μελέτες και έρευνες που πραγματοποιήθηκαν σε υγιείς εθελοντές, η ιτρακοναζόλη εμφανίζει μια ευρεία φαρμακοκινητική μεταβολή μεταξύ των ασθενών. (Barone, J.A. et al., 1998/ Brammer, K.W. et al., 1990/ De la Vega, L. et al., 1994/ Hardin, T.C., et al., 1988) Έτσι και η μεγάλη διαφορά των επιπέδων του φαρμάκου στο αίμα μεταξύ των ασθενών οφείλεται στη διαφορετική απορρόφηση της πόσιμης μορφής του φαρμάκου από τον κάθε ασθενή. (Cartledge, J.D. et al., 1997/ Jaruratanasirikul, S. & A.Kleepkaew et al., 1997/ Lange, D. et al., 1997/ Stevens, D.A., 1999/ Van de Velde, V.J. et al., 1996/ Van Peer, A., et al., 1989) Παράγοντες όπως το γαστρικό PH και η τροφή κατά τη διάρκεια της λήψης του φαρμάκου επηρεάζουν σε σημαντικό βαθμό την απορρόφηση του φαρμάκου από τον οργανισμό. (Cartledge, J.D. et al., 1997/ Jaruratanasirikul, S. & A.Kleepkaew et al., 1997/ Poirier, J.M., et al., 1996/ Poirier, J.M. & Cheymol, G., 1998) Μέτρηση των θεραπευτικών επιπέδων προτείνεται ειδικά σε περιπτώσεις προφυλακτικής θεραπείας με ιτρακοναζόλη καθώς και κατά τη θεραπεία διηθητικών μυκητιασικών λοιμώξεων.

Η βορικοναζόλη, είναι πολύ αποδοτική και ασφαλής για τη θεραπεία της διεισδυτικής καντιντίασης και συστήνεται ως φάρμακο πρώτης γραμμής αντιμετώπισης των διηθητικών ασπεργίλλωσεων. (Johnson, L.B., & C.A. Kauffman., 2003) Επίσης πολύ σημαντικό ρόλο παίζει στην χρόνια πνευμονική ασπεργίλλωση και ειδικά για ασθενείς στους οποίους έχει αποτύχει η θεραπεία με ιτρακοναζόλη. Είναι διαθέσιμη σε πόσιμη και ενδοφλέβια μορφή. Έρευνες έχουν δείξει υψηλή βιοδιαθεσιμότητα της πόσιμης μορφής του φαρμάκου (Lazarus, H.M. et al 2002/ Purkins L., et al., 2003/ Purkins L., et al., 2002) Αν και οι φαρμακοκινητικές και οι φαρμακοδυναμικές μελέτες της βορικοναζόλης είναι πολύ λιγότερες από αυτές τις ιτρακοναζόλης αποδεικνύουν την ύπαρξη σημαντικών ενδείξεων υπέρ της μέτρησης των επιπέδων του φαρμάκου. (Food and Drug Administration.2001/ Purkins L., et al., 2003/ Purkins L., et al., 2002) Για ασθενείς με υψηλά επίπεδα συγκέντρωσης φαρμάκου, η μείωση της δοσολογίας μετά τη μέτρηση των επιπέδων μπορεί να εμποδίσει την τοξικότητα. (Hope WH et al., 2008)

Η ποζακοναζόλη επίσης είναι μια νέα τριαζόλη και χημικό παράγωγο της ιτρακοναζόλης (μαζί με αυτήν την κετοκοναζόλη).(Keating GM., 2005 Cuenca-Estrella M. et al., 2006) Έχει παρόμοια in vitro δραστηριότητα έναντι πολλών ειδών μυκήτων, όπως και η ιτρακοναζόλη (Xiao L. et al., 2004), αλλά με μικρότερη MIC50 και είναι αποτελεσματικότερη σε πολλές περιπτώσεις όπου ο μύκητας εμφανίζει ανθεκτικότητα στην ιτρακοναζόλη. Χρησιμοποιείται ως προφυλακτική θεραπεία ή ως κύρια θεραπεία σε ανοσοκατασταλμένους ασθενείς με μυκητιασικές λοιμώξεις. Ως εκ τούτου για να υπάρχει ικανοποιητική βιοδιαθεσιμότητα θα πρέπει να προσδιορίζονται οι συγκεντρώσεις του φαρμάκου στο ορό του αίματος των ασθενών. Η παρακολούθηση των θεραπευτικών επιπέδων είναι απαραίτητη και σε παιδιατρικούς ασθενείς λόγω περιορισμένης εμπειρίας σε αυτά.(Keating GM., 2005/ Cuenca-Estrella M. et al., 2006)

Τέλος η φθοριοκυτοσίνη (5-FC) είναι ένα ανάλογο της πυραμιδίνης και είναι ένα από τα πρώτα αντιμυκητιακά φάρμακα που δημιουργήθηκαν. (Bennet, J.E. et al.,1979 /Dismukes, W.E., et al., 1987) Δρα ως αναστολέας στη σύνθεση τόσο του DNA όσο και του RNA, μέσω ενδοκυτταροπλασματικής μετατροπής σε 5-φθοριοουρακίλη. Η τελευταία μετατρέπεται σε δύο ενεργά νουκλεοτίδια: στη 5-τριφωσφορική φθοροουριδίνη, η οποία ενσωματώνεται στο RNA του μύκητα, στη θέση του ουριδικού οξέος και έτσι αλλάζει η ακολουθία των αμινοξέων με αποτέλεσμα την αναστολή της σύνθεσης των πρωτεϊνών, και στη 5-μονοφωσφορική φθοροδεοξουριδίνη, η οποία αναστέλλει τη θυμιδυλική συνθετάση και ως εκ τούτου το σχηματισμό της τριφωσφορικής δεοξυθυμιδίνης, που απαιτείται για τη διαδικασία της σύνθεσης του DNA.(Dixon D.M. Et al, 1996) Παρέχει μία ευρέος φάσματος δραστηριότητα έναντι διαφόρων ειδών *Candida* και του *Cryptococcus neoformans*. Κλινικά η φθοριοκυτοσίνη χρησιμοποιείται συνήθως συνδυαστικά με ένα ακόμη αντιμυκητιακό, όπως με την αμφοτερικίνη-β. (Bennet, J.E. et al.,1979 /Dismukes, W.E., et al., 1987) Η χρήση της σε άλλες καταστάσεις είναι περιορισμένη λόγω της τοξικότητας που προκαλεί αλλά και της αντοχής της ως φάρμακο μονοθεραπείας. Είναι διαθέσιμη σε πόσιμη και ενέσιμη μορφή. Έχει μικρό χρόνο ημίσειας ζωής, 3-6 ώρες, και επίπεδά της στο αίμα υψηλότερα από 100μg/dl προκαλούν τοξικότητα στον ασθενή. (Pasqualotto, A.C. et al., 2007)

Συνοπτικά, η αμφοτερικίνη Β (amphotericin B), συνδέεται άμεσα με την εργοστερόλη και έχει ως αποτέλεσμα την καταστροφή των κυτταρικών μεμβρανών των μυκήτων, την αύξηση της διαπερατότητάς τους και τελικώς τον κυτταρικό τους θάνατο. Προτείνεται σε περιπτώσεις χρόνιας εν τω βάθει μυκητίασης. Η φθοριοκυτοσίνη (5-FC), δρα ως αναστολέας της σύνθεσης τόσο του DNA όσο και του RNA, μέσω ενδοκυτταροπλασματικής μετατροπής της 5-φθοριοκυτοσίνης σε 5-φθοριοουρακίλη.

Σπάνια χρησιμοποιείται ως μονοθεραπεία, συνήθως προτείνεται σε συνδυασμό με την αμφοτερικίνη Β. Η φλουκοναζόλη προτείνεται είτε ως προφυλακτική, είτε ως εμπειρική, είτε στη θεραπεία επιφανειακών και εν τω βάθει μυκητιακών λοιμώξεων. Η ιτρακοναζόλη συστήνεται σε περιπτώσεις προφύλαξης και θεραπείας οξείας και χρόνιας ασπεργίλλωσης, σε αλλεργική βρογχοκυψελιδική ασπεργίλλωση καθώς και σε ένα ευρύ φάσμα μυκητιάσεων που οφείλονται σε κάντιντες, ασπέργιλλους καθώς και σε ενδημικούς μύκητες και δερματόφυτα.

Η βορικοναζόλη προτείνεται ως φάρμακο πρώτης γραμμής αντιμετώπισης των διηθητικών ασπεργίλλώσεων, με πολύ σημαντικό ρόλο στη θεραπεία των διηθητικών ασπεργίλλώσεων του εγκεφάλου. Τέλος η ποζακοναζόλη, χρησιμοποιείται ως προφυλακτική θεραπεία, ως κύρια θεραπεία σε ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς με μυκητιασικές λοιμώξεις και ως εναλλακτική θεραπεία διάσωσης όταν ο ασθενής δεν ανταποκρίνεται σε κάποια άλλη αντι-μυκητιασική αγωγή. Ένα κοινό χαρακτηριστικό των τριαζολών, εκτός της φλουκοναζόλης, είναι η μεταβλητότητα στη βιοδιαθεσιμότητα του φαρμάκου στο αίμα από ασθενή σε ασθενή. Συνιστάται καθορισμός των θεραπευτικών επιπέδων κυρίως αυτών των τριών φαρμακίων, ιτρακοναζόλη, βορικοναζόλη και ποζακοναζόλη, λόγω των φαρμακοκινητικών τους χαρακτηριστικών. Οι τριαζόλες αναστέλλουν το ένζυμο που είναι συνδεδεμένο με το κυτόχρωμα P450, το οποίο συμβάλλει στη βιοσύνθεση της εργοστερόλης, απαραίτητη για τη δομή και τη λειτουργία της κυτταρικής μεμβράνης του μύκητα (*Munayyer H.K., 2004*)

Παρά την ευρεία χρήση των παραπάνω φαρμάκων και τη σημαντική δράση τους, συχνή είναι η έλλειψη καλά καθορισμένων δοσολογικών σχημάτων για συγκεκριμένους μύκητες και λοιμώξεις. Η εξατομίκευση της θεραπείας μέσω της χρήσης των επιπέδων των αντιμυκητιακών φαρμάκων στο αίμα ή σε άλλα βιολογικά υλικά, έχει από πολύ καιρό προταθεί και, τουλάχιστον στις χώρες της Κεντρικής και Βόρειας Ευρώπης, σημαντικά διαδοθεί και ενισχυθεί. (*British Society for Antimicrobial Chemotherapy Working Party, 1991 /Graybill JR. 1994*)

Παρακολούθηση των θεραπευτικών επιπέδων

Η παρακολούθηση των θεραπευτικών επιπέδων των φαρμάκων (TDM-therapeutic drug monitoring) περιλαμβάνει τη μέτρηση και την ερμηνεία των φαρμακευτικών συγκεντρώσεων στα βιολογικά υγρά με την εφαρμογή καλά καθορισμένων φαρμακοκινητικών αρχών, λαμβάνοντας υπόψη τα φαρμακοδυναμικά χαρακτηριστικά του φαρμάκου. Στόχος είναι να βελτιστοποιηθεί η θεραπευτική αγωγή, εξατομικευμένα για τον κάθε συγκεκριμένο ασθενή. (*Evans W.E. 1992*) Απαραίτητο είναι να μπορούν να διακριθούν και να μελετηθούν τόσο η μητρική ουσία όσο και οι πιθανοί μεταβολίτες της. Οι μεταβολίτες αυτοί μπορεί να έχουν σημαντική συμμετοχή στην αποτελεσματικότητα ή την τοξικότητα του φαρμάκου συνολικά. (*Galpin AJ. & Evans W.E., 1993*)

Για να έχει η παρακολούθηση των θεραπευτικών επιπέδων κλινική αξία πρέπει να τηρούνται τα κριτήρια του παρακάτω πίνακα:

-
- Να υπάρχει αξιολογημένη και ανταποδοτική του κόστους μέθοδος, ικανή να παράγει έγκαιρα αποτελέσματα και να προσδιορίζει επίσης τους ενεργούς μεταβολίτες
 - Να υπάρχει ξεκάθαρη σχέση μεταξύ συγκεντρώσεων και αποτελέσματος (θεραπευτική αποτελεσματικότητα ή τοξική δράση)
 - Να υπάρχει μεταβαλλόμενη σχέση μεταξύ χορηγούμενης δόσης και συγκεντρώσεων στο βιολογικό υγρό (περιλαμβάνονται και οι φαρμακευτικές αλληλεπιδράσεις)
 - Η έκβαση να μην μπορεί να εκτιμηθεί έγκαιρα με κλινικό τρόπο
 - Να χρειάζεται εκτίμηση της πιθανής έλλειψης κλινικής αποτελεσματικότητας ενός φαρμάκου
-

Πίνακας 1.1 (*Summers KK, et al., 1997*)

Σε ορισμένες χώρες, όπως η Μεγάλη Βρετανία, η μέτρηση των επιπέδων ουσιών όπως η ιτρακοναζόλη, σε εβδομαδιαία βάση, τείνει να γίνει καθιερωμένη πρακτική, είτε σε εξειδικευμένα κέντρα είτε με παραπομπή σε εργαστήρια αναφοράς. Αν και για την αμφοτερικίνη Β φαίνεται πως η μέτρηση των επιπέδων της δεν είναι απολύτως απαραίτητη, η μέτρηση των επιπέδων της ιτρακοναζόλης συστήνεται σε ασθενείς με υποψία χαμηλής απορρόφησης, σε ασθενείς που αναμένονται πιθανές αλληλεπιδράσεις με άλλα φάρμακα καθώς και σε περιπτώσεις θεραπευτικής αποτυχίας ή υποτροπής της λοίμωξης. (*Hope WH et al., 2008*) Τα επίπεδα φθοριοκυτοσίνης επίσης είναι πολύ χρήσιμο να προσδιορίζονται για την πρόληψη της τοξικής δράσης, ιδίως σε μειωμένη νεφρική λειτουργία.

Για την κετοκοναζόλη ο προσδιορισμός των επιπέδων χρειάζεται όπου υπάρχει θεραπευτική αποτυχία ή υποτροπή. Η απορρόφηση της φλουκοναζόλης είναι πιο προβλέψιμη, αυξημένες συγκεντρώσεις της δεν έχουν σχετισθεί με τοξικές παρενέργειες και έτσι δεν έχει κριθεί αναγκαίος ο προσδιορισμός των επιπέδων της. (*Summers KK, et al., 1997/ Br.Society, 1991*) Το φάρμακο εμφανίζει γραμμική φαρμακοκινητική μεταξύ 50-800mg/dl. Έχει μεγάλη βιοδιαθεσιμότητα, εμφανίζει χαμηλά επίπεδα σύζευξης με τις πρωτεΐνες και υφίσταται εκτεταμένη διάχυση στους ιστούς. Είναι αποτελεσματική ακόμη και σε υψηλότερες δόσεις. Η δοσολογία για θεραπεία σε μία διάσπαρτη καντιντίαση είναι 400-800 mg ημερησίως. Σε υψηλότερες συγκεντρώσεις προκαλούνται ανεπιθύμητες παρενέργειες. (*Mc Lachlan AJ, & Tett SE., 1996/ Anaise EJ, et al., 1995/ Louie A, et al., 1998*)

Για τις νεότερες τριαζόλες όπως η βορικοναζόλη και η ποζακοναζόλη υπάρχουν ενδείξεις ότι η μέτρηση των επιπέδων είναι πολύ χρήσιμη λόγω της ποικίλης βιοδιαθεσιμότητας που παρουσιάζουν και προς την αποφυγή επιπλοκών.

Γενικά υπάρχουν διάφορες μέθοδοι που έχουν χρησιμοποιηθεί και αξιολογηθεί για την μέτρηση των συγκεντρώσεων των αντιμυκητιακών φαρμάκων. Διαχωρίζονται σε μικροβιολογικές (bioassays) και μη μικροβιολογικές ή αναλυτικές. Οι πρώτες είναι απλούστερες και φθηνότερες, αλλά οι αναλυτικές προσφέρουν μεγαλύτερη ευαισθησία

και επαναληψιμότητα και επιπλέον επιτρέπουν τον προσδιορισμό των επιμέρους μεταβολιτών. (Warnock DW, et al., 1988/ Hostetler JS, et al., 1993)

Από τις μη μικροβιολογικές μεθόδους, διάφορες έχουν χρησιμοποιηθεί όπως η αέριος-υγρή χρωματογραφία, φθορισμομετρικές, ενζυμικές και ανοσοενζυμικές τεχνικές, η υγρή χρωματογραφία υψηλής ευκρίνειας και τέλος, πιο πρόσφατα, υγρή χρωματογραφία σε συνδυασμό με φασματομετρία μάζας η οποία προσφέρει πολύ μεγάλη ευαισθησία, αλλά με μεγάλο κόστος.

Η μέθοδος που έχει επικρατήσει μεταξύ των αναλυτικών, λόγω της σχετικά εύκολης εφαρμογής της, αλλά κυρίως λόγω της μεγάλης ευαισθησίας, ακρίβειας και επαναληψιμότητά της είναι η υγρή χρωματογραφία υψηλής ευκρίνειας (HPLC-high performance liquid chromatography). (Βοζαντιάδης T.A., 2009) Όπως είναι γνωστό, η υγρή χρωματογραφία είναι μέθοδος για το διαχωρισμό σύνθετων μιγμάτων και βασίζεται στις διαφορετικές αλληλεπιδράσεις των μορίων κάθε συστατικού του μίγματος με την κινητή (mobile) και στατική (stationary) φάση του συστήματος. Η κινητή φάση συνήθως είναι απλό μίγμα μεθανόλης ή ακετονιτριλίου με νερό, ενώ η στατική φάση είναι ένας C8 ή C18 υδρογονάνθρακας συνδεδεμένος με μικρομοριακό πυρίτιο (silica). Τα συστατικά του δείγματος μεταφέρονται με την υγρή κινητή φάση στον ανιχνευτή και ανάλογα με το χρόνο κατακράτησης που είναι χαρακτηριστικός για κάθε συστατικό, γίνεται η καταγραφή του χωριστά. Ο ποσοτικός υπολογισμός γίνεται με την προσθήκη εσωτερικού προτύπου γνωστής συγκέντρωσης. Η προεργασία του δείγματος είναι απαραίτητη για την καθαρότητα του και την αποφυγή παρεμβολών. Η υγρή χρωματογραφία πλεονεκτεί, έναντι των χημικών, ανοσολογικών και βιολογικών μεθόδων επειδή έχει μεγάλη ειδικότητα και με λίγες τροποποιήσεις μπορεί να ελέγχει ποικιλία φαρμάκων. Με αυτή είναι δυνατός ο διαχωρισμός συγγενικών ουσιών και των μεταβολικών τους προϊόντων με διαφορετικές φαρμακολογικές, τοξικολογικές ή αντιμικροβιακές ιδιότητες,

Στις περισσότερες των περιπτώσεων τόσο οι μικροβιολογικές όσο και οι αναλυτικές μέθοδοι παρέχουν παρόμοια αποτελέσματα. Εξαίρεση αποτελεί η περίπτωση παραγωγής ενεργών μεταβολιτών με αντιμυκητιακή δράση κατά το μεταβολισμό του φαρμάκου. Τέτοιο παράδειγμα είναι η ιτρακοναζόλη. Στην περίπτωση αυτή παράγεται η υδροξυ-ιτρακοναζόλη και τα αποτελέσματα της μικροβιολογικής μεθόδου για τον προσδιορισμό των επιπέδων της ιτρακοναζόλης είναι δύο με τρεις φορές υψηλότερα από αυτά της HPLC. (Dodds L, et al., 2006/ Drussano GL., 2004)

Από ότι φαίνεται απρόβλεπτη φαρμακοκινητική μεταβλητότητα αναφέρεται και παρατηρείται κυρίως για τέσσερις συστηματικά χορηγούμενες αντιμυκητιακές ουσίες, τη φθοριοκυτοσίνη και τις τρεις τριαζόλες ιτρακοναζόλη, βορικοναζόλη και ποζακοναζόλη. Κυρίως για τις ουσίες αυτές υπάρχουν στη βιβλιογραφία συστάσεις για την παρακολούθηση των θεραπευτικών επιπέδων τους σε τακτική βάση, τουλάχιστο στο αίμα.

Η ποζακοναζόλη

Η ποζακοναζόλη είναι ένα από τα νεότερα σημαντικά αντιμυκητιακά φάρμακα. (Herbecht R. 2004) Το εμπορικό της όνομα είναι Noxafil και μέχρι πρόσφατα

ήταν διαθέσιμη μόνο στη μορφή του πόσιμου εναιωρήματος (oral suspension). Πλέον, είναι διαθέσιμη και σε μορφή δισκίου με βελτιωμένη βιοδιαθεσιμότητα, η οποία έχει τη δυνατότητα να απορροφηθεί χωρίς να είναι απαραίτητη η τροφή. Έχει σχεδιαστεί ώστε να απελευθερώνει ολόκληρη τη δόση στο λεπτό έντερο, μεγιστοποιώντας τη βέλτιστη απορρόφηση. Τα δισκία επιτυγχάνουν καλύτερες συγκεντρώσεις στον ορό και γενικότερα επιτυγχάνουν υψηλότερη ανταπόκριση στον ασθενή. Βασικό είναι να μην χρησιμοποιούνται εναλλακτικά οι δύο μορφές του φαρμάκου στην ίδια θεραπεία ενός ασθενή. (European Medicine Agency) Νέα στοιχεία που προέρχονται από φαρμακοκινητικές μελέτες σε ασθενείς που έπασχαν από εν τω βάθει μυκητιάσεις και ήταν ανθεκτικοί ή δεν ανταποκρίνονταν στην δεδομένη θεραπεία και στους οποίους χορηγήθηκε ποζαконаζόλη ως θεραπεία διάσωσης, έδειξαν ότι τα αυξημένα επίπεδα ποζαконаζόλης στον ορό του αίματος συσχετίζονται με αυξημένα ποσοστά επιτυχούς απάντησης των ασθενών. (Carsten, M. Et al., 2006)

Η ποζαконаζόλη αναστέλλει το ένζυμο λανοστερόλη 14^α-διμεθυλάση (CYP51), το οποίο καταλύει ένα σημαντικό βήμα στη βιοσύνθεση της εργοστερόλης. Είναι μια τριαζόλη ευρέος φάσματος, χημικό παράγωγο της ιτρακοναζόλης και η κύρια ένδειξή της είναι η θεραπεία διάσωσης στη διεισδυτική ασπεργίλλωση, αλλά και η προφύλαξη σε ασθενείς με ουδετεροπενία και σε ασθενείς μεταμοσχευμένους με αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα. (Hope WH et al., 2008/ Ullmann AJ, et al., 2007/ Cornely OA, et al., 2007) επίσης, έχει ρόλο στη θεραπεία των ζυγομυκητιάσεων, είτε ως αρχική θεραπεία είτε εναλλακτικά στις περιπτώσεις ανθεκτικών ζυγομυκητιάσεων στη θεραπεία με αμφοτερικίνη ή όταν οι ασθενείς δεν μπορούν να λάβουν αμφοτερικίνη. (Hope WH et al., 2008) Έχει παρόμοια in vitro δραστηριότητα με την ιτρακοναζόλη έναντι πολλών μυκήτων, αλλά με χαμηλότερη MIC₅₀ και είναι αποτελεσματική όταν ο μύκητας είναι ανθεκτικός στην ιτρακοναζόλη. (Xiao L. et al., 2004)

Χορηγείται από το στόμα με δόση εφόδου 200 mg x 4/ημέρα για μία εβδομάδα και κατόπι σε δόση συντήρησης 400 mg x 2/ημέρα ή 200 mg x 3/ημέρα. (Ullman AJ, et al., 2006) . Γραμμική φαρμακοκινητική παρουσιάζεται μεταξύ 50-800 mg και κορεσμός της απορρόφησης σε δόσολογίες >800 mg/ημέρα. (Courtney R, et al., 2003) Η πόσιμη χορήγηση ποζαконаζόλης 800mg ημερησίως φαίνεται πως επιτυγχάνει μέγιστη βιοδιαθεσιμότητα και παράγει κλινικά επαρκή επίπεδα φαρμάκου στον ορό τα οποία συσχετίζονται με καλή αντιμυκητιακή δραστηριότητα. Συγκριτικά με την εφάπαξ δόση των 800 mg, όταν η ποζαконаζόλη χορηγείται σε δύο δόσεις η βιοδιαθεσιμότητά της αυξάνεται κατά 98%, ενώ όταν χορηγείται σε τέσσερις ξεχωριστές δόσεις, δηλαδή ανά 6 ώρες, τότε η βιοδιαθεσιμότητά της αυξάνεται κατά 220%. (Keating, G.M, 2006) Παρατηρήθηκε επίσης πως αυξάνοντας τη συγκέντρωση του φαρμάκου πάνω από 800mg ημερησίως δεν σημειώνεται κάποια μεταβολή στην περιοχή κάτω από την καμπύλη χρόνου-συγκέντρωσης . (Ullman AJ, et al., 2006)

Υπάρχουν παράγοντες που συμβάλουν σημαντικά στην απορρόφηση της ποζαконаζόλης από τον ασθενή, όπως η χορήγηση λιπαρού γεύματος, το γαστρικό pH, η κατάσταση του βλεννογόνου του στομάχου, καθώς και η συχνότητα χορήγησης του φαρμάκου. (Krishna, G., et al., 2008) Η ποζαконаζόλη είναι μία εξαιρετικά λιπόφιλη ουσία και ένας αριθμός παραγόντων, συμπεριλαμβανομένων του pH και της συγχορήγησης γεύματος επηρεάζει την εντερική απορρόφηση της. Η βιοδιαθεσιμότητα της βελτιώνεται όταν λαμβάνεται, είτε με λιπαρό γεύμα, είτε με συνοδεία αφεψήματος. (Walravens J., et al., 2011) Η χορήγηση με λιπαρό γεύμα αυξάνει τη συστηματική έκθεση περίπου τέσσερις φορές σε σχέση με τη νηστεία (Courtney R, et al., 2004) Για βέλτιστη απορρόφηση απαιτείται όξινο περιβάλλον. (Dominguez- Gill, H.A., 2006/ Gubbons, P.O., and J.R.Amsden., 2005) Η συγχορήγηση με ομεπραζόλη φαίνεται πως μειώνει τη

συγκέντρωση του φαρμάκου καθώς και την AUC (Area Under the concentration-time Curve- η περιοχή που σχηματίζεται κάτω από τη καμπύλη χρόνου-συγκέντρωσης), ενώ η χορήγηση της ποζακοναζόλης ταυτόχρονα με χαμηλού pH αφεψήματος, όπως για παράδειγμα η κόκα-κόλα, (Walravens J., et al., 2011) βελτιώνει την απορρόφησή της και αυξάνει την ολική συγκέντρωση και την AUC. (Dominguez- Gill, H.A., 2006/ Gubbons, P.O., and J.R.Amsden., 2005) Καταστάσεις που δε βοηθούν στην καλή απορρόφηση της ποζακοναζόλης και οδηγούν σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις στον ορό αποτελούν η προσβολή του εντέρου στη νόσο του μοσχεύματος κατά του ξενιστή ή βλεννογονίτιδα εξαιτίας χημειοθεραπείας οι έμετοι η διάρροια και η ανορεξία. (Krishna G., et al., 2009)

Η ποζακοναζόλη έχει χρόνο ημίσειας ζωής 19 ώρες, τα επίπεδά της σταθεροποιούνται σε περίπου 100 ώρες, αλλά ικανοποιητικά θεραπευτικά επίπεδα δημιουργούνται σε 1-2 ημέρες. Αντίθετα με τις άλλες τριαζόλες, δεν έχει ποσοτικοποιηθεί πλήρως η μεταβλητότητα των επιπέδων της μεταξύ των ασθενών. (Hope WH et al., 2008) Σε πειραματόζωα έχει αποδειχθεί πως υπάρχει σχέση μεταξύ συγκεντρώσεων και αποτελεσματικότητας του φαρμάκου. (Andes D, et al., 2004/Petratiene R, et al., 2001) Στη θεραπεία διάσωσης των διεισδυτικών ασπεργιλλώσεων μεγαλύτερο ποσοστό κλινικής απάντησης παρατηρείται σε ασθενείς με υψηλότερα επίπεδα του φαρμάκου. (Walsh TJ, et al., 2007) Η χρήση της συνδέεται με γαστρεντερικές διαταραχές και επηρεασμό των ηπατικών ενζύμων, αλλά δεν υπάρχει ένδειξη δοσοεξάρτησης των διαταραχών αυτών. (Hope WH et al., 2008) Έχει παρατηρηθεί μεγαλύτερο ποσοστό απάντησης της λοίμωξης σε υψηλότερες συγκεντρώσεις και τιμές μεταξύ 1,25 και 1,50 μg/ml συνδέονται με 75% απάντηση (Walsh TJ, et al., 2007) . Η πιθανότητα για λοιμώξεις από αλλοιούς μύκητες, ενώ λαμβάνει ο ασθενής ποζακοναζόλη, αυξάνει σημαντικά όταν τα επίπεδα του πλάσματος είναι <0,719 μg/ml. (Jang SH, et al., 2010)

Για την παρακολούθηση των επιπέδων της ποζακοναζόλης πρέπει να υπάρχουν μετρήσεις από την 4^η-7^η ημέρα μετά την έναρξη της θεραπείας, ιδίως όταν υπάρχει φτωχή κλινική αποτελεσματικότητα, όταν γίνεται θεραπεία ανθεκτικών μυκήτων, όταν προστίθεται φάρμακο με πιθανές αλληλεπιδράσεις, όταν υπάρχει αλλαγή δοσολογίας, σε ασθενείς με δυσαπορρόφηση και σε αυτούς με αδυναμία λήψης υψηλά λιπαρών τροφών. Επειδή δεν υπάρχει παρά περιορισμένη εμπειρία στα παιδιά, η παρακολούθηση είναι μάλλον ενδεδειγμένη για όλα τα σχετικά παιδιατρικά περιστατικά. Επίσης η συμμόρφωση στη θεραπεία αποτελεί ένδειξη (Hope WH et al., 2008) Επίπεδα ορού >0,5 μg/ml, πριν τη λήψη της επόμενης δόσης μπορούν να θεωρηθούν ικανοποιητικός στόχος για ασθενείς υπό προφυλακτική θεραπεία, ενώ από 0,5 ως 1,5 μg/ml για τη θεραπεία ασθενών με διεισδυτική μυκητίαση από νηματοειδή μύκητα. (Andes D, et al., 2009)

Αν και δεν έχει σαφώς καθορισθεί ο χρόνος και η συχνότητα λήψης δειγμάτων για την παρακολούθηση των θεραπευτικών επιπέδων των τριαζολών, η πιο πρακτική προσέγγιση είναι νωρίς (από την 4^η-7^η ημέρα) μετά την έναρξη να ξεκινήσει η λήψη δειγμάτων αίματος, αμέσως πριν τη χορήγηση της επόμενης δόσης (trough levels). Οι συγκεντρώσεις των δειγμάτων αυτών δεν παρέχουν απόλυτα επαρκείς πληροφορίες για την απορρόφηση του φαρμάκου ή για την περιοχή κάτω από την καμπύλη συγκέντρωσης-χρόνου (AUC-area under the curve), αλλά βοηθούν στην αναγνώριση των ασθενών με συνολικά χαμηλή έκθεση στο φάρμακο ή υπερβολικά γρήγορη κάθαρση του φαρμάκου (Hope WH et al., 2008/ Andes D, et al., 2009) Για φάρμακα μάλιστα όπως η ποζακοναζόλη με μακρύ χρόνο ημίσειας ζωής και χορήγηση σε μοιρασμένες ημερήσιες δόσεις η παραπάνω καμπύλη στον ορό είναι σχετικά επίπεδη και έτσι ακόμα και τυχαία δείγματα μπορούν να δώσουν πληροφορίες για τους ασθενείς με υποθεραπευτικές συγκεντρώσεις λόγω χαμηλής απορρόφησης (Russell EL., 2011)

Σκοπός

Σκοπός της εργασίας είναι η δημιουργία και αξιολόγηση μικροβιολογικής μεθόδου προσδιορισμού των επιπέδων της ποζακοναζόλης στον ορό του αίματος.

Πέρα από την ιτρακοναζόλη, για τα υπόλοιπα αντιμυκητιακά φάρμακα που χορηγούνται συστηματικά δεν υπάρχουν μικροβιολογικά ενεργοί μεταβολίτες ή κάποιοι που να έχουν κλινική σημασία και να παρεμβαίνουν στις μετρήσεις (*Andes D, et al., 2009/ Perea S, et al., 2000*). Το ίδιο ισχύει και για την ποζακοναζόλη (*Kim H, et al., 2003*), και με τη δημιουργία μιας αξιόπιστης μικροβιολογικής μεθόδου προσδιορισμού του φαρμάκου είναι δυνατό να υπάρχει ένα φθινό και σχετικά εύκολο εργαστηριακό «εργαλείο», άμεσης εφαρμογής, σε όποιες περιπτώσεις υπάρξει ένδειξη.

Μεθοδολογία

Η μικροβιολογική μέθοδος παράγει αποτελέσματα μέσω της μέτρησης της διαμέτρου της άλω αναστολής της ανάπτυξης ενός ευαίσθητου ζυμομύκητα (*Candida kefyr*) γύρω από τις περιοχές ενοφθαλμισμού συγκεκριμένων διαλυμάτων γνωστών συγκεντρώσεων του φαρμάκου (**εικόνα 1**). Κατόπι, βάσει των συγκεντρώσεων αυτών σχηματίζεται διάγραμμα σχέσεως (καμπύλη αναφοράς) συγκεντρώσεων-διαμέτρων. Οι άγνωστες συγκεντρώσεις του ορού του αίματος υπολογίζονται με τη μέτρηση των διαμέτρων που δημιουργούνται γύρω από το σημείο ενοφθαλμισμού του ορού και την αναγωγή στην καμπύλη αναφοράς. Έτσι, μετρείται η συνολική αντιμυκητιακή δράση των συγκεντρώσεων του φαρμάκου στον ορό που ενοφθαλμίζεται. Η όλη διαδικασία πραγματοποιείται σε μεγάλα ειδικά τετράγωνα τρυβλία διαστάσεων 24x24 cm, απόλυτα ευθυγραμμισμένων, ώστε το θρεπτικό υλικό να έχει παντού το ίδιο βάθος (0,5 cm).



Εικόνα 1. Ενδεικτική εικόνα τρυβλίου για τη μέτρηση της διαμέτρου της άλου αναστολής της ανάπτυξης του ευαίσθητου ζυμομύκητα (*Candida kefyr*) γύρω από τις περιοχές ενοφθαλμισμού γνωστών και άγνωστων συγκεντρώσεων του φαρμάκου.

Υλικά

Για την παρασκευή του υλικού ανάπτυξης του μύκητα και μελέτης το φαρμάκου χρησιμοποιήθηκαν τα υλικά: agar agar της εταιρείας Scharlau (Gato Perez, Mas d'en Cisa, Spain). Yeast Nitrogen Base της εταιρείας Formedium (Hunstanton, England), Glucose (D (+)-Glucose monohydrate for biochemistry and microbiology) της εταιρείας Merck (Darmstadt). Trisodium Citrate της εταιρείας Mollinckrodt (U.S.A.), Sodium Hydroxide NaOH, DMSO (dimethylsulfoxil) της εταιρείας Riedel-de Haen AG (Seelze). Methanol Analytical Reagent της εταιρείας Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze). Sabouraud Dextrose agar με chloramphenicol 0,05 % της εταιρείας Conda (Laboratorios Conda S.A., Torrejon de Ardoz, Madrid, Spain). Φίλτρα αποστείρωσης 250ml (Filter System) με διάμετρο φίλτρου 0,22μm CN (Cellulose Nitrate), Sterilizing, General Purpose Membrane, Non-pyrogenic, Polystyrene της εταιρείας Corning Incorporated (Corning NY, U.S.A). Τρυβλία 24x24cm. Ο μύκητας που χρησιμοποιήθηκε ήταν ένα ευαίσθητο στέλεχος *Candida kefyr*. Η σκόνη της καθαρής ποζαконаζόλης (Posaconazole, SCH 56592) χορηγήθηκε από την εταιρεία Schering- Plough, Ireland ως δωρεά στο Α΄ Εργαστήριο Μικροβιολογίας της Ιατρικής σχολής του Α.Π.Θ. για

ερευνητικούς σκοπούς.

Προετοιμασία θρεπτικού υλικού

Το πρώτο στάδιο είναι η προετοιμασία του θρεπτικού υποστρώματος της μεθόδου. Η αναλογία των υλικών του θρεπτικού υποστρώματος που χρησιμοποιείται για τα ειδικά τετράγωνα τρυβλία διαστάσεων 24x24 cm είναι 1:10 δηλαδή 20ml Yeast Nitrogen Base Glucose Citrate Solution (YNBGC) και 180ml διαλύματος θρεπτικού υλικού agar agar ώστε να έχει τελικό όγκο 200ml. Αναλυτικότερα, για τη δημιουργία 50ml μίγματος YNBGC χρησιμοποιούνται 3,35gr σκόνη Yeast Nitrogen Base (6,7g %), 5gr Glucose (10g %), 2,95g Trisodium (5,9g %) και στο τέλος προστίθενται 2,85ml NaOH 1N (5,7ml%). Το pH του Yeast Nitrogen Base Glucose Citrate πρέπει να είναι 7,0 και έπειτα αποστειρώνεται μέσω φίλτρου με συσκευή αναρρόφησης μέσω αρνητικής πίεσης. Το θρεπτικό υλικό που χρησιμοποιείται, περιέχει 4 gr σκόνης agar agar σε 180ml απιονισμένου νερού και αναδεύεται σε κωνική δοκιμαστική φιάλη έως ότου διαλυθεί. Έπειτα αποστειρώνεται για 15 λεπτά στους 121 °C στο αυτόκαυστο. Το μείγμα τοποθετείται σε ειδικό τετράγωνο τρυβλίο, απόλυτα ευθυγραμμισμένο ώστε το θρεπτικό υλικό να έχει παντού το ίδιο βάθος (0,5 cm). Το τρυβλίο παραμένει σε θερμοκρασία δωματίου έως ότου σταθεροποιηθεί και έπειτα το τοποθετείται στον επωαστικό κλίβανο στους 37°C μέχρι την επόμενη ημέρα για να επιβεβαιωθεί η μη ανάπτυξη επιμολύνσεων.

Προετοιμασία εναιωρήματος

Στο στάδιο αυτό δημιουργείται το εναιώρημα του ζυμομύκητα *Candida kefyr*, το οποίο έχει ανακαλλιεργηθεί σε θρεπτικό υλικό Sabouraud's Dextrose Agar με 0,05% χλωραμφενικόλη, τουλάχιστον 2-3 ημέρες πριν. Σε ένα αποστειρωμένο σωληνάριο με βιδωτό καπάκι σε 18 ml αποστειρωμένο απιονισμένο νερό προστίθενται 2 ml Yeast Nitrogen Base Glucose Citrate, αναλογία δηλαδή 1:10. Με αποστειρωμένο κρίκο λαμβάνεται αρκετή ποσότητα ζυμομύκητα *Candida kefyr* με σκοπό την επίτευξη διαλύματος με οπτική πυκνότητα 1,6-1,7 ($\approx 10^7$ κύτταρα /ml) στα 540 nm. Στη συνέχεια αφαιρείται το τρυβλίο από τον κλίβανο που έχει μείνει όλο το βράδυ (overnight, περίπου 18 ώρες) και το εναιώρημα του ζυμομύκητα ενοφθαλμίζεται στο θρεπτικό υπόστρωμα. Το τρυβλίο ανακινείται αργά προς όλες τις κατευθύνσεις έτσι ώστε το υλικό να καλύψει όλη την επιφάνεια του άγαρ και ότι δεν απορροφηθεί αφαιρείται με αναρρόφηση. Τέλος, το τρυβλίο επωάζεται στον κλίβανο στους 37°C για περίπου 1h και ελέγχεται σταδιακά μέχρι να στεγνώσει πλήρως το υγρό.

Προετοιμασία διαλύματος φαρμάκου (stock solution)

Η συγκέντρωση του φαρμάκου της ποζαконаζόλης που ενδιαφέρει για την μελέτη είναι 1 mg/ml. Σε ένα αποστειρωμένο σωληνάριο αναμειγνύονται 500 μ l DMSO (dimethylsulfoxil) και 500 μ l μεθανόλης. Έπειτα ζυγίζεται ποσότητα 5 mg, δηλαδή 0,0050 g, σκόνης ποζαконаζόλης και προστίθεται στο σωληνάριο. Στη συνέχεια για να επιτευχθεί αραιώση 1:5, σε ένα άλλο αποστειρωμένο σωληνάριο τύπου erpendorf τοποθετούνται 800 μ l μεθανόλης και 200 μ l από το διάλυμα ποζαконаζόλης σε DMSO/ μεθανόλη. Τα διαλύματα μπορούν να διατηρηθούν στους -20°C για περαιτέρω χρήση.

Προετοιμασία διαλύματος εργασίας (work solution)

Η επιθυμητή τελική συγκέντρωση του διαλύματος εργασίας της ποζακοναζόλης είναι 10 µg/ml. Επομένως, για το διάλυμα εργασίας αναμιγνύονται 990µl μεθανόλης και 10 µl διαλύματος ποζακοναζόλης (αραιώση 1:100) και έπειτα γίνεται έντονη ανάδευση (vortex).

Προετοιμασία συγκεντρώσεων καμπύλης βαθμονόμησης (standards)

Οι πρότυπες συγκεντρώσεις (standards) ποζακοναζόλης για τη καμπύλη βαθμονόμησης της μελέτης είναι 0,2, 0,5, 1,0, 4,0, 6,0 και 8,0 µg/ml και προετοιμάζονται με αραιώσεις από το πυκνό διάλυμα εργασίας των 10 µg/ml σε στείρο (αδρανοποίηση στους 56 °C) μίγμα ορών υγείων ατόμων. Ακολουθεί έντονη ανάδευση (vortex), τουλάχιστο για 60 sec.

Προετοιμασία δειγμάτων ποιοτικού ελέγχου (quality control-QC)

Τα δείγματα ποιοτικού ελέγχου της μελέτης έχουν συγκέντρωση 0,5, 1,0 και 4,0 και παρασκευάζονται με αραιώσεις από το πυκνό διάλυμα εργασίας σε μίγμα ορών υγείων ατόμων. Επιπλέον χρησιμοποιήθηκαν και άλλα τρία ως δείγματα ποιοτικού ελέγχου. Ο αρνητικός μάρτυρας που περιείχε μόνο μίγμα ορών υγείων ατόμων, ο θετικός μάρτυρας 1 από δεξαμενή ορών με συγκέντρωση ποζακοναζόλης 1µg/ml και ο θετικός μάρτυρας 2 με συγκέντρωση ποζακοναζόλης 1µg/ml σε ορό ενός υγιούς ατόμου. Γίνεται έντονη ανάδευση (vortex) τουλάχιστο για 60 sec.

Προετοιμασία δειγμάτων ασθενών

Δείγματα ολικού αίματος (2,5ml) συλλέχθηκαν σε σωληνάρια χωρίς αντιπηκτικό από αιματολογικούς ασθενείς, της Αιματολογικής Κλινικής του Γενικού Νοσοκομείου Θεσσαλονίκης «Γ. Παπανικολάου», οι οποίοι ελάμβαναν ποζακοναζόλη πόσιμης μορφής προφυλακτικά και βρίσκονταν στην 5^η-7^η ημέρα από την έναρξη της θεραπείας. Οι αιμοληψίες έγιναν σε δύο διαφορετικές χρονικές στιγμές της ίδιας ημέρας. Η πρώτη στη 0h (αμέσως πριν την πρωινή λήψη του φαρμάκου, trough levels) και η δεύτερη στις 2h μετά τη λήψη. Προσδιορίστηκαν τα επίπεδα από τρεις ασθενείς (Ασθενής Α, Β, Γ). Επίσης, χρησιμοποιήθηκε και ένα ακόμη δείγμα ασθενούς, υπό προφυλακτική θεραπεία, της χρονικής στιγμής προ της λήψης του φαρμάκου (Ασθενής Δ). Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν σε σχετική φυγοκεντρική δύναμη 1500g για 10 λεπτά ώστε να διαχωριστεί ο ορός. Ο ορός του αίματος αποθηκεύθηκε στους -20°C μέχρι τη μέτρηση.

Εκτέλεση διαδικασίας

Χωρίζεται το τρυβλίο (24x24 cm) στην πλαστική του επιφάνεια με διαγραμμίσεις (κάθετες και οριζόντιες) σε 30 νοητά παραλληλόγραμμα (5 γραμμές-6 στήλες). Με ειδικό εργαλείο βιονίας δέρματος διαμέτρου κοπής 3mm δημιουργούνται οπές στο κέντρο κάθε νοητού παραλληλόγραμμου. Σε κάθε οπή ενοφθαλμίζονται 25µl των δειγμάτων της καμπύλης βαθμονόμησης, του ποιοτικού ελέγχου καθώς και των

δειγμάτων αγνώστων συγκεντρώσεων των ασθενών. Όλα τα πρότυπα διαλύματα, τα δείγματα ποιοτικού ελέγχου και τα δείγματα των ασθενών ενοφθαλμίζονται διπλά ή τριπλά, τυχαία κατανεμημένα στο τρυβλίο ώστε να αποφευχθεί η πιθανή επιρροή από την ετοιμασία του υλικού. Τέλος, το τρυβλίο επωάζεται στους 37°C, αεροβίως και η ανάγνωση γίνεται μετά από περίπου 18 ώρες (overnight incubation).

Υπολογισμός διαμέτρων και τιμών

Η μέτρηση γίνεται με διαστημόμετρο και χάρακα, τα οποία βοηθούν να μετρηθούν με ακρίβεια οι διάμετροι των ζωνών αναστολής της καμπύλης βαθμονόμησης, των δειγμάτων ποιοτικού ελέγχου, καθώς και των δειγμάτων των ασθενών. Υπολογίζεται ο μέσος όρος των διαμέτρων για κάθε συγκέντρωση, γνωστή ή άγνωστη. Βάσει των συγκεντρώσεων των δειγμάτων της καμπύλης βαθμονόμησης λύνεται ειδικά σχεδιασμένη συνάρτηση στο πρόγραμμα Microsoft Excel και αντίστοιχα υπολογίζεται η συγκέντρωση των δειγμάτων ποιοτικού ελέγχου και των δειγμάτων των ασθενών.

Παράμετροι αξιολόγησης της μεθόδου

Για τον ποιοτικό έλεγχο της μεθόδου οι μετρήσεις επαναλήφθηκαν 8 φορές σε διάστημα 5-6 μηνών. Οι προσδιορισμοί επαναλήφθηκαν 2-3 φορές μέσα στην ίδια μέτρηση,

Στο πείραμα μελετήθηκαν οι παρακάτω παράμετροι:

α) Γραμμικότητα της μεθόδου

Η γραμμικότητα της μεθόδου υπολογίστηκε από τον μέσο όρο των διαμέτρων των συγκεντρώσεων της καμπύλης βαθμονόμησης από τις διάφορες διαδοχικές μετρήσεις. Οι μέσοι όροι σχηματίζουν μια μέση γραμμική εξίσωση (μετά από λογαριθμική μετατροπή του άξονα y).

β) Σταθερότητα της ουσίας

Αξιολογήθηκε η σταθερότητα της ουσίας της ποζακοναζόλης στα δείγματα ποιοτικού ελέγχου και στα δείγματα των ασθενών, με 4-5 συνεχείς κύκλους πήξης-τήξης (πάγωμα-ξεπάγωμα) και ενδιάμεση διατήρηση για μακρά χρονικά διαστήματα στους -20°C (συνολικά 5-6 μήνες).

γ) Ευαισθησία της μεθόδου

Η ευαισθησία της μεθόδου καθορίστηκε ως η μικρότερη τιμή ποζακοναζόλης που ήταν δυνατό να ανιχνευθεί.

δ) Επαναληψιμότητα της μεθόδου

Η επαναληψιμότητα καθορίστηκε από τον υπολογισμό της μεταβλητότητας των διπλών ή πολλαπλών δειγμάτων μέσα στην ίδια μέτρηση (intra assay) ή μεταξύ διαδοχικών μετρήσεων, διαφορετικών ημερών (inter assay), στο διάστημα της μελέτης.

ε) Ακρίβεια της μεθόδου

Η ακρίβεια της μεθόδου υπολογίστηκε από τη διαφορά από την αναμενόμενη τιμή στόχου των διπλών ή πολλαπλών δειγμάτων μέσα στην ίδια μέτρηση (intra assay), ή από μέτρηση σε μέτρηση σε διαφορετικές ημέρες (inter assay) στο διάστημα της μελέτης.

ζ) Ανάκτηση της ουσίας

Η ανάκτηση της ποζακοναζόλης αξιολογήθηκε από τη μέτρηση παρασκευασμένων δειγμάτων γνωστής συγκέντρωσης, όπου υπολογίστηκε η τιμή του κάθε δείγματος σε σχέση με την αναμενόμενη γνωστή τιμή σε ποσοστιαία έκφραση

Αποτελέσματα

α) Η γραμμικότητα της μεθόδου υπολογίστηκε από τη μέση τιμή των συντελεστών γραμμικής συσχέτισης r^2 (μετά από λογαριθμική μετατροπή του άξονα y) της κάθε ημέρας. Η μέθοδος ήταν σχεδόν απόλυτα γραμμική, $\text{mean } r^2=0,996$ για τις συγκεκριμένες πρότυπες συγκεντρώσεις. Εικόνα 2.

β) Η σταθερότητα της ποζαконаζόλης στη μέθοδο υπολογίστηκε μετά από διαδοχικούς κύκλους «παγώματος-ξεπαγώματος» (κατάψυξης-απόψυξης, 4-5 φορές σε διάστημα 5-6 μηνών) των δειγμάτων ασθενών με άγνωστη συγκέντρωση πριν και 2 ώρες μετά από τη λήψη του φαρμάκου. Υπολογίστηκε το %CV με εύρος 7,8 έως 18,5% και η μέση μεταβλητότητα 11,8%. Πίνακας 1.2.

γ) Η ευαισθησία της μεθόδου καθορίστηκε από τη μικρότερη τιμή της συγκέντρωσης της ποζαконаζόλης που ανιχνεύτηκε κατά τη διαδικασία της μέτρησης της μεθόδου. Η τιμή αυτή είναι η 0,2 $\mu\text{g/ml}$.

δ) Η επαναληψιμότητά (precision) της μεθόδου καθορίστηκε από τον υπολογισμό της μεταβλητότητας των διπλών ή πολλαπλών δειγμάτων στην ίδια μέτρηση (intra assay) ή διαδοχικών μετρήσεων διαφορετικών ημερών (inter assay) στο διάστημα της μελέτης, για τα σημεία της πρότυπης καμπύλης, για τα δείγματα ποιοτικού ελέγχου, καθώς και για τα δείγματα άγνωστης συγκέντρωσης των ασθενών. Η επαναληψιμότητα μεταξύ διαδοχικών μετρήσεων (inter run %CV) κυμάνθηκε από 9,4 ως 11,1% για την πρότυπη καμπύλη, 2,6 ως 12,1% για τα δείγματα ποιοτικού ελέγχου, 12,4 ως 13,6% για τους θετικούς μάρτυρες, 26,5% για τον αρνητικό μάρτυρα και 2,6 ως 10,9% για τα δείγματα ασθενών, ενώ μέσα στις ίδιες μετρήσεις (mean intra run %CV) 8,4 ως 12,4%, 2,6 ως 11,4%, 12 ως 13,25%, 26,5% και 2,1 ως 11,2% αντίστοιχα. Πίνακες 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5.

ε) Η ακρίβεια (accuracy) της μεθόδου υπολογίστηκε από τη διαφορά από την αναμενόμενη τιμή στόχου (σε ποσοστιαία έκφραση) των διπλών ή πολλαπλών δειγμάτων μέσα στην ίδια μέτρηση για τα δείγματα ποιοτικού ελέγχου ή από μέτρηση σε μέτρηση σε διαφορετικές ημέρες (inter assay), στο διάστημα της μελέτης. Για το δείγμα ελέγχου 0,5 υπολογίστηκε ως inter diff% 9,2 ενώ intra -20 ως 0%, για το 4,0 υπολογίστηκε inter diff% 8,2 ενώ intra 12,5 ως 2,5% και τέλος για το δείγμα ελέγχου 1,0 υπολογίστηκε inter diff% 17,04 ενώ intra -20 ως 10%. Άρα, η ακρίβεια μεταξύ των διαδοχικών μετρήσεων (inter run %DIFF) για όλα τα δείγματα ελέγχου συνολικά είναι: inter run %DIFF -22,5 ως 10%. Πίνακες 3.1, 3.2, 3.3

ζ) Η ανάκτηση της ουσίας στη μέθοδο καθορίστηκε από τη μέτρηση των παρασκευασμένων δειγμάτων γνωστής συγκέντρωσης (δείγματα ποιοτικού ελέγχου) σε σχέση με την αναμενόμενη γνωστή τιμή σε ποσοστιαία έκφραση. Η ανάκτηση της ουσίας ήταν $92,50 \pm 10,35\%$ (mean \pm SD). Πίνακας 4.

Πίνακας 1. 2
Σταθερότητα της ποζακοναζόλης στη μέθοδο

Δείγματα ασθενών άγνωστης συγκέντρωσης σε µg/ml							
	Ασθενής Α 0h	Ασθενής Α 2h	Ασθενής Β 0h	Ασθενής Β 2h	Ασθενής Γ 0h	Ασθενής Γ 2h	Ασθενής Δ 0h
Ημέρα 1	-	-	-	-	0,8	0,9	-
Ημέρα 2	0,9	1,3	0,8	-	-	-	0,7
Ημέρα 3	1,1	1,3	1	1,2	0,6	1	1
	1,1	1,1	-	1,3	0,7	1	-
Ημέρα 4	1	-	1,4	-	0,8	-	-
Ημέρα 5	1	1,2	1,4	1,4	0,8	1,2	-
Ημέρα 6	-	-	1,2	1,2	-	-	-
Ημέρα 7	-	-	1,2	1,2	-	-	-
Ημέρα 8	-	-	1,3	1,6	-	-	-
mean	1,02	1,23	11,9	1,32	0,74	1,05	0,85
SD(τυπική απόκλιση)	0,08	0,1	0,22	0,16	0,09	0,13	0,21
inter CV%	8,2	7,8	18,5	12,2	12,1	12,3	25

Πίνακας 2.1.

Επαναληψιμότητα (precision) για τα σημεία της πρότυπης καμπύλης (σε mm) .

Διάμετροι σε mm (σημεία πρότυπης καμπύλης)						
	0,2	0,5	1	4	6	8
Ημέρα 1	9	11	13	17	19,5	-
	9	11,5	13,5	18	18,5	-
	-	-	13,5	-	-	-
Ημέρα 2	9	11,5	12,5	16	-	-
	10	11,5	12	16,5	-	-
	-	-	13	-	-	-
Ημέρα 3	8	12	13	15	15	-
	8,5	11	13	15	15,5	-
	8	11	11,5	15	17	-
	-	-	-	-	-	-
Ημέρα 4	9	7	11	14	16	-
Ημέρα 5	9,5	8	11,5	15	13	-
	8	7	10,5	14	13	-
Ημέρα 6	9	12	13,5	16,5	16	19
	9	12	13	17	16,5	19
Ημέρα 7	10	12,5	13,5	-	18	-
	9	13	14	19	18	22
	10	12	14	19	18	22
	10	13	14	19	19,5	-
Ημέρα 8	10	9	11	15	14,5	17
	11	9	11,5	14	13	17,5
	11	10	11	15	14	-
mean	9,3	11,4	12,5	16,1	16,9	19,4
SD (τυπική απόκλιση)	0,9	1,2	1,2	1,7	1,8	2,2
inter CV%	9,7	10,6	9,4	10,8	10,6	11,1
mean	8,4	10	9	10,4	10,6	12,4
SD (τυπική απόκλιση)	0,78	1,14	1,13	1,69	1,78	10,6
μέση intra CV%	9,31	11,38	12,57	16,31	16,74	19,42

Πίνακας 2.2.

Επαναληψιμότητα (precision) για τα δείγματα ποιοτικού ελέγχου (σε mm)

Διάμετροι σε mm (δείγματα ποιοτικού ελέγχου)						
	0,5	1	4	Θετικός μάρτυρας 1	Θετικός μάρτυρας 2	Αρνητικός μάρτυρας
Ημέρα 1	11	13,5	17	13,5	-	7
	11,5	14	18	14	-	-
Ημέρα 2	10	-	16	12	-	0
	11	-	16	13	-	0
	11	-	16,5	-	-	-
Ημέρα 3	11	-	15	11	-	0
	10,5	-	14,5	12	-	-
	10,5	-	16	-	-	-
	10	-	15	-	-	-
	10,5	-	15	-	-	-
Ημέρα 4	10,5	-	14	11	-	0
	7,5	-	14	9,5	-	-
Ημέρα 5	9	-	13,5	-	12	-
	9,5	-	14	-	11	-
Ημέρα 6	12	-	16,5	-	14	0
	11,5	-	16,5	-	13,5	-
	11	-	16,5	-	-	-
Ημέρα 7	12	-	19	-	16	0
	12,5	-	19	-	15,5	-
	13	-	19	-	-	-
Ημέρα 8	9	-	14	-	12	0
	9	-	14	-	12	-
	9,5	-	-	-	-	-
mean	10,59	13,75	15,83	12	13,25	1
SD(τυπική απόκλιση)	1,28	0,35	1,72	1,49	1,81	2,65
inter CV%	12,1	2,6	10,8	12,4	13,6	26,5
mean	11,4	2,6	11,1	12	13,25	1
SD(τυπική απόκλιση)	1,19	0,35	1,74	1,49	1,93	2,65
μέση intra CV%	10,49	13,75	15,71	14,6	12,41	26,5

Πίνακας 2.3.Επαναληψιμότητα (precision) για τα δείγματα ποιοτικού ελέγχου (σε $\mu\text{g/ml}$)

Συγκεντρώσεις δειγμάτων ποιοτικού ελέγχου ($\mu\text{g/ml}$)						
	0,5	1	4	Θετικός μάρτυρας 1	Θετικός μάρτυρας 2	Αρνητικός μάρτυρας
Ημέρα 1	0,45	1,1	3,6	0,8	-	0,1
Ημέρα 2	0,4	-	4	0,7	-	0
Ημέρα 3	0,45	-	3,1	-	-	0
	0,4	-	3,5	0,9	-	0
Ημέρα 4	0,35	-	4	0,8	1,4	-
Ημέρα 5	0,4	-	3,1	-	1,4	0
Ημέρα 7	0,5	-	3,1	-	1,2	0
Ημέρα 8	0,4	-	3,6	-	1,3	0
mean	0,4	1,1	3,71	0,88	1,33	0,01
SD(τυπική απόκλιση)	0,04	0	0,31	0,15	0,1	0,04
inter CV%	9,2	0	8,2	17,04	7,51	4

Πίνακας 2.4.

Επαναληψιμότητα (precision) για τα δείγματα ασθενών άγνωστης συγκέντρωσης (σε mm)

Διάμετροι σε mm (δείγματα ασθενών άγνωστης συγκέντρωσης)							
	Ασθενής Α 0h	Ασθενής Α 2h	Ασθενής Β 0h	Ασθενής Β 2h	Ασθενής Γ 0h	Ασθενής Γ 2h	Ασθενής Δ 0h
Ημέρα 1	-	-	-	-	13	13	-
	-	-	-	-	13	14	-
	-	-	-	-	13	13	-
Ημέρα 2	12,5	13	12	11,5	-	-	12
	13	14	13	13	-	-	12
Ημέρα 3	12,5	12,5	12	12,5	11	12,5	12
	12	13	12,5	12,5	11,5	12	12,5
	13	13	11,5	13	10	12	-
	12,5	12,5	-	12,5	11,5	12,5	-
		12,5	-	13	11,5	12,5	-
Ημέρα 4	10,5	12	11	12	10	12	11,5
	11	12	12	12,5	10	12	12
Ημέρα 5	10	11	11	11,5	10	11	-
	11	11	12	11,5	10	12	-
	11	11,5	-	11,5	10	10,5	-
Ημέρα 6	-	-	13,5	13,5	-	-	-
	-	-	14	14	-	-	-
Ημέρα 7	-	-	15	15	-	-	-
	-	-	15,5	15,5	-	-	-
Ημέρα 8	-	-	12	12,5	-	-	-
	-	-	12	12,5	-	-	-
mean	11,73	12,33	12,60	12,78	11,15	12,23	12
SD (τυπική απόκλιση)	1,06	0,89	1,35	1,14	1,21	0,88	0,32
inter CV%	9,0	7,2	10,7	8,9	10,9	7,2	2,6
mean	8,7	7,1	10,6	8,9	11,2	6,4	2,1
SD(τυπική απόκλιση)	1,03	0,88	1,33	1,15	1,24	0,79	0,25
mean intra CV %	11,83	12,4	12,53	12,86	11,1	12,23	12

Πίνακας 2.5.

Επαναληψιμότητα (precision) για τα δείγματα ασθενών άγνωστης (σε µg/ml)

Συγκεντρώσεις δειγμάτων ασθενών σε µg/ml							
	Ασθενής Α 0h	Ασθενής Α 2h	Ασθενής Β 0h	Ασθενής Β 2h	Ασθενής Γ 0h	Ασθενής Γ 2h	Ασθενής Δ 0h
Ημέρα 1	-	-	-	-	0,8	0,9	-
Ημέρα 2	0,9	1,3	0,8	-	-	-	0,7
Ημέρα 3	1,1	1,3	1	1,2	0,6	1	1
	1,1	1,1	-	1,3	0,7	1	-
Ημέρα 4	1	-	1,4	-	0,8	-	-
Ημέρα 5	1	1,2	1,4	1,4	0,8	1,2	-
Ημέρα 6	-	-	1,2	1,2	-	-	-
Ημέρα 7	-	-	1,2	1,2	-	-	-
mean	1,02	1,23	11,9	1,32	0,74	1,05	0,85
SD(τυπική απόκλιση)	0,08	0,1	0,22	0,16	0,09	0,13	0,21
inter CV%	8,2	7,8	18,5	12,2	12,1	12,3	25

Πίνακας 3.1.

Η ακρίβεια (accuracy) στα δείγματα ποιοτικού ελέγχου 0,5 και 4,0 και θετικού μάρτυρα 1.

0,5	Μετρούμενη τιμή	Διαφορά από τιμή στόχου	Ακρίβεια-accuracy intra diff%
Ημέρα 1	0,45	-0,5	-10
Ημέρα 2	0,4	-0,1	-20
Ημέρα 3	0,45	-0,5	-10
	0,4	-0,1	-20
Ημέρα 4	0,35	-0,15	-25
Ημέρα 5	0,4	-0,1	-20
Ημέρα 6	0,5	0	0
Ημέρα 7	0,4	-0,1	-20
Ημέρα 8	0,4	-0,1	-20
mean	0,48		-16,11
SD(τυπική απόκλιση)	0,04		7,82
inter diff%	9,2		48

Πίνακας 3.2

4,0	Μετρούμενη τιμή	Διαφορά από τιμή στόχου	Ακρίβεια-accuracy inter diff%
Ημέρα 1	3,6	-0,4	-10
Ημέρα 2	4	0	0
Ημέρα 3	3,1	-0,9	-2,5
	3,5	-0,5	-12,5
Ημέρα 4	4	0	0
Ημέρα 5	3,1	-0,9	-22,5
Ημέρα 6	3,1	-0,9	-22,5
Ημέρα 7	3,6	-0,4	-10
Ημέρα 8	3,1	-0,9	-22,5
mean	3,71	-7,22	-13,75
SD(τυπική απόκλιση)	0,31	7,65	10,09
inter diff%	8,2		73

Πίνακας 3.3

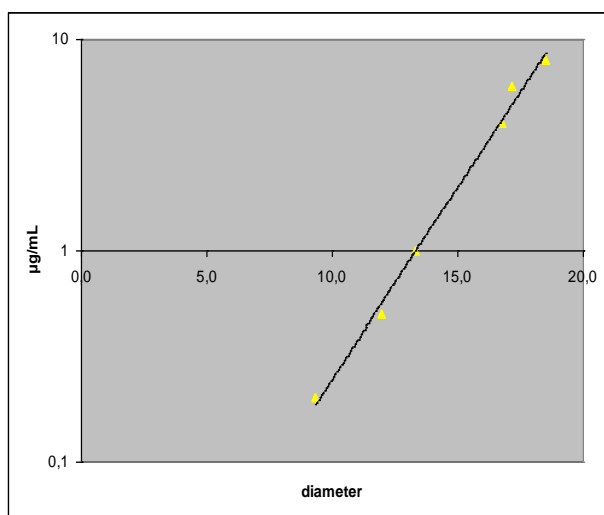
1,0	Μετρούμενη τιμή	Διαφορά από τιμή στόχου	Ακρίβεια- accuracy inter diff%
Ημέρα 1	0,8	-0,2	-20
Ημέρα 2	0,7	-0,3	-30
Ημέρα 3	-	-	-
Ημέρα 4	0,9	-0,1	-10
Ημέρα 5	0,8	-0,2	-20
Ημέρα 6	-	-	-
Ημέρα 7	-	-	-
Ημέρα 8	-	-	-
mean	0,88	-0,13	-20
SD(τυπική απόκλιση)	0,08	0,15	8,16
inter diff%	17,04		40

Πίνακας 4.

Η ανάκτηση της ποζακοναζόλης στη μέθοδο

Δείγματα γνωστής γνωστής συγκέντρωσης ποζακοναζόλης, 1,0 µg/ml				
		Τιμή	Μεταβολή	Ανάκτηση
Θετικός μάρτυρας 1	Ημέρα 1	1,1	+10	100
	Ημέρα 2	0,8	-20	80
	Ημέρα 3	0,8	-20	80
	Ημέρα 4	0,8	-20	80
Θετικός μάρτυρας 2	Ημέρα 1	1,4	+40	100
	Ημέρα 2	1,4	+40	100
	Ημέρα 3	1,2	+20	100
	Ημέρα 4	1,3	+30	100
mean		1	0	92,5
SD(τυπική απόκλιση)		0,23		10,35

Εικόνα 2. Γραμμικότητα της μεθόδου, παράδειγμα καμπύλης βαθμονόμησης



Συζήτηση

Η ποζακοναζόλη είναι ένα από τα νεότερα σημαντικά αντιμυκητιασικά φάρμακα. (Herbecht R.2004). Είναι μια τριαζόλη ευρέος φάσματος, χημικό παράγωγο της ιτρακοναζόλης και η κύρια ένδειξή της είναι η θεραπεία διάσωσης στη διεισδυτική ασπεργίλλωση, αλλά και ως προφύλαξη σε ασθενείς με ουδετεροπενία και ασθενείς μεταμοσχευμένους με αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα (Hope WH et al., 2008/ Ullmann AJ, et al.,2007/ Cornely OA, et al.,2007). Επίσης έχει ρόλο στη θεραπεία των ζυγομυκητιάσεων, είτε ως αρχική θεραπεία είτε εναλλακτικά στις περιπτώσεις ανθεκτικών ζυγομυκητιάσεων στη θεραπεία με αμφοτερικίνη ή όταν οι ασθενείς δεν μπορούν να λάβουν αμφοτερικίνη (Hope WH et al., 2008). Από στοιχεία που προέρχονται από φαρμακοκινητικές μελέτες σε ασθενείς που έπασχαν από εν τω βάθει μυκητιάσεις και ήταν ανθεκτικοί ή δεν ανταποκρίνονταν στην δεδομένη θεραπεία και τελικά χορηγήθηκε η ποζακοναζόλη ως θεραπεία διάσωσης φαίνεται πως αυξημένα επίπεδα ποζακοναζόλης στον ορό του αίματος συσχετίζονται με αυξημένα ποσοστά επιτυχούς απάντησης των ασθενών. (Carsten, M. Et al., 2006)

Σε πειραματόζωα έχει αποδειχθεί πως υπάρχει σχέση μεταξύ συγκεντρώσεων και αποτελεσματικότητας του φαρμάκου (Andes D, et al., 2004/Petratiene R, et al., 2001). Για την παρακολούθηση των επιπέδων της ποζακοναζόλης πρέπει να υπάρχουν μετρήσεις από την 4^η-7^η ημέρα μετά την έναρξη της θεραπείας, ιδίως όταν υπάρχει φτωχή κλινική αποτελεσματικότητα, όταν γίνεται θεραπεία ανθεκτικών μυκήτων, όταν προστίθεται φάρμακο με πιθανές αλληλεπιδράσεις, όταν υπάρχει αλλαγή δοσολογίας, σε ασθενείς με δυσασπορρόφηση και σε αυτούς με αδυναμία λήψης υψηλά λιπαρών τροφών. Επειδή δεν υπάρχει παρά περιορισμένη εμπειρία στα παιδιά, η παρακολούθηση είναι μάλλον ενδεδειγμένη για όλα τα σχετικά παιδιατρικά περιστατικά.(Hope WH et al., 2008). Επίπεδα ορού >0,5 μg/ml, πριν τη λήψη της επόμενης δόσης μπορούν να θεωρηθούν ικανοποιητικός στόχος για ασθενείς υπό προφυλακτική θεραπεία, ενώ από 0,5 ως 1,5 μg/ml για τη θεραπεία ασθενών με διεισδυτική μυκητίαση από νηματοειδή μύκητα (Andes D, et al., 2009).

Υπάρχουν διάφορες μέθοδοι που έχουν χρησιμοποιηθεί και αξιολογηθεί για την μέτρηση των συγκεντρώσεων των αντιμυκητιακών φαρμάκων (Βυζαντιάδης T.A., 2009). Οι μέθοδοι αυτοί διαχωρίζονται σε μικροβιολογικές (bioassays) και μη μικροβιολογικές ή αναλυτικές.(Warnock DW, et al., 1988/ Hostetler JS, et al.,1993). Η μέθοδος που έχει επικρατήσει μεταξύ των αναλυτικών, λόγω της σχετικά εύκολης εφαρμογής της, αλλά κυρίως λόγω της μεγάλης ευαισθησίας, ακρίβειας και επαναληψιμότητά της είναι η υγρή χρωματογραφία υψηλής ευκρίνειας (HPLC-high performance liquid chromatography).(Βυζαντιάδης T.A., 2009)

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η δημιουργία και η αξιολόγηση μιας μικροβιολογικής μεθόδου για τον προσδιορισμό των επιπέδων της ποζακοναζόλης στον ορό του αίματος των ασθενών.

Πλεονέκτημα της μικροβιολογικής μεθόδου έναντι των αναλυτικών μεθόδων είναι το χαμηλό κόστος εκτέλεσης. Επίσης, παρόλο που η μικροβιολογική μέθοδος είναι αρκετά κοπιώδης και χρονοβόρος, με την εξοικείωση αμβλύνονται οι δυσκολίες. Η προτεινόμενη μέθοδος της παρούσας μελέτης είχε αρκετές τεχνικές δυσκολίες, απέδωσε όμως σωστά και ικανοποιητικά τα αποτελέσματα των μετρήσεων.

Η ακρίβεια μεταξύ των διαδοχικών μετρήσεων (inter run %DIFF) για όλα τα δείγματα ελέγχου της παρούσα μεθόδου συνολικά ήταν αρκετά ικανοποιητική, δηλαδή, inter run %DIFF -22,5 ως 10%. Το ίδιο καλή ήταν και η γραμμικότητα της μεθόδου, mean $r^2=0,996$ για τις συγκεκριμένες πρότυπες συγκεντρώσεις. Επίσης, σημαντική ήταν και η ευαισθησία της μεθόδου, με μικρότερη μετρούμενη τιμή ποζακοναζόλης την τιμή 0,2 $\mu\text{g/ml}$.

Η επαναληψιμότητα μεταξύ διαδοχικών μετρήσεων (inter run %CV) κυμάνθηκε από 9,4 ως 11,1% για την πρότυπη καμπύλη, 2,6 ως 12,1% για τα δείγματα ποιοτικού ελέγχου, 12,4 ως 13,6% για τους θετικούς μάρτυρες και 2,6 ως 10,9% για τα δείγματα ασθενών, ενώ μέσα στις ίδιες μετρήσεις (mean intra run %CV) 8,4 ως 12,4%, 2,6 ως 11,4%, 12 ως 13,25% και 2,1 ως 11,2% αντίστοιχα.

Επιπλέον, καλή ήταν και η ανάκτηση της ουσίας, $92,50 \pm 10,35\%$ (mean \pm SD) στη παρούσα μέθοδο.

Η συγκέντρωση της ουσίας του φαρμάκου στον ορό διατηρείται σταθερή, για μεγάλο χρονικό διάστημα, όπως το διάστημα των 5-6 μηνών της παρούσης μεθόδου. Αυτό αποτελεί πλεονέκτημα για το εργαστήριο που ασχολείται με τη μέτρηση των επιπέδων των φαρμάκων. Όταν δεν υπάρχει άμεση επιτακτική ανάγκη μέτρησης μπορεί το εργαστήριο να αναβάλει για μερικές ημέρες τη μέτρησή τους, έτσι ώστε να συγκεντρωθεί ένας ικανός αριθμός δειγμάτων και να πραγματοποιηθούν οι προσδιορισμοί όλοι μαζί για λόγους εξοικονόμησης χρημάτων και χρόνου. Σημαντικό είναι επίσης, οι μετρήσεις των επιπέδων σε κάθε εργαστήριο να γίνονται αν όχι από έναν, τουλάχιστον από λίγα συγκεκριμένα άτομα έτσι ώστε να διατηρούνται σταθερότερες οι συνθήκες προσδιορισμού και να περιορίζεται η πιθανότητα σφαλμάτων

Μειονέκτημα της μικροβιολογικής μεθόδου σε σχέση με τις αναλυτικές είναι η αδυναμία μέτρησης χωριστά των επιπέδων των πιθανών ενεργών μεταβολιτών της μητρικής ουσίας, καθώς και η μη δυνατότητα μέτρησης των επιπέδων συγκεκριμένου αντιμυκητιακού στην περίπτωση συγχορήγησης περισσότερων φαρμάκων..

Επιπλέον, οι μέθοδοι παρακολούθησης των επιπέδων των αντιμυκητιακών φαρμάκων δεν είναι εύκολο και πρακτικό να υποστηριχθούν από όλα τα εργαστηριακά κέντρα, καθώς το αντικείμενο τους είναι τέτοιο που είναι απαραίτητη η συνύπαρξη και η συνεργασία με εξειδικευμένες μονάδες νοσηλείας ασθενών που πιθανώς θα λάβουν τα συγκεκριμένα φάρμακα.

Συμπερασματικά, η μικροβιολογική μέθοδος στην περίπτωση της αντιμυκητιακής μονοθεραπείας με ποζακοναζόλη μπορεί να αποτελέσει μια πολύ καλή και αξιόπιστη, εναλλακτική λύση άμεσης εφαρμογής για τη μέτρηση των επιπέδων της ουσίας, λόγω της σχετικής ευκολίας στην εκτέλεση, καθώς και της οικονομικότερης εκδοχής σε σχέση με την επιλογή της αναλυτικής μεθόδου.

Βιβλιογραφία

Ξενόγλωσση βιβλιογραφία

1. Andes D, et al. Antifungal therapeutic drug monitoring: established and emerging indications. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53 (1): 24-34.
2. Andes D, et al. Pharmacodynamics of a new triazole, posaconazole, in a murine model of disseminated candidiasis. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 137-142.
3. Annase EJ, Kontoyiannis DP, Huls C, et al. Safety, plasma concentrations, and efficacy of high-dose fluconazole in invasive mold infections. *J Infect Dis* 1995;172:599-602.
4. Barnes RA, Denning DW, Evans EGV, et al for the British Society for Antimicrobial Chemotherapy and Denning DW, Evans EGV, Kibbler CC, et al for the British Society for Medical Mycology. Fungal infections: a survey of laboratory services for diagnosis and treatment. *CDR Rev* 1996;6:R69.
5. Barone, J.A., B.L. Moskovitz, J. Guarnieri, A.E.Hassel, J.L.Collaizzi, R.H.Bierman, and Jessen. Enhanced bioavailability of itraconazole in hydroxypropyl- β -cyclodextrin solution versus capsules in healthy volunteers. *Antimicrob. Agents Chemother*, 1998; 42:1862-1865.
6. Bennet, J.E., W. E. Dismukes, R.J.Duma, et al. A comparison of amphotericin B alone and combined with flucytosine in the treatment of cryptococcal meningitis. *N.Engl. J.Med.*1979;301:126-131.
7. Bennett JE. Echinocandins for candidemia in adults without neutropenia *N Engl J Med*. 2006;1154-1159
8. British Society for Antimicrobial Chemotherapy Working Party. Laboratory monitoring of antifungal chemotherapy. *Lancet* 1991; 337: 1577-80.
9. Brammer, K.W., P.R.Farrow, and J.K. Faulkner. Pharmacokinetics and tissue penetration of fluconazole in humans.1990, *Rev. Infect. Dis.* 12 (Suppl.3):318-326.
10. Carsten, M., Magrit ,A., Queckenberg, C et al., HPLC analysis of the antifungal agent posaconazole in patients with haematological diseases. *Mycoses* 2006,49(supp 1):17-22
11. Cartledge, J.D., J.Midgely, and B.G.Gazzard. Itraconazole solution: higher serum drug concentrations and better clinical response rates than the capsule formulation in acquired immunodeficiency syndrome patients with candidosis. *J.Clin.Pathol.* 1997, 50: 477-480.
12. Cornely OA, Maertens J, et al. Posaconazole vs fluconazole or itraconazole prophylaxis in patients with neutropenia. *N Engl J Med* 2007; 356: 348-359.
13. Courtney R, et al. Pharmacokinetics of posaconazole co administered with antacid in fasting or no fasting healthy men. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 804-808.
14. Courney R, et al. Pharmacokinetics, safety, and tolerability of oral posaconazole administered in single and multiple doses in healthy adults. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47: 2788-2795.
15. Cuenca-Estrella M,Gomez-Lopez A, Mellado E et al. Head-to-head comparison of the activities of currently available antifungal agents against 3378 Spanish clinical isolates of yeasts and filamentous fungi. *Antimicrob Agents Chemother* 2006;150:917-21.
16. De la Vega, L., S.P.Volkow, R.A.Yeates, et al Administration of the antimycotic agents fluconazole and itraconazole to leukaemia patients: a comparative

- pharmacokinetic study. *Drugs Exp. Clin. Res.* 1994;20: 69-75.
17. Dismukes, W.E., G.Cloud, H.A.Gallis, et al. Treatment of cryptococcal meningitis with combination amphotericin B and flucytosine for four as compared to six weeks. *N. Engl.J.Med.* 1987;317:334-341.
 18. Dixon D.M., Walsh T.J. *Antifungal Agents, Medical Microbiology*, 1996, 4th ed.76:2-12
 19. Dominguez- Gill, H.A., N.A. Sanchez, and M.J.Garcia Sanchez. Therapeutic drug monitoring of itraconazole and the relevance of pharmacokinetics interactions. *Clin. Microbiol. Infect.* 2006; 12 (suppl.7):97-106
 20. Dodds L, et al. Pharmacology of systemic antifungal agents. *Clin Infect Dis* 2006; 43 (suppl. 1): 28-39.
 21. Douglas CM, D'Ippolito JA. Shei GJ. et al. Identification of the FKS1 gene of *Candida albicans* as the essential target of 1,3- beta- D- glucan synthase inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother.* 1997; 41(11):2471-2479.
 22. Drussano GL. How does a patient maximally benefit from anti-infective chemotherapy? *Clin Infect Dis* 2004; 39: 1245-1246.
 23. Evans WE. General principles of applied pharmacokinetics. In *Applied Pharmacokinetics: Principles of Therapeutic Drug Monitoring* (Evans WE, Schentag JJ, Jusko WJ), p.1.1-1.8.1992, Applied Therapeutics, Vancouver.
 24. Galpin AJ, Evans WE. Therapeutic drug monitoring in cancer management. *Clinical Chemistry* 1993; 39:2419-30.
 25. Graybill JR. Is there a correlation between serum antifungal drug concentration and clinical outcome? *Journal of Infection* 1994; 28(suppl.1):17-24.
 26. Gubbons, P.O., and J.R.Amsden. 2005. Drug-drug interactions of antifungal agents and implications for patients care. *Expert Opin. Pharmacother.* 6:2231-224.
 27. Hardin, T.C.,J.R. Graybill, R. Fetchick, et al.. Pharmacokinetics of itraconazole following oral administration to normal volunteers. *Antimicrob. Agents Chemother* 1988. 32: 1310-1313.
 28. Herbecht R. Posaconazole: a potent, extended- spectrum triazole antifungal for the treatment of serious fungal infections. *Int J Clin Pract* 2004; 18: 612-24.
 29. Hope WH, Billaud EM, Lestner J, et al. Therapeutic Drug Monitoring for triazoles. *Curr Opin Infect Dis* 2008; 21(6):580-586.
 30. Hostetler JS, et al. Discrepancies in bioassay and chromatography determinations explained by metabolism of itraconazole to hydroxyitraconazole: studies of interpatient variations in concentrations. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1993; 37: 2224-7.
 31. Howard SL, et al. Posaconazole: the case for therapeutic drug monitoring. *The Drug Monit* 2012;34(1):72-76
 32. Jaruratanasirikul, S., and A.Kleepkaew. Influence of an acidic beverage (Coca-Cola) on the absorption of itraconazole. *Eur, J.Clin. Pharmacol.* 1997; 52: 235-237.
 33. Jang SH, et al. Exposure-response of posaconazole use for prophylaxis against invasive fungal infections: evaluating the need to adjust based on drug concentrations in plasma. *Clin Pharmacol Ther* 2010; 88 (1): 115-119.
 34. Johnson, L.B., and C.A. Kauffman.. Voriconazole: a new triazole antifungal agent. *Clin. Infect. Dis.* 2003; 36:630-637.
 35. Keating GM. Posaconazole. *Drugs* 2005;1553-67;discussion 1568-9.
 36. Keating GM., Posaconazole, *Adis Drug Profile*, August 2006;(11):1553-1567
 37. Kim H, et al. Use of high-performance liquid chromatographic and microbiological analysis for evaluating the presence or absence of active metabolites of the antifungal posaconazole in human plasma. *J Chromatogr*

- 2003; 987: 243-248.
38. Krishna, G., A. Moton, L. Ma, et al. 2008. Effect of gastric pH, dosing regimen and prandial state, food and meal timing relative to dose, and gastrointestinal motility on absorption and pharmacokinetics of the antifungal, posaconazole, abstr.P1264. Abstr.18th Eur. Congr. Clin.Microiol. Infect. Dis.
 39. Krishna G., Moton A., Ma L., et al. Pharmacokinetics and absorption of posaconazole oral suspension under various gastric conditions in healthy volunteers. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53(3): 958-966
 40. Lange, D., J.H.Pavao, J. Wu, and M. Klausner. Effect of o cola beverage on the bioavailability of itraconazole in the presence of H₂ blockers. *J. Clin. Pharmacol.* 1997; 37: 535-540.
 41. Lazarus, H.M., J.L. Blumer, S. Yanovich, et al. Safety and pharmacokinetics of oral voriconazole in patients at risk of fungal infection: a dose escalation study. *J. Clin. Pharmacol.* 2002; 37: 535-540.
 42. Louie A, Liu QF, Drusano GL, et al. Pharmacokinetic studies of fluconazole in rabbits characterizing doses which achieve peak levels in serum and area under the concentration- time curve values which mimic those of high-dose fluconazole in humans. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42: 1512-1514.
 43. Mc Lachlan AJ, Tett SE. Pharmacokinetics of fluconazole in people with HIV infection: a population analysis. *Br J Clin Pharmacol* 1996; 41: 291-298.
 44. Munayyer H.K., Mann P.A., Chau A.S., et al. Posaconazole is a potent inhibitor of sterol 14 α -demethylation in yeasts and molds. *Antimicrob Agents Chemother* 2004 Oct; 48 (10): 3690-6.
 45. Pasqualotto, A.C., S.J. Howard, C.B. Moore, et al. Flucytosine therapeutic monitoring : 15 years experience from the UK. *J. Antimicrob. Chemother.* 2007; 9: 791-793.
 46. Perea S, et al. Comparison of high-performance liquid chromatographic and microbiological methods for determination of voriconazole levels in plasma. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44 (5): 1209-1213.
 47. Petraitiene R, et al. Antifungal activity and pharmacokinetics of posaconazole (SCH 56592) in treatment and prevention of experimental invasive pulmonary aspergillosis: correlation with galactomannan antigenemia. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 857-869.
 48. Poirier, J.M., F. Berlioz, F. Isnard, et al. Marked intra- and inter- patient variability of itraconazole steady state plasma concentrations. *Therapie.* 1996; 51: 163-167.
 49. Poirier, J.M., and Cheymol G. Optimisation of itraconazole therapy using target drug concentrations. *Clin. Pharmacokinetic.* 1998; 35: 461-473.
 50. Prazynska M., Gospodarek E. In Vitro Effect of Amphotericin B on *Candida albicans*, *Candida glabrata* and *Candida parapsilosis*. *Biofilm Formation. Mycopathologia* 2014, 177: 19-27
 51. Purkins, L., N. Wood, K. Greenhalgh, et al. Voriconazole, a novel wide spectrum triazole: oral pharmacokinetics and safety. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 2003; 56 (Suppl.1): 10-16
 52. Purkins, L., N. Wood, K. Greenhalgh, et al., Pharmacokinetics and safety of voriconazole following intravenous- to oral- dose escalation regimens. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2002; 46: 2546-2553
 53. Russell EL. Current concepts in antifungal pharmacology. *Mayo Clin Proc* 2011; 86 (8): 805-817.
 54. Sabatelli F. In Vitro of Posaconazole, Fluconazole, Itraconazole, Voriconazole, and Amphotericin B against a Large Collection of Clinically Important Molds and Yeasts, *Journal of Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2006; 50 (6):

- 2009-2015.
55. Sheehan D.J., Hitchcock C.A., Sibley C.M. Current and emerging azole antifungal agents, *Clin Microbiol Rev.*1999; 12(1): 40-79.
 56. Stevens, D.A. Itraconazole in cyclodextrin solution. *Pharmacotherapy*, 1999; 19: 603-611.
 57. Summers KK, Hardin TC, Gore SJ, Graybill JR. Therapeutic drug monitoring of systemic antifungal therapy. *J Antimicrob Chemother* 1997 Dec;40(6):753-64.
 58. Ullmann AJ, et al. Posaconazole or fluconazole for prophylaxis in severe graft-versus-host disease. *N Engl J Med* 2007; 356: 335-347.
 59. Ullman AJ, et al. Pharmacokinetics, safety, and efficacy of posaconazole in patients with persistent febrile neutropenia or refractory invasive fungal infection. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50: 658-666.
 60. Van de Velde, V.J., J.H.Lipton, D.H.Vesole, et al. Effect of food on the pharmacokinetics of a new hydroxypropyl-beta-cyclodextrin formulation of itraconazole. *Pharmacotherapy*.1999; 16: 424-428.
 61. Van Peer , A., R. Woestenborghs, J. Heykants, et al. The effects of food and dose on the oral systemic availability of itraconazole in healthy subjects. *Eur. J. Clin. Pharmacol*, 1989; 36:423-426.
 62. Vyzantiadis T.A., Ioakimidou A., et al. Validation of a bioassay for the measurement of voriconazole levels in serum. *Mycoses* 2011;54(suppl.2):136(Abstract)
 63. Walravens J., Brouwers J., Spriet I., Tack J., Annaert P., Augustinjs P. Effect of PH and Comedication on Gastrointestinal Absorption of Posaconazole, *Monitoring of Intraluminal and Plasma Drugs Concentrations*, Nov. 2011 vol 50;11:725-734
 64. Walsh TJ, et al. Treatment of invasive aspergillosis with posaconazole in patients who are refractory to or intolerant of conventional therapy: an externally controlled trial. *Clin Infect Dis* 2007; 44: 2-12.
 65. Warnock DW, et al. Comparison of high performance liquid chromatographic and microbiological methods for determination of itraconazole. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 1988; 21: 93-100.
 66. Xiao L, Madison V, Chau AS, et al. Three- dimensional models of wild-type and mutated forms of cytochrome P450 14 α -sterol demethylases from *Aspergillus fumigatus* and *Candida albicans* provide insights into posaconazole binding. *Antimicrob Agents Chemother* 2004 Feb; 48(2):568-74.

Ελληνόγλωσση βιβλιογραφία

67. Βυζαντιάδης T.A. Εργαστηριακή προσέγγιση συστηματικών μυκητιάσεων, *Μικροβιολογικά χρονικά*, Τόμος 22ος, Θεσσαλονίκη, 2006, σ.104.
68. Βυζαντιάδης T.A., Σύγχρονη εργαστηριακή μεθοδολογία στη διάγνωση και παρακολούθηση των μυκητιακών λοιμώξεων, *Μικροβιολογικά Χρονικά*. Τόμος 25ος, Θεσσαλονίκη, 2009 σ.11-2
69. Περόγαμβρος Α.Η., Λεγάκης Ν.Ι. «Προσδιορισμός της στάθμης των αντιμικροβιακών ουσιών στα βιολογικά υγρά», στο, *Μέθοδοι Χρήσιμες στην Αντιμικροβιακή Χημειοθεραπεία*, Αθήνα, 1987, σ.90.

Έντυπα ηλεκτρονικής μορφής

70. Food and Drug Administration. 2001. Briefing document for voriconazole. Food and Administration, Washington, DC
<http://www.fda.gov/orms/dockets/ac/01/briefing/3792b2.htm>
71. European Medicine Agency, Science medicines Health, Περίληψη των χαρακτηριστικών της ποζαконаζόλης
[http://www.ema.europa.eu/docs/el_EL/document_library/EPAR -
Product Information/human/000610/WC500037784.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/el_EL/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000610/WC500037784.pdf)