



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
DEPARTAMENT DE CIÈNCIES MÈDIQUES BÀSIQUES

**Evaluación experimental de
terapias antifúngicas frente a
hongos oportunistas emergentes**

Marta Sanchis Talón

Tesis Doctoral

Septiembre, 2016

Dirigida por los Dres. Josep Guarro Artigas,

Javier Capilla Luque y Loida López Fernández



UNIVERSITAT
ROVIRA I VIRGILI

Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques
Facultat de Medicina i Ciències de la Salut

Josep Guarro Artigas, Catedrático de Microbiología de la Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud de la Universidad Rovira i Virgili, Javier Capilla Luque, profesor agregado de la Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud de la Universidad Rovira i Virgili y Dra. Loida López Fernández, investigadora de la Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud de la Universidad Rovira i Virgili.

Hacen constar que:

La Tesis Doctoral titulada **“EVALUACIÓN EXPERIMENTAL DE TERAPIAS ANTIFÚNGICAS FRENTE A HONGOS OPORTUNISTES EMERGENTES”**, presentada por Marta Sanchis Talón, ha sido realizada bajo su dirección en el Departamento de Microbiología de esta universidad y cumple los requisitos necesarios para optar al título de Doctor.

Y para que así conste y tenga los efectos oportunos, firman la presente.

Reus, 11 de Julio de 2016

Los directores de la Tesis Doctoral:

Dr Josep Guarro Artigas

Dr. Javier Capilla Luque

Dra. Loida López Fernández

A mis padres por ser el pilar fundamental en todo lo que soy,

GRACIAS

Agradecimientos

Quisiera expresar mis más sinceros agradecimientos tanto a mis directores de tesis como a todas y cada una de las personas las cuales han aportado su infinito esfuerzo y dedicación para hacer posible la realización de esta tesis doctoral.

En primer lugar, agradecer a mis directores de tesis, Dr. Josep Guarro Artigas, por todo el apoyo recibido, por ser un ejemplo de líder y persona. Gracias por compartir todos tus conocimientos y hacerme crecer como profesional al mismo tiempo que tratarme con mucho cariño. Créeme que de seguro voy a echar de menos tu disponibilidad y preocupación durante las 24 h del día, controlando todo y cada uno de los detalles igual que durante estos 4 años. Al Dr. Javier Capilla Luque, por tu orientación, comprensión y esmero puesto en mí, por haber sido siempre un apoyo durante todo el camino. A la Dra. Loida López Fernández, por compartir conmigo tu experiencia y parte de tus conocimientos en genética y por estar dispuesta siempre a echarme una mano en cualquier momento.

Al Dr. Francisco Javier Pastor Molas, para mí el cuarto director de esta tesis, por su confianza puesta en mí desde el primer día que me hizo creer en mis posibilidades, por ser un apoyo incondicional desde el principio hasta el final, por tantas cosas que tengo que agradecerle, todas las palabras que pueda escribir son pocas. Gracias, gracias y gracias.

Al Dr. Josep Cano Lira, quien confió en mí y me brindó la oportunidad de acceder a realizar la presente tesis, sin el cual nada de esto sería posible. Gracias por todos tus consejos, predisposición y ayuda. Por

dejarme libertad para crecer como docente y creer en toda mi capacidad. Espero tu visita por Valencia para venir a buscar “*productes de la terreta*”.

Al Dr. Alberto Stchigel, Betico ¿qué decirte?, gracias por todo, por la amistad que hemos compartido, por tus risas y ánimos en cada uno de los días durante estos años. De verdad, tu alegría y tus halagos hacen sonreír a cualquier persona en el peor de los días.

Al resto de Dras/ Dres Josepa Gené, María José Figueras, Kendra Rodríguez, Emilio Mayayo, Katihuska Paredes y Dania García por todos vuestros consejos desde la veteranía en este camino y por cada uno de los gestos con tanto cariño.

Agradecer el calor y la cercanía durante mi estancia en Murcia a todo el equipo dirigido por el Dr. Victoriano Garre, gracias por toda vuestra dedicación puesta en mí y por hacerme sentir tan a gusto en vuestro grupo.

¡Y como no a mis científicas locas! Porque sois geniales, por el grupo tan especial que hemos formado que me deja tantas historias que recordar. Cada vez que piense en muchos de nuestros momentos me saldrá una sonrisa de oreja a oreja repleta de un inmenso cariño, os voy a echar mucho de menos. Destacar a mis dos amigas e inmejorables compañeras de “antifungals power”, Adela y Patri, gracias por formar el mejor de los equipos, por cada uno de los minutos de amistad que hemos compartido tanto dentro como fuera del trabajo, sin egoísmos, llenos de sinceridad y sonrisas. Todas os merecéis todo el éxito en la vida, sois lo mejor.

También a Valentina y a Yasmina dos personas especiales con las que he tenido la suerte de cruzarme en este camino, también a Débora, Keith, Margarita, Arturo y al resto de compañeros/as y técnicos de laboratorio que hemos compartido alguna etapa repleta de buenos

momentos, todos y cada uno de vosotros me ha aportado y enseñado algo ¡espero que todo os vaya genial!

Al resto de personal tanto administrativo y como de la URV que siempre están ahí para ayudarnos en cualquier obstáculo que se nos presenta y en especial a Montse Pallás por todos sus consejos y su especial cariño.

A todos mis amigos/as porqué me siento orgullosa de teneros porqué sois maravillosos y porqué a pesar de la distancia siempre me habéis hecho sentir lo cerca que estamos, espero teneros siempre a mi lado. Gracias por cada frase de ánimo y comprensión, por apoyarme y darme la fuerza en cada uno de los momentos en los que más se necesitan. Por estar tanto para las buenas como para las malas, ¡quien tiene un amigo tiene un tesoro!

Y qué decir de mi familia (padres, hermano, tíos/as, sobrinos/as, primos/as), hay cosas que solo se sienten y no se pueden expresar con palabras, sois lo mejor que una persona puede tener a su lado. Dicen que los amigos se eligen, pero la familia te toca, sin duda, a mí me ha tocado la mejor que se puede tener. En especial a mis padres, porque no me han podido guiar mejor en la escuela de la vida, por caminar junto a mí incansablemente superando cada piedra que se nos ha presentado en el camino y por ser las referencias más nobles y ejemplares que se pueden tener, porqué sin vosotros no sería lo que soy: GRACIAS por dar todo lo que tenéis por mí. A mi bro, Javi, el mejor hermano del universo porqué sé que siempre vamos a estar unidos pase lo que pase. Los 3 sois una parte de mí, os adoro y os quiero muchísimo.

Y finalmente, gracias a David, por estar a mi lado y ser incondicional. No he podido tener cerca de mí a un mejor compañero. Espero seguir

sumando momentos como hasta ahora a lo largo de nuestro camino juntos.

Para todos vosotros es esta dedicatoria de tesis, a quienes os debo tanto por vuestro apoyo incondicional, por haber sido una familia para mí durante estos años.

GRACIAS infinitas a todos/as!!

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. El reino Fungi	3
1.2. Enfermedades causadas por hongos	6
1.2.1. Generalidades: tipos de micosis	6
1.2.1.1. Micosis sistémicas.....	8
1.2.2. Micosis causadas por hongos levaduriformes: <i>Candida spp.</i> no- <i>albicans</i>	9
1.2.3. Micosis causadas por hongos filamentosos: <i>Aspergillus spp.</i> no- <i>fumigatus</i>	17
1.3. Problemática de las infecciones fúngicas y métodos de diagnóstico clínicos	18
1.3.1. Métodos convencionales: cultivo microbiológico.....	19
1.3.2. Métodos de diagnóstico molecular.....	19
1.3.3. Métodos de diagnóstico serológico: biomarcadores.....	20
1.4. Agentes antifúngicos: mecanismos de acción y propiedades farmacocinéticas	22
1.4.1. Clasificación de los antifúngicos.....	23
1.4.1.1. Polienos	24
1.4.1.2. Flucitosina	27
1.4.1.3. Azoles.....	28
1.4.1.4. Equinocandinas	33
1.4.2. Determinación de la actividad antifúngica	35
1.5. Modelos experimentales <i>in vivo</i> para la evaluación de la eficacia antifúngica.....	37
1.6. Correlación <i>in vitro</i>-clínica	39
1.7. Mecanismos moleculares de resistencia a los antifúngicos	41
2. INTERÉS Y OBJETIVOS DEL ESTUDIO	43
3. MATERIALES Y MÉTODOS	49
3.1. Origen y conservación de las cepas	51
3.2. Estudios <i>in vitro</i>	51

3.2.1. Cepas	51
3.2.2. Agentes antifúngicos	52
3.2.3. Estudios de la sensibilidad antifúngica: método de microdilución en caldo	52
3.2.3.1. Metodología (Test de susceptibilidad antifúngica individual)	52
3.2.3.2. Lectura e interpretación de los resultados	55
3.2.4. Curvas de mortalidad-tiempo	57
3.3. Estudios <i>in vivo</i>	58
3.3.1. Cepas	58
3.3.2. Animales de experimentación	59
3.3.3. Inmunosupresión	60
3.3.4. Infección	61
3.3.5. Fármacos ensayados <i>in vivo</i> : tratamientos, dosis y vías de administración	61
3.3.6. Evaluación de la virulencia y de la eficacia de los tratamientos	63
3.3.6.1. Estudios de supervivencia	63
3.3.6.2. Estudios de carga fúngica en órganos	63
3.3.6.3. Determinación y cuantificación de los niveles séricos de antifúngicos (bioensayo) y de antígenos (galactomanano y (1→3)-β- D-glucano	63
3.3.7. Histopatología	68
3.3.8. Estudios moleculares: análisis de la secuencia <i>FKS1</i> en <i>C. kefyr</i>	68
3.3.9. Análisis estadístico	70
4. RESULTADOS	73
4.1. Terapia experimental de los azoles sobre <i>Candida guilliermondii</i>	75
4.2. Eficacia experimental de la anidulafungina frente a especies pertenecientes al complejo <i>Aspergillus terreus</i>	81

4.3. Terapia con voriconazol y posaconazol sobre una infección experimental por <i>Candida lusitaniae</i>	89
4.4. Terapias antifúngicas en infecciones murinas causadas por <i>Candida kefyr</i>	95
4.5. Las concentraciones mínimas inhibitorias del voriconazol (MICs) son predictivas de la eficacia del tratamiento en una infección experimental murina por <i>Candida glabrata</i>	103
4.6. Eficacia de las equinocandinas frente a infecciones murinas por <i>Dlutina (Candida) rugosa</i>	109
5. DISCUSIÓN	117
5.1. <i>Aspergillus terreus</i>: Eficacia de la anidulafungina	119
5.2. <i>Candida</i> spp. no-<i>albicans</i>: Exploración de nuevas terapias antifúngicas	121
5.2.1. <i>C. guilliermondii</i> y <i>C. lusitaniae</i> . Eficacia del posaconazol y voriconazol	122
5.2.2. <i>C. glabrata</i> . Correlación entre la actividad <i>in vitro</i> del voriconazol y su eficacia <i>in vivo</i> frente a <i>C. glabrata</i>	124
5.2.3. <i>C. kefyr</i> . Eficacia de la anfotericina B, el fluconazol y la caspofungina.....	125
5.2.4. <i>D. rugosa</i> . Equinocandinas: correlación valores <i>in vitro</i> versus eficacia <i>in vivo</i>	127
6. CONCLUSIONES	131
6.1. Hongos filamentosos: <i>Aspergillus terreus</i>	133
6.2. Hongos levaduriformes: <i>Candida</i> spp. no-<i>albicans</i>	133
7. BIBLIOGRAFÍA	137

1. INTRODUCCIÓN

1. Introducción

1.1. El reino Fungi

El reino *Fungi* fue propuesto por Whittaker en 1969 para designar a un grupo de organismos eucariotas, heterótrofos, mayoritariamente inmóviles. Morfológicamente son mayoritariamente filamentosos y ocasionalmente unicelulares presentando nutrición absorptiva. A nivel celular se caracterizan por poseer una pared celular externa rica en quitina y β -glucanos (Kirk *et al.*, 2008) y una membrana plasmática con ergosterol. Son ubicuos y con una amplia distribución geográfica. Según la clasificación actual, el reino *Fungi* incluye al menos unas 100.000 especies descritas y se divide en el subreino *Dikarya* (el cual agrupa a las divisiones *Ascomycota* y *Basidiomycota* y en el que se hallan la mayoría de hongos patógenos para el hombre), la división *Glomeromycota* (hongos productores de micorrizas arbusculares y vesículo-arbusculares), y los hongos “basales” que entre otros incluye la subdivisión *Mucoromycotina* la cual engloba importantes patógenos humanos previamente incluidos en la división *Zygomycota*. Con la aplicación taxonómica de técnicas moleculares diferentes estudios demostraron que los zigomicetos eran de naturaleza polifilética, lo cual llevó a proponer el reemplazo de la división correspondiente por las subdivisiones *Entomophthoromycotina*, *Kickxellomycotina*, *Mucoromycotina* y *Zoopagomycotina* (Hibbett *et al.*, 2007). Más recientemente *Entomophthoromycotina* fue elevado al rango de división (Humber, 2012) y el orden *Mortierellales* al rango de subdivisión (Hoffmann *et al.*, 2011). Estos grandes cambios taxonómicos, acaecidos en los quince últimos años, se han producido gracias a la introducción de técnicas moleculares basadas en la secuenciación del ADN como herramientas para la reconstrucción de la filogenia de los hongos,

incluyendo el de las especies consideradas como patógenas (o potencialmente patógenas) para los humanos (Guarro, 2012). Los hongos también son capaces de establecer relaciones simbióticas con otros organismos. A pesar de que la mayoría de hongos son saprofitos desempeñando un papel importante como descomponedores primarios de la materia orgánica (saprobios) participando así en el ciclo de materia y energía (Guarro, 2012), numerosas especies actúan como comensales (líquenes, micorrizas, “ambrosia fungi”), parásitos (produciendo infecciones en plantas y animales incluyendo el ser humano) o depredadores (hongos que capturan nematodos y protozoos). En las últimas décadas, los hongos han ganado interés comercial y biotecnológico debido a su capacidad de producir metabolitos secundarios que son ampliamente utilizados en la industria. Son por ejemplo fuente de obtención de antibióticos (penicilina, griseofulvina o caspofungina) vitaminas, inmunosupresores (ciclosporina), anticolesterolémicos (estatinas), compuestos anticancerígenos, ácidos orgánicos (cítrico y glucónico) o compuestos carotenoides, entre otros (Álvarez, 2013; Kirk *et al.*, 2008). Asimismo, algunas levaduras son capaces de fermentar los azúcares lo cual hace posible su uso para producción de alcohol etílico, así como para la generación de biocombustibles a partir de sustratos ricos en almidón. Sin embargo, a pesar de los aspectos positivos para las sociedades humanas, estos organismos representan también un problema debido a la capacidad que presentan algunas especies de causar infecciones en plantas, animales y humanos (Fisher *et al.*, 2013). Los procesos infecciosos son conocidos como micosis y pueden causar un amplio rango de enfermedades. En la clínica humana los ascomicetos engloban a la mayoría de los hongos patógenos tanto levaduriformes como filamentosos. Los hongos pueden presentar diferentes estrategias reproductivas i.e., una de naturaleza sexual (el teleomorfo) y/o una o más de naturaleza asexual (el anamorfo

Introducción

o sinanamorfo, respectivamente) (Pontón *et al.*, 2002), siendo el organismo en conjunto conocido como holomorfo. No obstante, la mayoría de las especies patógenas para el ser humano corresponden a hongos anamórficos. Desde un punto de vista morfológico, podemos encontrar hongos levaduriformes, hongos filamentosos y dimórficos. Las levaduras son hongos unicelulares que producen colonias de forma oval o esférica, con aspecto liso, cremoso y de color marfil o salmón (Pontón *et al.*, 2002). Se reproducen de forma asexual mediante fisión binaria o gemación donde a partir de una célula madre nace una célula hija que posteriormente se puede desprender o quedarse formando una cadena de células que se denomina pseudohifa. Las principales levaduras patógenas para los seres humanos son las pertenecientes a los géneros *Candida*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*. o *Trichosporon*. (Arendrup, 2013). Los hongos filamentosos son, en cambio, organismos pluricelulares que se caracterizan por presentar células vegetativas filamentosas denominadas hifas. Estas estructuras se forman o mediante la germinación de una espora o a partir de fragmentos de otras hifas. Estas hifas se ramifican en todas las direcciones de manera que el conjunto de hifas forma el cuerpo vegetativo del hongo o talo, lo cual se conoce con el nombre micelio. Algunos géneros de hongos filamentosos presentan hifas septadas las cuales poseen paredes transversales que subdividen el filamento, como por ejemplo *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., o *Scedosporium* spp., de gran importancia en la clínica humana. Además, existe un grupo de hongos que presentan hifas no septadas denominadas cenocíticas, características de las especies pertenecientes a los mucorales siendo *Mucor* spp., *Rhizopus* spp., *Lichtheimia* spp., *Absidia* spp., *Apophysomyces* spp. o *Saksenaea* spp. los géneros de mayor incidencia (Pemán & Salavert, 2012). Por último, los hongos dimórficos pueden presentar tanto formas levaduriformes como filamentosas dependiendo

de las condiciones ambientales en las que se encuentran (temperatura, concentración de CO₂, pH, etc.) como por ejemplo *Coccidioides immitis*, *Sporothrix schenckii* o *Blastomyces dermatitidis* entre otros.

1.2. Enfermedades causadas por hongos

1.2.1. Generalidades: tipos de micosis

Un grupo considerable de hongos tiene la capacidad de causar procesos infecciosos en el hombre que son conocidos como micosis. Las micosis pueden dar lugar a un espectro de afectaciones muy diversas que pueden ir desde infecciones superficiales a infecciones profundas y multiorgánicas, y generalmente con una sintomatología poco específica. Principalmente se adquieren por inhalación de propágulos, aunque también pueden ser adquiridas por contacto como en el caso de las dermatomicosis, por inoculación traumática (*Sporothrix* spp.) o a partir de la microbiota del huésped (*Candida* spp.). Desde un punto de vista clínico las micosis se pueden clasificar en base a su localización, la ruta de adquisición del patógeno o en base a los factores de virulencia del hongo (Walsh & Dixon, 1996), sin embargo, el criterio más utilizado en medicina humana es la localización anatomoclínica. Siguiendo este criterio se pueden clasificar en: superficiales, cutáneas, subcutáneas, profundas y sistémicas (Tabla. 1).

Introducción

Tabla 1. Clasificación de las micosis

CLASIFICACIÓN DE LAS MICOSIS		
Tipos :	Zona afectada	Enfermedad desarrollada y hongo/s involucrado/s
<u>Superficial</u>	Estrato córneo de la piel y el pelo sin respuesta inmunitaria detectable en el huésped	Piedra blanca (<i>Trichosporon</i> spp.), piedra negra (<i>Piedraria hortae</i>), tiña negra (<i>Hortaea werneckii</i>) y pitiriasis versicolor (<i>Malassezia</i> spp.)
<u>Cutánea</u>	Capas más externas de la piel (epidermis), cabello, uñas y mucosas. Pudiendo evolucionar hasta lesiones subcutáneas	Dermatofitosis: Causadas por los hongos dermatofitos (<i>Trichophyton</i> spp., <i>Microsporium</i> spp., y <i>Epidermophyton floccosum</i>) Dermatomicosis: Otras especies (<i>Candida</i> spp., <i>Scopulariopsis brevicaulis</i> o <i>Neoscytalidium dimidiatum</i>)
<u>Subcutánea</u>	Capas profundas de la dermis y tejido celular subcutáneo, pudiendo afectar músculo y hueso	Esporotricosis: <i>Sporothrix</i> spp. Eumicetoma: (<i>Madurella</i> spp., <i>Scedosporium</i> spp. o <i>Leptosphaeria senegalensis</i>) Cromoblastomicosis: Causada por hongos dematiáceos que producen células escleróticas en tejido (<i>Fonsecaea pedrosoi</i> , <i>Cladophialophora carrionii</i> , <i>Phialophora verrucosa</i> , <i>Exophiala</i> spp., <i>Rhinocladiella aquaspersa</i> o <i>Botromyces caespitosus</i>) Feohifomicosis: Causada por hongos dematiáceos productoras de hifas en tejidos (<i>Alternaria</i> spp., <i>Bipolaris</i> spp., <i>Curvularia</i> spp., <i>Exophiala</i> spp. y <i>Pleurostomophora richarsidae</i>) Otras: mucormicosis (<i>Rhizopus oryzae</i> , <i>Mucor circinelloides</i>), candidiasis o lobomicosis (<i>Lacazia loboi</i>)
<u>Profunda</u>	Afectan a un órgano o tejido interno capaz o no de diseminarse vía linfática y/o hemática	Histoplasmosis (<i>Histoplasma capsulatum</i>), Blastomicosis (<i>Blastomyces dermatitidis</i>), Paracoccidioidomicosis (<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>), Coccidioidomicosis (<i>Coccidioides immitis</i>) y otros géneros como <i>Aspergillus</i> , <i>Scedosporium</i> , entre otros
<u>Sistémica</u>	Afectan a dos órganos o más no adyacentes o a un órgano y la sangre	Patógenos primarios (pacientes inmunocompetentes): Histoplasmosis (<i>Histoplasma capsulatum</i>), Blastomicosis (<i>Blastomyces dermatitidis</i>), Paracoccidioidomicosis (<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>), Coccidioidomicosis (<i>Coccidioides immitis</i>) Oportunistas (pacientes inmunocomprometidos): <i>Candida</i> spp., <i>Aspergillus</i> spp., <i>Mucor</i> spp., <i>Fusarium</i> spp., <i>Cryptococcus</i> spp., <i>Scedosporium</i> spp., <i>Cryptococcus neoformans</i>

1.2.1.1. Micosis sistémicas

Las micosis sistémicas son aquellas en las que se ven afectados dos o más órganos no contiguos o bien un órgano y la sangre. Este tipo de infecciones son causadas típicamente por hongos dimórficos que actúan como patógenos primarios, pudiendo afectar tanto a pacientes inmunocompetentes como a inmunocomprometidos, aunque con diferencias en su incidencia y gravedad (Guarro, 2011; Gomes *et al.*, 2011). En el caso de pacientes con enfermedades de base que afectan el estado inmunitario, numerosas especies fúngicas que tienen un papel saprofítico en la naturaleza pueden actuar como patógenos productores de infecciones diseminadas y se denominan patógenos oportunistas. Las micosis sistémicas causadas por patógenos considerados *estrictos*, afectan principalmente a pacientes que viven o han visitado áreas endémicas (de Hoog *et al.*, 2011) y se producen principalmente por hongos dimórficos (*Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis* o *Paracoccidioides brasiliensis*.) aunque también pueden estar implicados otros géneros como *Cryptococcus* spp., *Candida* spp., *Aspergillus* spp., *Scedosporium* spp., o *Fusarium* spp. Las infecciones causadas por hongos dimórficos son usualmente adquiridas por inhalación de elementos fúngicos viables y si bien usualmente son asintomáticas o clínicamente leves, pueden diseminar y ser graves en algunos casos. Sin embargo, en los últimos años está aumentando la incidencia de las infecciones oportunistas, lo cual se ha relacionado directamente con avances médicos que constituyen un factor de riesgo para su adquisición y desarrollo tisular. Los tratamientos antineoplásicos, los avances en la cirugía de trasplantes, el uso de dispositivos intravasculares y la estancia en unidades de cuidados intensivos, son algunos de los factores que provocan un estado de inmunosupresión en los pacientes y que predispone al establecimiento

Introducción

de infecciones oportunistas (Spellberg & Edwards, 2001; Steinbach & Perfect, 2003). Por lo tanto, estos patógenos, para poder establecerse en el huésped y comenzar a desarrollar el proceso infeccioso requieren que el sistema inmunológico de éste se encuentre debilitado, aunque en condiciones inmunológicas normales el organismo suele ser capaz de eliminarlo. Los principales agentes causales de este tipo de infecciones son especies pertenecientes a los géneros *Candida* y *Aspergillus* seguidos de *Fusarium*, *Mucor*, *Cryptococcus* o *Acremonium*, entre otros (Torres-Narbona *et al.*, 2007). En el caso de *Candida* y *Aspergillus* se han propuesto puntos de corte clínicos (PCCs) y recomendaciones para su tratamiento fruto de la extensa experiencia clínica y disponibilidad de datos obtenidos en hospitales y centros sanitarios a nivel mundial. Sin embargo, en las últimas décadas se ha observado la emergencia de infecciones causadas por especies de *Candida no-albicans* y *Aspergillus no-fumigatus* para las cuales no hay establecidos puntos de corte en base a criterios clínicos, es decir, valores de CMI que permitan catalogar a una cepa como sensible, resistente o de sensibilidad intermedia a un determinado antifúngico, lo cual dificulta el poder predecir con éxito el resultado clínico a partir de resultados obtenidos *in vitro*. En base a la escasez de datos sobre estos hongos emergentes y a la necesidad de establecer tratamientos adecuados, el objeto de esta tesis ha sido contribuir al estudio de estas especies y dilucidar el significado clínico de los resultados obtenidos en ensayos *in vitro*.

1.2.2. Micosis causadas por hongos levaduriformes: *Candida* spp. no-*albicans*

Las especies del género *Candida* pertenecen a la división *Ascomycota* y son uno de los principales agentes causales de infecciones fúngicas, especialmente de fungemias nosocomiales (Guarro, 2012). La candidiasis puede causar un amplio espectro de

manifestaciones clínicas que varían desde infecciones superficiales o cutáneas hasta la candidiasis invasiva (CI) (Pappas *et al.*, 2016), siendo la candidemia la presentación clínica más común de CI (Quindós, 2014). A continuación se muestra una tabla con los diferentes tipos de candidiasis y los factores de riesgo predisponentes (Dignani *et al.*, 1998):

Tabla 2. Tipos de candidiasis

Candidiasis	Presentación clínica	Factores de riesgo
Superficiales (cutánea y mucosas)	Orofaringitis	Radioterapia para el cáncer de cabeza y cuello, uso de corticoides, edades extremas, prótesis dental
	Esofagitis	Cáncer
	Vulvovaginitis	Uso de antibióticos, infección por el VIH, diabetes mellitus, uso sistémico de corticoides, anticonceptivos orales, embarazo
	Cutánea	Humedad y maceración cutánea, enfermedades vasculares
	Cutánea congénita	Prematuridad, progenitora con dispositivo intrauterino
	Mucocutánea crónica	Deficiencia en linfocitos T, enfermedades endocrinológicas
Invasoras	Candidemia	Uso prolongado de antibióticos y estancias largas en hospital, alteración de la integridad intestinal, cirugía abdominal con transfección intestinal, nutrición parenteral total, edades extremas, desnutrición, terapia inmunosupresora, neutropenia, trasplante de células madre o órganos sólidos, infección por el VIH con recuentos bajos de CD4, insuficiencia renal/hemodiálisis, diabetes mellitus, quemaduras graves
	Urinaria	Diabetes mellitus, sonda urinaria, obstrucción urinaria, cirugía urológica
	Neumonía	Aspiración

Candidiasis	Presentación clínica	Factores de riesgo
Invasoras	Endocarditis	Cirugías mayores, antecedentes de endocarditis bacteriana y enfermedad valvular, presencia de catéter venoso central o válvula protésica durante periodos largos, abuso de fármacos intravenosos
	Pericarditis	Cirugía torácica, presencia de catéteres intravasculares
	Sistema nervioso central	Cirugía en el sistema nervioso central, derivación ventriculoperitoneal
	Ocular	Cirugía ocular o trauma
	Huesos y articulaciones	Cirugía, trauma o inyecciones intraarticulares, infección en el pie diabético
	Abdominal	Trasplante de órgano sólido, perforaciones recurrentes, cirugía abdominal repetida, fugas anastomóticas, pancreatitis, diálisis peritoneal continua ambulatoria

Muchas de las especies de este género, especialmente *C. albicans*, son comensales del ser humano formando parte de la microbiota asociada a piel, mucosas y tractos respiratorio, digestivo y urinario (Arendrup, 2013; Dignani *et al.*, 1998). Las especies de este género son las más frecuentemente aisladas a partir de hemocultivo de pacientes hospitalizados en Estados Unidos y causan el 5 – 15 % de todas las septicemias nosocomiales siendo una de las principales causas de micosis sistémicas en pacientes inmunocomprometidos, especialmente en aquellos con neutropenia profunda debida a enfermedades hematológicas, con tasas de mortalidad mayores del 50 % (Quindós, 2014).

Aunque *C. albicans* es la especie mayormente asociada a CI con alrededor del 49 - 50 % del total de los casos (Arendrup, 2013), en los últimos años se ha producido un aumento significativo de la incidencia

de otras especies de *Candida* tales como *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* o *C. krusei*. Este cambio en la epidemiología de la CI ha dado lugar a importantes problemas particularmente a la hora de la elección de la terapia antifúngica ya que muchas de estas especies suelen presentar sensibilidad reducida a los antifúngicos convencionales. (Quindós, 2014; Kołaczowska & Kołaczowski, 2016). Las recomendaciones para el tratamiento de la CI en pacientes neutropénicos incluye el uso de equinocandinas juntamente con las formulaciones lipídicas de la anfotericina B (Pappas *et al.*, 2016), mientras que otros estudios recomiendan caspofungina o micafungina como primera opción y las formulaciones lipídicas de la anfotericina B como alternativas (Ullmann *et al.*, 2012). El fluconazol, sin embargo, solamente se considera una buena alternativa en el tratamiento de la candidemia en aquellos pacientes que no hayan sido tratados anteriormente con azoles. Además, en base a la experiencia en clínica algunos autores recomiendan el voriconazol como una opción para el tratamiento empírico inicial para la CI en pacientes neutropénicos febriles. En el caso de otros compuestos antifúngicos, como por ejemplo el posaconazol, existen pocos datos clínicos disponibles aunque en pacientes no neutropénicos y en tratamientos profilácticos en pacientes con neutropenia, se ha observado que este fármaco podría ser una alternativa terapéutica (Ullmann *et al.*, 2012; Nucci *et al.*, 2013). A pesar de que muchas de las especies no-*albicans* son menos virulentas que *C. albicans*, presentan unos patrones de susceptibilidad antifúngica muy particulares. Diferentes estudios han demostrado que la mayoría de fármacos disponibles poseen una buena actividad *in vitro* frente algunas especies no-*albicans* como *C. lusitaniae* o *C. kefyr* pero frente especies como *C. guilliermondii*, *C. glabrata* o *C. rugosa* presentan una reducida actividad *in vitro*. En el ámbito clínico se ha observado fallo terapéutico de terapias

Introducción

antifúngicas recomendadas como primera línea de tratamiento frente a estas especies por lo que las infecciones por estas levaduras se asocian a altas tasas de mortalidad. Todo esto hace necesario la exploración de tratamientos específicos para así poder administrar una terapia adecuada frente a estas especies emergentes.

❖ *Candida guilliermondii*

C. guilliermondii es un patógeno oportunista emergente ampliamente distribuido en la naturaleza. El espectro de presentaciones clínicas asociadas a incluye infecciones cutáneas, subcutáneas, infecciones leves asociadas a cateterismos, endocarditis, esofagitis, artritis, osteomielitis, periodontitis e infecciones diseminadas. Esta especie causa alrededor del 1 - 3 % de los casos de candidemia (Savini *et al.*, 2011) y es la cuarta especie más frecuente en América Latina (Santolaya *et al.*, 2013). Afectan principalmente a pacientes inmunocomprometidos, especialmente aquellos con procesos hematológicos malignos y/o dispositivos intravasculares (Savini *et al.*, 2011) llegando a causar altas tasas de mortalidad. Diferentes estudios han demostrado que este hongo presenta una baja actividad *in vitro* frente a las equinocandinas, con valores de CMI_s de 2 a 100 veces superiores a las obtenidas para otras especies del género, y al fluconazol (Jensen & Arendrup, 2011; Arendrup *et al.*, 2014). Otros azoles como el itraconazol, posaconazol y voriconazol o la anfotericina B y la flucitosina han demostrado una buena actividad,, sin embargo, y a pesar de que los datos son escasos, se han descrito casos de fallo terapéutico tras la administración de anfotericina B y los diferentes azoles (Savini *et al.*, 2011). Además, se ha demostrado que *C. guilliermondii* presenta una mayor capacidad para expresar multiresistencia frente a los antifúngicos que otras especies del mismo género.

❖ *Candida lusitaniae*

Esta especie es considerada un patógeno nosocomial oportunista emergente responsable de alrededor del 1 - 2 % de las candidemias, afectando a pacientes inmunosuprimidos, particularmente con neoplasias hematológicas como la leucemia y otros tipos de cáncer (Atkinson *et al.*, 2008; Dimopoulos *et al.*, 2008). Se ha observado que posee un patrón particular de sensibilidad antifúngica, ya que a pesar de que todos los fármacos antifúngicos parecen tener una buena actividad *in vitro*, exceptuando el fluconazol (Lockhart *et al.*, 2012), se ha observado su capacidad para desarrollar resistencia *in vivo* a la anfotericina B y a la caspofungina durante el curso de la terapia, lo cual se ha asociado con fallo terapéutico (Atkinson *et al.*, 2008; Desnos-Ollivier *et al.*, 2011).

❖ *Candida kefyr*

C. kefyr es un hongo comúnmente presente en diferentes productos lácteos de consumo diario como son las leches fermentadas y quesos. Esta levadura es considerada como un patógeno emergente nosocomial relacionada con hábitos dietéticos (Gomez-Lopez *et al.*, 2010). Se considera que su incidencia es alrededor del 0,2 % de casos de candidemia en pacientes inmunosuprimidos, afectando principalmente a aquellos con enfermedades hematológicas (Dufresne *et al.*, 2014). A pesar de que no existen muchos estudios acerca de los patrones de susceptibilidad antifúngica de *C. kefyr*, se ha observado que la mayoría de los antifúngicos disponibles presentan una buena actividad frente a esta especie (Nucci *et al.*, 2013), exceptuando la anfotericina B para la que los valores obtenidos en diferentes estudios son contradictorios (Pfaller *et al.*, 2004; Gomez-Lopez *et al.*, 2012; Dufresne *et al.*, 2014; Pfaller *et al.*, 2014). En los pocos casos clínicos

Introducción

que existen en la literatura, se ha descrito variabilidad en los resultados obtenidos con anfotericina B y caspofungina, fallo terapéutico con la anfotericina B liposomal y buenos resultados en un caso tras la administración de fluconazol (Fekkar *et al.*, 2013; Khan *et al.*, 2015).

❖ *Diutina (Candida) rugosa*

Recientemente, el complejo de especies de *C. rugosa* fue revisado en un estudio filogenético en el que finalmente ocho especies pertenecientes a este complejo fueron redefinidas y reacomodadas en el nuevo género *Diutina* (Khunnamwong *et al.*, 2015). En los últimos años esta especie ha sido reconocida como un patógeno nosocomial emergente capaz de causar CI en pacientes inmunosuprimidos, especialmente asociado a la realización de técnicas médicas invasivas, como el uso de catéteres (Colombo *et al.*, 2003; Behera *et al.*, 2010). Esta levadura representa alrededor el 0,2 % de los casos de candidemia según el programa de vigilancia antifúngica ARTEMIS DISK, aunque tiene una mayor incidencia en países de América Latina y la India (Pfaller *et al.*, 2012; Paredes *et al.*, 2011). Existe controversia acerca de la actividad de los diferentes antifúngicos frente a esta especie ya que, si bien algunos autores han observado que este hongo posee una susceptibilidad reducida frente a los polienos, los azoles y las equinocandinas (Espinel-Ingroff *et al.*, 2014); otros han reportado buena actividad de éstas últimas (Diekema *et al.*, 2009). En el único estudio experimental que existe de modelo murino, se observó una buena eficacia de los azoles, mayormente del posaconazol (Hernandez *et al.*, 2004). A pesar de que los datos clínicos en el tratamiento de esta especie son muy escasos se ha observado fallo terapéutico de la anfotericina B, incluso en pacientes infectados con cepas susceptibles al fármaco. Sin embargo, en el tratamiento de pacientes infectados con

aislados susceptibles al fluconazol este fármaco presentó muy buena eficacia.

❖ *Candida glabrata*

C. glabrata es considerado el segundo patógeno oportunista emergente responsable de candidemia en Estados Unidos (22 %) y en los países del norte y centro de Europa (12,4 - 31 %), respecto a las otras especies que forman parte del género *Candida* (Nucci & Marr 2005; Quindós, 2014). La incidencia de estos procesos infecciosos generalmente está relacionada con el uso prolongado de antibióticos, el uso de catéteres venosos centrales, insuficiencia renal y estancias en la unidad de cuidados intensivos. Una importante característica de esta especie es el aumento de aislados clínicos multiresistentes, con baja sensibilidad *in vitro* a la mayoría de fármacos disponibles como la anfotericina B, el fluconazol y las equinocandinas (Sanglard *et al.*, 1999; Sanguinetti *et al.*, 2005; Pfaller *et al.*, 2012; Fernández-Silva *et al.*, 2014). Es por ello que a pesar de que esta especie está considerada menos virulenta que *C. albicans*, la mortalidad es superior, sobretodo en pacientes inmunocomprometidos (Farmakiotis *et al.*, 2015). Además, se ha descrito un aumento de fallos terapéuticos con el uso de las equinocandinas y azoles especialmente el fluconazol y el itraconazol (Beyda *et al.*, 2012). Diferentes análisis genéticos han asociado la resistencia de esta especie a las equinocandinas con la presencia de mutaciones en los genes *FKS1* y/o *FKS2* y en el caso de los azoles con sobreexpresión de los genes *CDR1* y/o *CDR2* que codifican para bombas de flujo (Ferrari *et al.*, 2011; Beyda *et al.*, 2012; Alexander *et al.*, 2013).

1.2.3. Micosis causadas por hongos filamentosos: *Aspergillus* spp. no-*fumigatus*

El género *Aspergillus* está compuesto por más de 250 especies distribuidas mundialmente, de las cuales alrededor de unas 20 son consideradas responsables de infecciones oportunistas en seres humanos (Guarro, 2012). Las especies pertenecientes a este género pueden causar desde alergias y micosis superficiales (onicomicosis, otomicosis, queratomicosis) hasta infecciones diseminadas como es el caso de la aspergilosis invasiva (AI) en pacientes con el sistema inmunológico debilitado. Los principales factores predisponentes para sufrir este tipo de infección son las neoplasias hematológicas, la quimioterapia antineoplásica, la neutropenia profunda y persistente, la administración de corticoides a altas dosis en trasplantes de progenitores hematopoyéticos o de órganos sólidos (Quindós & Eraso, 2008). La vía de adquisición de la aspergilosis es la respiratoria (árbol traqueo-bronquial y senos paranasales) mediante la inhalación de conidios, sin embargo, lesiones en la piel también pueden actuar como vías de entrada dando lugar a infecciones profundas y diseminadas en huéspedes susceptibles. La AI es una causa importante de mortalidad en individuos inmunodeficientes, las cuales varían en función del grado de inmunodepresión y la enfermedad de base del paciente. Se estima que a pesar de los tratamientos disponibles recomendados el desenlace de estas infecciones suele ser crítico con tasas de mortalidad que van desde el 27 % al 80 % (Pastor & Guarro, 2014). A pesar que las infecciones más frecuentes son producidas por *A. fumigatus*, se está observado un incremento de infecciones causadas por especies no-*fumigatus* como *A. flavus*, *A. terreus*, *A. niger*, *A. nidulans* o *A. lentulus*. El voriconazol y recientemente el isavuconazol (Falci & Pasqualotto, 2013; Maertens *et al.*, 2016) son los tratamientos

de elección recomendados para combatir la aspergillosis invasora, mientras que el posaconazol, las formulaciones liposomales de la anfotericina B o las equinocandinas (casposfungina y micafungina) son considerados tratamientos alternativos (Walsh *et al.*, 2008).

❖ *Aspergillus terreus*

A. terreus pertenece a la sección *Terrei* dentro del género *Aspergillus* y es una especie ampliamente distribuida en la naturaleza, especialmente en suelos cálidos del sur y suroeste de los Estados Unidos (Steinbach *et al.*, 2004). Esta especie es considerada como un hongo oportunista emergente el cual ha aumentado su incidencia en los últimos años. Diferentes estudios clínicos han demostrado que este hongo puede causar un amplio rango de infecciones como onicomicosis, enfermedades de la cavidad auditiva, abscesos subcutáneos, queratitis, aspergilosis broncopulmonar alérgica, aspergiloma o infecciones diseminadas en individuos inmunocomprometidos. En diferentes estudios se ha demostrado que esta especie posee una mayor capacidad de diseminación que otras especies del género por lo que está asociada con mayor frecuencia a AI y a porcentajes más elevados de mortalidad (Pastor & Guarro, 2014). Desde el punto de vista clínico es de especial interés ya que es intrínsecamente resistente a la AMB tanto *in vitro* como *in vivo* (Walsh *et al.*, 2008) y además se está observando un aumento significativo de aislados clínicos con resistencia a los azoles, en particular al voriconazol.

1.3. Problemática de las infecciones fúngicas y métodos de diagnóstico clínicos

A pesar de los avances en el manejo de las infecciones fúngicas oportunistas, éstas continúan siendo un desafío para los clínicos debido a la dificultad en realizar un diagnóstico correcto debido al gran número

Introducción

de especies infectantes, algunas poco frecuentes o de difícil identificación, y a las limitaciones terapéuticas derivadas de la toxicidad de los fármacos o su escasa actividad frente a algunas especies. Actualmente, existe controversia acerca de la utilidad de los métodos de diagnósticos convencionales basados en el cultivo para la detección de infecciones fúngicas invasivas ya que a pesar que permiten la identificación del agente etiológico y la realización del estudio de sensibilidad, presentan limitaciones como son la poca especificidad y la lentitud para el diagnóstico. No obstante, la posibilidad de poder combinar las técnicas convencionales con las nuevas estrategias diagnósticas puede mejorar la sensibilidad, especificidad y la rapidez en la detección de la infección fúngica lo cual puede permitir ofrecer una mejor respuesta terapéutica.

1.3.1. Métodos convencionales: cultivo microbiológico

El diagnóstico micológico tradicional de las micosis se basa en el cultivo microbiológico, sin embargo, se caracteriza por su lentitud ya requiere una incubación prolongada del cultivo del microorganismo. Además, la identificación mediante características morfológicas requiere personal altamente especializado y las pruebas metabólicas no siempre son resolutivas. Se ha estimado que la identificación de las CI y AI basada en cultivos posee una baja sensibilidad ya habitualmente dan resultados positivos en un estado avanzado de la enfermedad. Sin embargo, sigue siendo el método más utilizado para el diagnóstico de las micosis superficiales y mucocutáneas (Sims *et al.*, 2012).

1.3.2. Métodos de diagnóstico molecular

Durante los últimos años, la aparición y el desarrollo de las técnicas de secuenciación y análisis de distintas regiones del ADN han supuesto una mejora en la fiabilidad, rapidez, objetividad y precisión

para el diagnóstico de las infecciones fúngicas, llegando a ser cada vez más esenciales en el laboratorio de microbiología clínica. Las técnicas moleculares tienen la capacidad de mediante el análisis de secuencias de diferentes genes demostrar la existencia de nuevas especies o especies crípticas de interés clínico que difícilmente se podrían diferenciar utilizando sólo criterios fenotípicos o morfológicos. Además, permiten detectar posibles mecanismos moleculares de resistencia a los agentes antifúngicos, lo cual sería imposible de conseguir mediante técnicas convencionales. Por lo tanto, la aparición de estas nuevas técnicas aporta mejoras en cuanto al tiempo y especificidad diagnóstica de estas infecciones además de información adicional en cuanto al pronóstico se refiere.

1.3.3. Métodos de diagnóstico serológico: biomarcadores

Las técnicas serológicas para la detección de infecciones fúngicas invasivas (IFIs) se basan en la detección de antígenos específicos (manano y galactomanano) y marcadores panfúngicos como el (1,3)- β -D-glucano (BDG). Diferentes guías clínicas disponibles a nivel internacional aconsejan el uso del BDG para diagnosticar las IFIs en pacientes que están bajo sospecha clínica o en alto riesgo de poder desarrollar una infección fúngica (Khodadadi *et al.*, 2014). El (1,3)- β -D-glucano es un componente presente en la membrana celular de la mayoría de hongos patógenos, (exceptuando *Mucor* spp. y *Cryptococcus* spp.) que se libera durante la infección y es posible detectarlo en suero. Existen varios ensayos estandarizados para su detección, pero el Fungitell es el más utilizado en nuestro país. Este método parece ser un buen marcador para el diagnóstico de CI y AI por su elevada sensibilidad y especificidad, anticipándose a los resultados positivos de hemocultivo en pacientes con candidiasis invasora (Pfaller & McGinnis, 2009; Pontón, 2009; Otrosky-Zeichner, 2012; Sims *et al.*,

Introducción

2012). Sin embargo, una gran limitación de esta técnica es la definición de puntos de corte para establecer la positividad o negatividad de la prueba ya que podría haber diferencias notables entre géneros y especies de hongos y ello podría interferir con la interpretación de los resultados (Khodadai *et al.*, 2014). Por otro lado, el galactomanano es un componente de la pared celular de *Aspergillus* spp. y otros hongos que puede también puede ser detectado en suero. Su detección puede realizarse mediante diferentes kits comerciales siendo uno de los más utilizados el enzoinmunoensayo (ELISA) comercializado por Bio Rad como Platelia-*Aspergillus*® el cual utiliza un anticuerpo monoclonal de rata dirigido contra el galactomanano de *Aspergillus*. Este ensayo fue aprobado en 2003 por la Food and Drug Administration (FDA) en Estados Unidos como técnica para el diagnóstico de la AI en pacientes adultos. Además, diferentes estudios experimentales en aspergilosis pulmonar invasiva han demostrado una buena correlación de los niveles de galactomanano en suero con la carga fúngica en órganos (Lengerova *et al.*, 2011; Otrosky-Zeichner, 2012). A pesar de que se ha observado que es una técnica bien estandarizada y generalmente se asocia con una alta sensibilidad y especificidad para la AI, se ha observado variabilidad de resultados debido a diversas variables entre los pacientes como son el uso de algunos antibióticos, presencia de otras micosis o trasplante de tumores sólidos.

1.4. Agentes antifúngicos: mecanismos de acción y propiedades farmacocinéticas

Se denominan agentes antifúngicos o antimicóticos a aquellas sustancias capaces de alterar las estructuras de la célula fúngica inhibiendo su proliferación o alterando su viabilidad lo que facilita la eliminación del microorganismo por los sistemas de defensa del huésped. (Odds *et al.*, 2003). Los primeros compuestos con actividad antifúngica que se utilizaron fueron metales pesados como metaloides, derivados azufrados, sulfonamidas o el yoduro potásico que se usaba para combatir la esporotricosis alrededor del 1900. La síntesis de compuestos antifúngicos de uso sistémico se empezó a desarrollar a mitad del siglo XX con la incorporación a finales de los años 50 y principios de los 70 de la anfotericina B, griseofulvina, nistatina y fluocitosina. Durante toda la década de los 90' se incorporaron los primeros triazoles y las formulaciones lipídicas de la anfotericina B. Ya en el siglo XXI aparecieron nuevos triazoles y un nuevo grupo de agentes antifúngicos las equinocandinas (Figura 1).

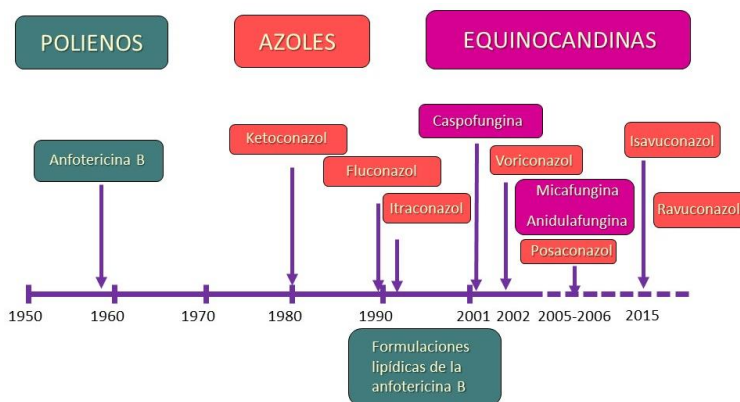


Figura 1. Evolución histórica de los antifúngicos

Introducción

No obstante, el avance en el desarrollo de los fármacos antifúngicos ha sido muy lento a diferencia del de los antibacterianos. La principal dificultad a la hora de diseñar nuevas moléculas antifúngicas es la gran similitud entre las características bioquímicas de las células mamíferas y fúngicas, ambas eucariotas, lo que proporciona una mayor posibilidad de aparición de efectos secundarios y/o tóxicos. Durante la historia se han desarrollado muchos agentes antifúngicos, pero solo unos pocos presentan actividad *in vitro* e *in vivo* y llegan a comercializarse. En algunos casos, no se pueden usar en humanos porque no difunden correctamente por los tejidos, son inactivados por enzimas inducidas o son demasiado tóxicos para el huésped (Lattif & Swindell, 2010). Por otro lado, la existencia de especies resistentes a los fármacos disponibles y la adquisición de resistencia, pone de manifiesto la necesidad de desarrollar nuevas moléculas antifúngicas y opciones terapéuticas. Otra alternativa que se ha ido introduciendo en los últimos años es el uso de las combinaciones de antifúngicos, las cuales pueden llegar a ser más eficaces y proporcionar beneficios frente al uso de las monoterapias, al poder reducir la aparición de aislados resistentes o poder administrar dosis más bajas minimizando la toxicidad asociada a los fármacos (Martin-Vicente *et al.*, 2016).

1.4.1. Clasificación de los antifúngicos

Los antifúngicos pueden clasificarse en base a su estructura química en: polienos, azoles, alilaminas, lipopéptidos, pirimidinas y equinocandinas. Sin embargo, y a pesar de la aparente diversidad de compuestos, el mecanismo de acción de dichas familias de antifúngicos, se limita principalmente a tres dianas presentes en la célula fúngica (Figura 2):

- ❖ El ergosterol o su ruta de síntesis: polienos, azoles y alilaminas
- ❖ Síntesis de ácidos nucleicos: flucitosina
- ❖ Pared celular fúngica: equinocandinas

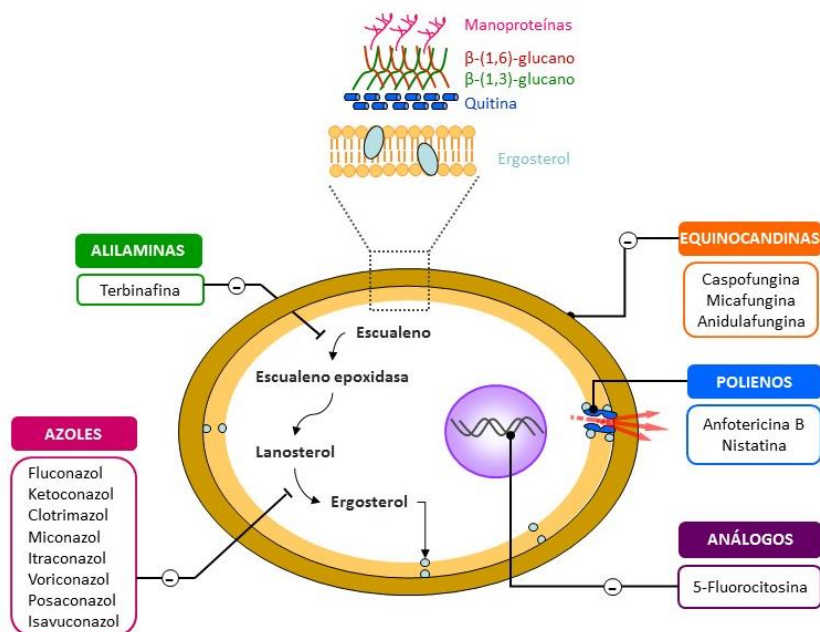


Figura 2. Familias de los principales antifúngicos y mecanismos de acción

1.4.1.1. Polienos

Los polienos son los primeros compuestos antifúngicos que se desarrollaron y comercializaron para uso sistémico y son sintetizados por actinomicetos del género *Streptomyces*. Dentro de este grupo se encuentran la anfotericina B, la nistatina y la natamicina, aunque el compuesto más usado es la anfotericina B sintetizada por *Streptomyces nodosus* y comercializada para su uso clínico en el año 1958 (Fungizona®) (Chandrasekar, 2011). La anfotericina B tiene la

Introducción

capacidad de unirse a los esteroides de las membranas de las células eucariotas, con mucha mayor afinidad al ergosterol de la membrana de los hongos. Como consecuencia de esta fijación se produce una despolarización de la membrana ya que se altera la permeabilidad mediante la formación de un poro. Por lo tanto, actúan como un canal transmembrana que provoca una pérdida de proteínas, glúcidos e iones intracelulares lo cual altera el equilibrio osmótico de la célula y provoca la muerte celular. A pesar de que la anfotericina B está recomendada como tratamiento de referencia para muchas micosis sistémicas, diferentes estudios han reportado su elevada nefrotoxicidad, lo cual se atribuye a la utilización del desoxicolato sódico y fosfato sódico como excipientes (Hsich *et al.*, 1998). Este inconveniente ha llevado a desarrollar otras formulaciones las cuales actualmente permiten administrar mayores dosis de fármaco y presentan menos problemas de toxicidad como son la anfotericina B liposomal, anfotericina B en complejo lipídico y la anfotericina B en dispersión coloidal (Chapman *et al.*, 2011). Sin embargo, las formulaciones lipídicas tienen un alto coste y actúan más lentamente que la formulación convencional. Por ello y a pesar de la nefrotoxicidad observada en la anfotericina B desoxicolato sigue siendo utilizada en la mayoría de las infecciones fúngicas diseminadas.

En cuanto a las características farmacocinéticas de las diferentes formulaciones de la anfotericina B son dispares. La anfotericina B desoxicolato no se absorbe por vía oral, caracterizándose además por una administración intravenosa lenta.

Tabla 3. Características farmacodinámicas de las diferentes formulaciones de la anfotericina B

Parámetro	AMBD Fungizone®	AMBL AmBisome®	ABCL Abelcet®	ABCD Amphotec®
Modo de administración	Intravenosa	Intravenosa	Intravenosa	Intravenosa
Dosis (mg/kg/día)	0,5 - 1	1 - 5	5	3 - 4
Linealidad de dosis	No	No	No	No
C_{max} (mg/L)	1,1 - 2	15 - 80	1,4 - 1,7	2,6 - 2,9
Vd (L/kg)	4	0,15	2,3	0,1-0,12
Unión a proteínas (%)	91 - 95	> 90	> 90	> 90
Eliminación	15 % biliar, <1 % renal, <5 % heces	<5 % renal, <5 % heces	< 1 % renal	-
T_½ (h)	24 - 34	24 - 30	19 - 45	28 - 29
ABC (mg/h/L)	17 - 34	419 - 555	14 - 20	29 - 36
Metabolismo	Parcialmente hepático	-	-	-
Penetración SNC	Baja	Buena	Baja	Baja
Interacciones	Medicamentos nefrotóxicos, Zidovudina, ciclosporina, aminoglucósidos, antineoplásicos corticotropina	Medicamentos nefrotóxicos, aminoglucósidos, ciclosporina, corticosteroides, acetazolamida	Medicamentos nefrotóxicos, zidovudina, ciclosporina	Corticosteroides, clicosporinas, antineoplásicos, tacrolimus, aminoglucósidos, medicamentos nefrotóxicos

Anfotericina B desoxicolato (AMBD); anfotericina B liposomal (AMBL), anfotericina B en complejo lipídico (ABCL) y la anfotericina B en dispersión coloidal (ABCD).

A pesar de que se distribuye bien, no es capaz de penetrar la barrera hematoencefálica. Se une en un gran porcentaje a lipoproteínas del plasma y es metabolizada parcialmente por el hígado. Su excreción se produce mayoritariamente por vía biliar y en menor proporción por

Introducción

vía renal de forma muy lenta. Las formulaciones liposomales facilitan el acceso del fármaco al lugar de la infección, sirven como reservorio del fármaco en la circulación y reducen los efectos adversos. Sin embargo, existen grandes diferencias en la cinética en suero y los perfiles de distribución en los tejidos. En comparación con la anfotericina B desoxicolato, la formulación en complejo lipídico tiene una menor concentración máxima (C_{max}) un menor tiempo de vida medio (T_{1/2}), una pequeña área bajo la curva (ABC) pero un mayor volumen de distribución (V_d) que le permite llegar mejor a los tejidos. En contraste, la anfotericina B liposomal tiene una velocidad de aclaramiento mucho menor en sangre y alcanza una C_{max} y ABC mucho mayor, pero posee un V_d muy pequeño en comparación con la anfotericina B desoxicolato (Torrado *et al.*, 2008; Andes *et al.*, 2006).

1.4.1.2. Flucitosina

La 5-fluorocitosina o flucitosina es el compuesto más representativo dentro de los análogos de precursores de ácidos nucleicos, comercializada al comienzo de la década de 1970. Es una pirimidina fluorada derivada de la citosina que impide la síntesis de ADN o ARN en la célula fúngica, penetrando en el interior de esta a través de una permeasa. La 5-fluorocitosina se convierte por la acción de la citosina desaminasa presente en el hongo en 5-fluorouracilo, el cual se convierte a 5-fluorouridina trifosfato y se incorpora al ARN produciendo errores de codificación e interrumpiendo la síntesis proteica. Además, la 5-fluorocitosina también puede ser convertida en 5-fluorodeoxiuridina monofosfato, inhibidor no competitivo de la timidilato sintetasa, interfiriendo así en la síntesis de ADN y de la división nuclear (Gubbins & Anaissie, 2009).

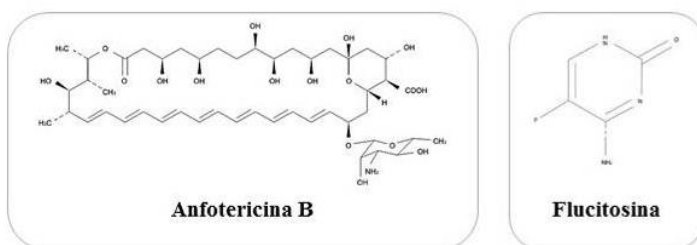


Figura 3. Estructura química de la anfotericina B y la flucitosina

Su espectro de actividad es reducido y no se considera tratamiento de elección para ninguna micosis por su elevada toxicidad y la rápida aparición de cepas resistentes dentro de las especies susceptibles. Ha demostrado ser activa frente a levaduras del género *Candida* o *Cryptococcus*. A pesar de que generalmente es inactiva frente a todos los hongos filamentosos, puede ser utilizado para tratar algunos casos de aspergilosis y cromoblastomicosis en infecciones producidas por cepas sensibles (Perfect *et al.*, 2010). Sin embargo, la mayoría de su uso se encuentra limitado en combinación con otros agentes antifúngicos como la anfotericina B o el fluconazol en el tratamiento de meningitis por *Cryptococcus*.

1.4.1.3. Azoles

Los antifúngicos azólicos o azoles son un grupo de fármacos fungistáticos sintéticos que se caracterizan por poseer un anillo imidazólico que contiene 2 o 3 nitrógenos unidos por átomos de hidrógeno. En función de esta última característica los azoles se dividen en imidazoles (ketoconazol, clotrimazol, miconazol y setaconazol) y triazoles (fluconazol, itraconazol, voriconazol, ravuconazol, posaconazol y albaconazol) respectivamente. Actúan interrumpiendo la síntesis de ergosterol a través de la inhibición de la enzima C-14- α -desmetilasa que forma parte del citocromo P450 y es la responsable de la transformación del lanosterol a ergosterol. Esta inhibición metabólica

Introducción

produce la acumulación de esteroides intermedios que son tóxicos para la célula fúngica, aumentan la permeabilidad de la membrana y pueden inducir la muerte del hongo o la inhibición de su crecimiento. A pesar de que los imidazoles significaron un importante avance en el tratamiento de las infecciones fúngicas, actualmente su uso se limita al tratamiento de las micosis superficiales ya que poseen un espectro de actividad bajo, escasa biodisponibilidad y la aparición de efectos secundarios. Los triazoles son moléculas que poseen el mismo mecanismo de acción que los imidazoles, pero con espectro antifúngico superior, menor toxicidad y más estables metabólicamente.

El **fluconazol** fue aprobado para su uso en la práctica clínica en 1990. Este fármaco es soluble en agua y se puede administrar por vía intravenosa y oral en dosis de 200 - 800 mg/día. Sus excelentes propiedades farmacocinéticas y su escasa toxicidad le han convertido en un fármaco excelente para la prevención y el tratamiento de la infección por *Candida* spp., con excepción de *C. glabrata* y *C. krusei*, y *Cryptococcus* spp (Pfaller *et al.*, 2007b). Sin embargo, carece de acción contra los hongos filamentosos y se ha descrito resistencia intrínseca de *C. krusei* y de un número elevado de cepas de *C. glabrata* (Ruíz-Camps & Cuenca-Estrella, 2009).

El **itraconazol** es un derivado triazólico altamente lipofílico introducido en el tratamiento de las micosis sistémicas en 1992. Presenta un amplio espectro de acción, siendo más activo que el fluconazol frente a la gran mayoría de especies de *Candida*, incluidas aquellas resistentes al fluconazol, destacando también su actividad frente a *Aspergillus* y otros hongos filamentosos (Sabatelli *et al.*, 2006). Se administra por vía oral en capsulas de 200 - 400 mg/día. Sin embargo, sus características farmacocinéticas/farmacodinámicas son

menos favorables que las del fluconazol ya que su absorción es bastante irregular.

El **voriconazol** es un triazol de segunda generación el cual deriva del fluconazol. Además de inhibir la C-14- α -desmetilasa del lanosterol también inhibe la 24-metileno dihidrolanosterol, enzima que se encuentra en pasos posteriores de la vía sintética hacia el ergosterol. Esta característica explicaría la mayor actividad del voriconazol respecto al fluconazol, además de poder atravesar la barrera hematoencefálica. Presenta muy buena actividad frente a todas las especies de *Candida*, incluidas aquellas resistentes al fluconazol. También es activo frente a la mayoría de hongos filamentosos como especies de *Aspergillus*, *Fusarium*, *Scedosporium*, *Acremonium*, etc., sin embargo, los mucorales presentan una resistencia intrínseca a este fármaco. Su administración puede ser por vía oral o por vía intravenosa y se administra a dosis de 200 - 400 mg/12 h (4 - 6 mg/kg) (Walsh *et al.*, 2008). Está indicado como tratamiento de primera elección en AI, en candidemia en pacientes no neutropénicos, en infecciones invasoras graves por *Candida* spp. resistentes al fluconazol y en infecciones graves por *Scedosporium* spp. y *Fusarium* spp. Además, en base a la experiencia clínica algunos autores lo consideran como una opción para el tratamiento empírico inicial de CI por *Candida* spp. en pacientes con neutropenia febril (Nucci *et al.*, 2013; Ullmann *et al.*, 2012).

El **posaconazol** es otro de los triazoles de segunda generación estructuralmente relacionado con el itraconazol. Tiene un espectro de acción mayor que el resto de azoles siendo muy activo tanto frente a levaduras como a la mayoría hongos filamentosos, incluidos algunos mucorales (Ruíz-Camps & Cuenca-Estrella, 2009). Sin embargo, no es activo frente a las especies pertenecientes al género *Fusarium*. Además, también actúa sobre levaduras y especies de *Aspergillus* resistentes al

Introducción

fluconazol. Tiene una gran actividad frente a hongos dimórficos como *C. immitis*, *H. capsulatum*, *B. dermatitidis* y *S. schenckii*. Además, desempeña un importante papel en clínica como tratamiento profiláctico en infecciones invasoras en pacientes inmunocomprometidos y en el tratamiento de la candidiasis orofaríngea (Dolton *et al.*, 2012). Actualmente solamente está disponible por vía oral y se administra en dosis de 800 mg/día en 4 tomas de 200 mg.

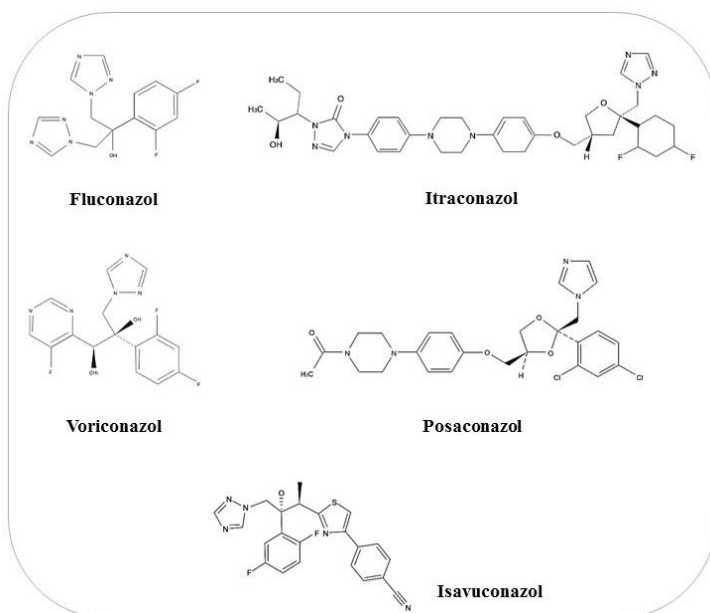


Figura 4. Estructura química de los azoles

El **isavuconazol** es el último triazol aprobado en 2015 por la FDA, el cual se encuentra en fase III de ensayos clínicos y hasta el momento sólo se han encontrado efectos adversos leves. A pesar de que no aparece todavía en las guías de tratamiento se recomienda junto con el voriconazol como tratamiento de primera elección para las aspergilosis y mucormicosis. Diferentes estudios han demostrado que posee un gran espectro obteniendo resultados muy similares a los del voriconazol (Falci & Pasqualotto, 2013; Maertens *et al.*, 2016).

Además, a pesar de que sus interacciones farmacológicas parecen ser similares a las de otros triazoles, presenta unas propiedades farmacocinéticas favorables, las cuales le proporcionan ventajas sobre el resto de componentes del grupo, entre ellos el voriconazol. El isavuconazol presenta un porcentaje de unión a proteínas plasmáticas muy elevado (> 99 %), una rápida absorción oral, una baja excreción urinaria, un metabolismo hepático lento, un elevado Vd y una biodisponibilidad oral del 98 % la cual no se ve afectada por consumo de comida grasa o por el pH. Uno de los puntos más positivos de este fármaco es que no necesita ciclodextrina ya que es altamente soluble en agua y por lo tanto no es necesario realizar un ajuste de la dosis en pacientes con insuficiencia renal. Actualmente está disponible por vía oral e intravenosa y se administra en dosis de 200 mg/día divididos en 3 tomas (día 1 y 2) y una dosis de 200 mg a partir del día 3 de tratamiento (Desai *et al.*, 2016).

Respecto a las propiedades farmacocinéticas de los triazoles más utilizados en clínica, hay que destacar que presentan diferencias significativas, sobretodo en cuanto al porcentaje de unión a proteínas, tiempo de vida medio y biodisponibilidad (Tabla. 4) (Smith & Andes, 2008; Lipp, 2010):

Tabla 4. Características farmacodinámicas de los triazoles

Parámetro	Fluconazol	Itraconazol	Posaconazol	Voriconazol
Modo de administración	Oral / parenteral	Oral / parenteral	Oral	Oral / parenteral
Dosis (mg/kg/día)	400	200 (2 veces al día)	400 (2 veces al día)	200 (2 veces al día)
Linealidad de dosis	Si	No	Si	No
C_{max} (mg/L)	20 - 30	0,25 - 1	0,22 - 1	2 - 3
Vd (L/kg)	0,80	10	5 - 20	2 - 5

Parámetro	Fluconazol	Itraconazol	Posaconazol	Voriconazol
Unión a proteínas (%)	12	99	98-99	58
Eliminación (%)	> 80 % renal 2 % biliar	60 - 70% biliar >5 % renal	77 % heces 15 % renal	> 80 biliar <5 renal
T ½ (h)	30	30 - 42	12 - 24	6 - 9
ABC (mg/h/L)	350 - 412	6 - 15	7,7 - 34	16 - 43
Biodisponibilidad oral (%)	90	55 - 70	60 - 80	95
Metabolismo	Renal	Hepático	Hepático	Hepático
Penetración sistema nervioso central (SNC)	Elevada	Baja	Buena	Buena
Interacciones	Rifampicina, warfarina, cumarina, diuréticos	Antiepilépticos, antibióticos, inhibidores de bombas de H ⁺ , antiretrovirales	Antiepilépticos, inhibidores de bombas de H ⁺ , motilidad gástrica	Antiepilépticos, antibióticos, antiretrovirales, rifampicina, carbamazepina y fenobarbital sirolimus

1.4.1.4. Equinocandinas

Las equinocandinas constituyen el grupo más reciente de antifúngicos comercializado el cual posee muy buena toxicidad selectiva que permite su utilización a dosis elevadas con pocos efectos adversos sobre los pacientes. Son lipopéptidos (hexapéptidos) semisintéticos cíclicos anfifílicos con una cadena lateral aminoacil-lipídica, producidos mediante síntesis química a partir de derivados sintetizados por *Glarea lazayensis* (Gobernado & Cantón, 2008; Eschebauer et al., 2007). Estos antifúngicos, actúan inhibiendo de forma no competitiva e irreversible la 1,3-β-D-glucano sintasa, enzima responsable de la síntesis del 1,3-β-D-glucano. Este polisacárido se encuentra en la pared celular de la mayoría de hongos patógenos y es el responsable junto con la quitina de la morfología y rigidez de la pared, y por tanto de la integridad osmótica, crecimiento y división de la célula

(Pastor & Guarro, 2005). Debido a que la glucano sintasa no se encuentra en las células mamíferas, se considera que es una buena diana de acción. Además, la pobre o nula metabolización de estos fármacos por los enzimas del sistema CYP450, explican probablemente su baja toxicidad, su excelente tolerancia y las escasas interacciones con otros antifúngicos tales como los azoles. Actualmente, existen 3 equinocandinas aprobadas por la FDA (Food and Drug Administration).

Los compuestos de esta familia antifúngica se diferencian entre ellos en la cadena lateral acil-lipídica que poseen, que es la que les confiere diferentes propiedades físico-químicas, y la que se introduce en la bicapa lipídica de la membrana celular fúngica. La **caspofungina** fue la primera equinocandina comercializada y deriva de una neumocandina B extraída a partir de caldos de cultivo de *Glarea lozoyensis*. En 2005 se desarrolló la **micafungina** a partir de un hexapéptido producido por *Coleophoma empedra* y por último la **anidulafungina** comercializada para su uso en 2006 y sintetizada por *A. nidulans* (Gobernado & Cantón, 2008; Eschebauer, 2007).

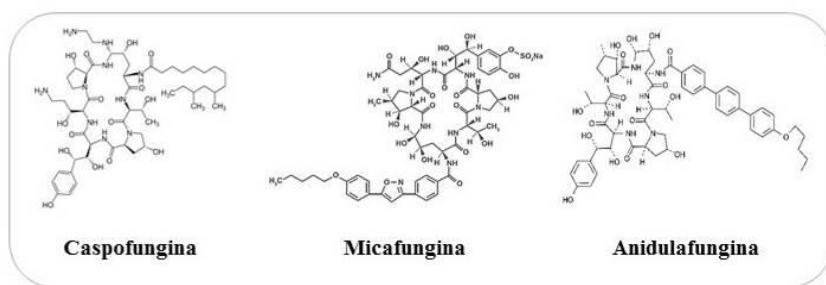


Figura 5. Estructura química de las equinocandinas

Las tres equinocandinas poseen un gran espectro antifúngico frente a especies del género *Candida* y *Aspergillus*, así como frente a hongos dimórficos como *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis* y *Coccidioides immitis* (Zaragoza & Pemán, 2012). Ejercen

Introducción

actividad fungicida frente a *Candida* spp., y inducen el crecimiento anormal de las hifas en *Aspergillus* spp.

Estos antifúngicos poseen características farmacocinéticas muy similares (Tabla 5).

Tabla 5. Características farmacodinámicas de las equinocandinas

Parámetro	Caspofungina	Micafungina	Anidulafungina
Modo de administración	Parenteral	Parenteral	Parenteral
Dosis (mg/kg/día)	Dosis de carga de 70 y mantenimiento de 50 diarios	100 - 200	Dosis de carga de 200 y mantenimiento de 100 diarios
Linealidad de dosis	Si	Si	Si
C_{max} (mg/L)	9,9 - 12	7 - 10,1	7 - 8,2
Vd (L/kg)	0,3	0,39	0,56
Unión a proteínas (%)	96 - 97	> 99	> 99
Eliminación (%)	35 % heces, < 2 % renal	70 % heces, < 15 % renal	> 90 % Heces, < 1 % renal
t_{1/2} (h)	9 - 11	10 - 17	25 - 26,5
ABC (mg/h/L)	75 - 96	103 - 167	110 - 111
Metabolismo	Hepático	Hepático	Degradación química
Penetración SNC	Baja	Baja	< 1 %
Interacciones	Ciclosporina, Rifampicina, EFV, NVP, CBZ, DXM, FNT Tacrolimus	Monitorizar ciclosporina. Vigilar nifedipina	Ninguna significativa

Tienen una escasa biodisponibilidad oral y una cinética lineal tras la administración endovenosa. La degradación de las equinocandinas se lleva a cabo principalmente por el hígado por mecanismos de hidrólisis y amino-acetilación exepuando la anidulafungina la cual es degradada por vía química. Presentan escasas

interacciones con otros fármacos y una vida media prolongada lo que permite dosificaciones diarias (Smith & Andes, 2008; Eschenauer, 2007; Andes *et al.*, 2010).

1.4.2. Determinación de la actividad antifúngica

Las pruebas de sensibilidad *in vitro* a los antifúngicos constituyen una herramienta importante para la predicción del éxito o fracaso terapéutico y por lo tanto suponen el punto de partida para la elección del fármaco. Actualmente existen dos métodos estandarizados de referencia basados en el método de microdilución en caldo para estudiar la sensibilidad *in vitro* de los antifúngicos frente a las levaduras y hongos filamentosos de mayor importancia clínica. Uno ha sido desarrollado por el Clinical Laboratory Standards Institute en Estados Unidos y el otro por el European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing (EUCAST) perteneciente a la Sociedad Europea de Microbiología Clínica y Enfermedades Infecciosas (ESCMID). Ambas metodologías son las más empleadas para realizar las pruebas de sensibilidad y mediante ellas podemos obtener la concentración mínima inhibitoria (CMI) que corresponde a la mínima concentración de antifúngico capaz de inhibir el crecimiento del hongo (Cantón *et al.*, 2007). Diferentes estudios han constatado que existe una buena correlación entre los resultados obtenidos por ambos métodos a pesar de que existen ligeras diferencias en la metodología como por ejemplo la sustitución de la lectura visual por la espectrofotométrica y la reducción del tiempo de lectura de 48 a 24 h por el EUCAST. Estas pruebas son útiles ya que permiten detectar la aparición de cepas resistentes, realizar estudios epidemiológicos y comparar la susceptibilidad de nuevos agentes antifúngicos con los ya existentes. En 1985, el CLSI (Clinical and Laboratory Standards Intitute) antes llamado NCCLS (National

Introducción

Commite of Clinical Laboratory Standards) realizó una encuesta a diferentes laboratorios pertenecientes a los hospitales de Estados Unidos con la finalidad de conocer que pruebas de sensibilidad realizaban y la metodología empleada y observó una gran variabilidad de los datos obtenidos entre los pocos laboratorios que realizaban este tipo de pruebas además de la utilización de una metodología muy diferente. Durante los años siguientes el CLSI creó subcomités para la redacción de propuestas de métodos estandarizados tanto de microdilución en caldo como disco difusión para levaduras y para hongos filamentosos incluyendo cepas de control de calidad que aseguran la validez de los resultados. Actualmente disponemos del método de microdilución en caldo estandarizado (documento M27-A3; CLSI, 2008) para realizar las pruebas de sensibilidad frente a levaduras, y frente a hongos filamentosos (documento M38-A2; CLSI 2008) que ya incorpora además métodos para determinar la actividad contra dermatofitos y guías para las equinocandinas, los últimos fármacos comercializados hasta el momento. Además, también se han desarrollado otros métodos comerciales más sencillos y rápidos para el estudio de la sensibilidad *in vitro* con el objetivo de agilizar el trabajo rutinario en el laboratorio clínico como es el método de difusión en disco (documento M44-A), de difusión en agar (documento actual aprobado M51-A, 2010), el Etest, Sensititre YeastOne o Vitek-2.

1.5. Modelos experimentales *in vivo* para la evaluación de la eficacia antifúngica

A pesar de que los estudios *in vitro* aportan información acerca de los patrones de sensibilidad de los hongos, es necesario establecer una correlación de los estudios con la práctica clínica. Sin embargo, en muchos casos la escasa experiencia clínica impide establecer

recomendaciones terapéuticas para el manejo de la mayoría de infecciones fúngicas oportunistas. Para suplir esta deficiencia, los modelos *in vitro* son útiles para determinar la eficacia de fármacos en desarrollo (fase preclínica) así como para evaluar la eficacia de tratamientos experimentales. Además, aportan información acerca de los patrones de resistencia y sensibilidad frente a los hongos lo que nos van a permitir seleccionar aquellos productos más activos frente a una infección determinada. Gracias al uso de los modelos *in vivo* podemos realizar estudios de correlación *in vitro* - *in vivo* y así poder establecer una mejor predicción para posteriores resultados clínicos en humanos. El uso de animales de laboratorio representa una herramienta fundamental en las investigaciones biomédicas, siendo el ratón el modelo animal más utilizado para estudios de patogénesis, virulencia, inmunología, diagnosis y terapia antifúngica, entre otros. El ratón es considerado un modelo animal ya que posee un corto tiempo generacional, bajo coste y fácil mantenimiento y manejo. El uso de modelos animales ofrece una importante ventaja ya que es posible controlar las variables del experimento y se puede trabajar a partir de grupos homogéneos, siendo controladas más fácilmente las condiciones externas que en los ensayos clínicos en humanos (Clemons & Stevens, 2006). Una ventaja importante del modelo animal es que permite examinar nuevas indicaciones y tratamientos de manera oportuna, además del uso de un número suficiente de animales para generar resultados estadísticamente válidos y objetivos. Además, también son ampliamente utilizados para conocer las propiedades farmacocinéticas de los nuevos compuestos, estudiar combinaciones de fármacos y dosis, lo cual es imposible realizarlo en la clínica humana. La eficacia de las terapias antifúngicas se puede evaluar mediante la prolongación de la supervivencia de los animales infectados, la reducción de la carga fúngica detectable en los órganos, la reducción del tamaño de las

heridas en infecciones cutáneas, estudios histopatológicos, así como la cuantificación de determinados antígenos, tales como el galactomanano y β -glucanos.

1.6. Correlación *in vitro* - clínica

Aunque la determinación de las CMI de los antifúngicos frente a los hongos puede ser de utilidad a la hora de orientar al clínico y poder establecer un tratamiento con más posibilidades de éxito, no siempre se observa una buena correlación entre los datos *in vitro* e *in vivo*. Es muy difícil predecir el éxito terapéutico basándose en los valores *in vitro* ya que existen muchos otros factores tanto en el huésped como de los propios fármacos que juegan un papel crucial en la evolución del tratamiento. Como se ha mencionado anteriormente, un aspecto importante a tener en cuenta son los parámetros PD/PK de los antifúngicos ya que como se ha visto en diferentes estudios experimentales en modelos animales la correlación entre estos y las CMI proporciona conocimientos que permiten mejorar la pauta de dosificación, conocer las concentraciones séricas alcanzadas y posibles interacciones con otros fármacos. Sin embargo, la aplicación de estos parámetros no ha proporcionado grandes avances predictivos en clínica ya que por ejemplo otros factores como el estado del paciente o la variabilidad interpersonal de los parámetros PD/PK de muchos antifúngicos hace que en muchas ocasiones no se alcancen concentraciones plasmáticas de antifúngicos por encima de las CMI lo que puede desenlazar en fallo del tratamiento. A pesar de todo esto, las pruebas de sensibilidad junto con la aparición de los métodos moleculares son útiles ya que permiten poder detectar las posibles resistencias y caracterizarlas molecularmente lo cual optimiza la terapia antifúngica. Además, en los últimos años tanto el EUCAST como el CLSI han desarrollado estudios para poder detectar el perfil de

sensibilidad de las especies y así poder detectar la aparición de posibles mutaciones frente a los antifúngicos. Para ello ha sido necesario recopilar datos clínicos acerca de los valores de CMI de los fármacos para una determinada especie fúngica y estudiar la distribución de las CMI mediante estudios estadísticos. En ese sentido, se han ido estableciendo PCCs los cuales se definen como concentración de un antifúngico que clasifica los aislados en sensibles a aquellos que pueden responder al tratamiento (CMI por debajo del PCC) y en resistentes a aquellos con una CMI por encima del PCC y los cuales no responderán al tratamiento. Por tanto, el uso de estos datos puede de ser de ayuda ya que la resistencia *in vitro* predice el fracaso terapéutico. Además, para calcular los puntos de corte clínicos los expertos se basan en la regla 60 - 90 la cual indica que infecciones debidas a aislados sensibles responden a la terapia antifúngica el 90% de las veces, y que infecciones debidas a aislados resistentes (o bien tratados con un antifúngico inapropiado) responden al tratamiento alrededor de un 60 % de las veces (Rex & Pfaller, 2002). Por otro lado, se han establecido puntos de corte epidemiológicos (PCEs) los cuales se consideran que son la medida más sensible para detectar cepas con susceptibilidad reducida a un agente determinado. Se definen como la concentración más elevada de antifúngico que separa la población salvaje (WT) (sin ningún mecanismo de resistencia) de los aislados que pueden tener o tienen algún mecanismo de resistencia, no pertenecientes a la población salvaje (non-WT) (Espinel-Ingroff *et al.*, 2014). Las cepas con una CMI menor que el PCE se clasifican como cepas con una sensibilidad disminuida frente al antifúngico en cuestión, sin embargo, su relevancia clínica no es mucha y delante de una infección los aislados que seguramente van a responder al tratamiento son aquellos con una CMI menor que el PCC.

1.7. Mecanismos moleculares de resistencia a los antifúngicos

El incremento de las infecciones fúngicas oportunistas durante las últimas décadas, junto con la aparición de resistencias a los diversos antifúngicos disponibles presenta implicaciones importantes en la morbilidad y la mortalidad de las micosis como consecuencia de las altas tasas de fallo terapéutico. La resistencia *in vitro* a los antifúngicos puede dividirse en primaria (intrínseca o innata) la cual sería la que presenta el microorganismo de forma natural sin exposición previa al antifúngico (por ejemplo *C. krusei* frente al fluconazol) y la secundaria (adquirida) que es la que aparece cuando un microorganismo inicialmente sensible adquiere resistencia después o durante la exposición a un agente antifúngico y que usualmente depende de la alteración de la expresión de determinados genes (Kanafani & Perfect, 2008; Kolaczowska & Kotaczkowski, 2016). Además, la resistencia adquirida frente un antifúngico puede ir acompañada de resistencia cruzada a todo el grupo de antifúngicos de una misma clase, como ocurre en el caso de los azoles, o también frente a los representantes de varios grupos no relacionados estructuralmente (resistencia múltiple). Cada vez se están reportando más especies con resistencia intrínseca i adquirida a múltiples fármacos como por ejemplo *C. glabrata* o *C. krusei*, lo cual dificulta el tratamiento de infecciones por este tipo de patógenos. Los principales mecanismos descritos de resistencia a los diferentes agentes antifúngicos son (Tabla 6):

Tabla 6. Dianas y mecanismos de resistencia de los antifúngicos

Antifúngico	Diana	Mecanismo de resistencia
Flucitosina	Timidilato sintasa	Fallo en la transformación de la flucitosina en metabolitos activos
Polienos	Ergosterol	Sustitución del ergosterol por otros esteroides, disminución del contenido en ergosterol o aumento en la actividad catalasa, mutaciones en <i>ERG3</i>
Triazoles	Lanosterol C-14- α -desmetilasa acoplada al citocromo P-450	Mutaciones que modifican la diana (<i>ERG11</i>), sobreexpresión <i>ERG11</i> , alteraciones en la ruta de biosíntesis del ergosterol (mutaciones <i>ERG3</i>), alteraciones en el transporte del fármaco (genes <i>CDR1/CDR2</i> y <i>MDR1/MDR2</i>)
Equinocandinas	β -1,3 glucano sintasa (<i>FKS1</i>)	Mutaciones en <i>FKS1</i> y <i>FKS2</i>

Por otro lado, existe la resistencia clínica que es aquella que aparece cuando el fracaso del tratamiento antifúngico no se asocia con una disminución de la sensibilidad *in vitro*. Estos fallos en la terapia pueden atribuirse a una combinación de factores, tanto relacionados con el huésped (estado inmunitario, presencia de catéteres intravasculares o prótesis infectadas), el patógeno (virulencia) o el antifúngico (farmacocinética, interacciones farmacológicas, etc.).

2. INTERÉS Y OBJETIVOS DEL ESTUDIO

2. Interés y objetivos del estudio

Durante las últimas décadas, el aumento de las infecciones fúngicas invasoras (IFI) producidas por hongos oportunistas se ha relacionado directamente con el incremento de pacientes inmunocomprometidos, pudiendo causar estos agentes un gran número de afectaciones dependiendo del lugar donde se produce la infección y del tipo de paciente. Sin embargo, a pesar del tratamiento quirúrgico y las diferentes terapias antifúngicas disponibles, estas micosis invasoras siguen causando un alto porcentaje de mortalidad sobretodo en pacientes con factores de riesgo. Las opciones terapéuticas están lejos de ser las óptimas ya que se tiene poco conocimiento acerca del mecanismo patogénico y de la terapia adecuada para un número importante de hongos emergentes responsables de graves enfermedades en pacientes susceptibles. En base a todo lo expuesto, **el principal objetivo en la presente tesis doctoral ha sido contribuir al desarrollo de nuevos tratamientos experimentales o a la mejora de las terapias ya existentes frente a infecciones fúngicas invasoras causadas por hongos oportunistas emergentes de relevancia clínica.**

Las especies del género *Candida* son los principales agentes causales de infecciones nosocomiales oportunistas siendo *Candida albicans* la especie más frecuentemente implicada. Sin embargo, se está produciendo un aumento en la incidencia en clínica de especies no-*albicans* como *C. guilliermondii*, *C. lusitaniae*, *C. glabrata*, *C. kefyr* y *C. rugosa*. En la actualidad, las recomendaciones para el tratamiento de la candidiasis invasiva (CI) en pacientes neutropénicos incluyen el uso de las equinocandinas y formulaciones lipídicas de la anfotericina B, considerándose el fluconazol como terapia alternativa, sin embargo, no existen recomendaciones específicas para el tratamiento de infecciones causadas por estas levaduras.

Candida guilliermondii presenta una baja actividad *in vitro* frente a las equinocandinas y flucozanol, pero existen pocos datos clínicos y experimentales que evalúen la eficacia de estas terapias. Dado la menor sensibilidad de esta especie a los tratamientos de elección y a la escasez de datos terapéuticos, es necesario la exploración de tratamientos para poder realizar una aproximación en el establecimiento de una terapia para combatir dichas infecciones. Asimismo, *C. lusitaniae* es otro patógeno humano emergente el cual posee un perfil de susceptibilidad antifúngica muy particular. A pesar de que normalmente es sensible *in vitro* a todos los antifúngicos, *in vivo* se ha observado resistencia a la anfotericina B, fluconazol o caspofungina. Debido a que no existe un tratamiento óptimo para tratar las infecciones causadas por estas especies, los objetivos en estos trabajos fueron:

- ❖ Determinar las curvas de mortalidad y la actividad *in vitro* de posaconazol y voriconazol frente a *C. guilliermondii* y *C. lusitaniae*.
- ❖ Evaluar la eficacia *in vivo* de ambos fármacos en un modelo murino de infección causada por diferentes cepas de cada una de las dos especies.

En el caso de *C. glabrata* se está produciendo un incremento en el número de aislados clínicos multiresistentes a la mayoría los antifúngicos disponibles, entre ellos los de primera línea como las equinocandinas y el fluconazol. El voriconazol ha demostrado tener buena eficacia en clínica en otro tipo de infecciones y algunos autores lo consideran una opción como tratamiento empírico inicial en pacientes neutropénicos febriles. A pesar de que éste fármaco ha demostrado muy buena eficacia en infecciones experimentales en ratón causadas por otras especies, no existen datos en infecciones causadas por *C. glabrata*. Por ello, uno de los objetivos de la presente tesis ha sido determinar la eficacia del voriconazol en un modelo murino experimental de infección diseminada por cepas con diferentes

Interés y objetivos del estudio

sensibilidades *in vitro* de *C. glabrata* y analizar si existe relación entre la eficacia y la CMI. Concretamente:

- ❖ Determinar la sensibilidad *in vitro* de 27 cepas de *C. glabrata* frente al voriconazol mediante el método de microdilución.
- ❖ Evaluar de la eficacia del tratamiento con voriconazol en un modelo de infección diseminada por *C. glabrata*.
- ❖ Evaluar si los valores obtenidos de actividad *in vitro* del voriconazol pueden ser predictivos de la eficacia *in vivo* en el tratamiento de infecciones en el ratón neutropénico causadas por cepas de dicho hongo con diferentes grados de sensibilidad a este fármaco.
- ❖ Analizar el valor indicativo del punto de corte epidemiológico del voriconazol para detectar posibles mecanismos de resistencia presente en los aislados.

A pesar de que se ha observado una buena actividad de todos los antifúngicos disponibles frente a *C. kefyr*, para la anfotericina B algunos autores han reportado elevadas concentraciones mínimas inhibitorias. Además, la experiencia clínica y experimental es escasa y los datos obtenidos en pacientes infectados por *C. kefyr* son contradictorios ya que se han observado variabilidad de resultados en el tratamiento. Por tanto, dado la escasez de información y la ausencia de recomendaciones específicas para el tratamiento de infecciones causadas por esta levadura, en esta tesis nos planteamos:

- ❖ Determinar las curvas de mortalidad para la anfotericina B, fluconazol y caspofungina frente a dos aislados clínicos de *C. kefyr*.
- ❖ Evaluar la eficacia *in vivo* cada uno de los fármacos anteriores en un modelo murino de infección diseminada por este hongo mediante estudios de supervivencia, carga fúngica en riñón y determinación de las concentraciones séricas de fármaco y β -D-glucano.

Diutina (Candida) rugosa es sensible *in vitro* a anfotericina B y los azoles, sin embargo, los datos acerca de las equinocandinas son variables. A pesar de que la experiencia clínica es escasa, no se han obtenido buenos resultados con la anfotericina B y el desenlace con fluconazol fue favorable. Sin embargo, no existen datos experimentales ni experiencia clínica acerca de la eficacia de las equinocandinas y por ello nuestros objetivos específicos en este estudio fueron:

- ❖ Evaluar mediante curvas de mortalidad la actividad *in vitro* de la anidulafungina y la caspofungina frente a dos aislados clínicos de *D. rugosa*.
- ❖ Evaluar la eficacia de ambos fármacos en el tratamiento de la infección diseminada causada por esta levadura en ratones neutropénicos.

El tratamiento de elección para las AI en pacientes neutropénicos se basa en el uso del voriconazol, a pesar de que se está observando un aumento notable en el número de aislados resistentes a este fármaco. A pesar de que *Aspergillus fumigatus* es el agente causal más común de aspergillosis invasoras (AI), en los últimos años se está incrementando la incidencia de especies *Aspergillus no-fumigatus* como *A. terreus*. Las infecciones por *A. terreus* tienen especial interés en clínica debido a su resistencia intrínseca a antifúngicos convencionales como la anfotericina B y el alto porcentaje de aspergilosis causadas por aislados clínicos con resistencia adquirida al voriconazol (Pastor & Guarro, 2014).

- ❖ Determinar las curvas de mortalidad y la actividad *in vitro* de la anidulafungina frente a *A. terreus*.
- ❖ Desarrollar un modelo experimental de infección diseminada por dicha especie para evaluar la eficacia de este fármaco

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3. Materiales y métodos

3.1. Origen y conservación de las cepas

La mayoría de los aislados utilizados en la presente Tesis Doctoral fueron facilitados por el Fungus Testing Laboratory (FTL) del Department of Pathology de la University of Texas Health Science Center de San Antonio (UTHSCSA), Estados Unidos y por el JMI Laboratories de North Liberty, Iowa, Estados Unidos (JMI). Todas las cepas se encuentran conservadas en la colección de la Unitat de Microbiologia de Facultat de Medicina i Ciències de la Salut de Reus (FMR), Universitat Rovira i Virgili, Reus, Tarragona, Spain. Las cepas se conservaron a temperatura ambiente en tubos de agar inclinado, en tubos de agar inclinado cubierto de vaselina, liofilizadas y en tacos de agar de 5 mm³ sumergidos en agua destilada estéril.

3.2. Estudios *in vitro*

3.2.1. Cepas

Para realizar las pruebas de sensibilidad *in vitro* a los antifúngicos, se ensayaron un total de 57 cepas correspondientes a seis especies de hongos oportunistas de interés clínico (Tabla 7).

Tabla 7. Número de aislados utilizados en los estudios *in vitro* y su origen

Especie	Colección	Nº de cepas
<i>Aspergillus terreus</i>	FMR	9
<i>Candida guilliermondii</i>	UTHSCSA	2
<i>Candida lusitanae</i>	FMR	2
	UTHSCSA	2
<i>Candida kefyr</i>	FMR	2
<i>Diutina rugosa</i>	UTHSCSA	2
<i>Candida glabrata</i>	FMR	1
	JMI	19
	UTHSCSA	18

FMR, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, Reus, España

UTHSCSA, University of Texas Health Science Center, San Antonio, Texas, EUA

JMI, JMI Laboratories, North Liberty, Iowa, EUA

3.2.2. Compuestos antifúngicos

Se ensayó la sensibilidad de un total de 6 antifúngicos con el fin de determinar su concentración mínima inhibitoria (CMI) o concentración mínima efectiva (CME) sobre las especies fúngicas indicadas anteriormente. En la Tabla 8 se muestran todos los fármacos utilizados con sus respectivas procedencias, purezas y disolventes.

Tabla 8. Antifúngicos ensayados en los estudios de sensibilidad *in vitro*

Antifúngicos	Procedencia	Pureza	Disolvente
Anfotericina B	Sigma Chemical Co. St. Louis, EUA	80 % ^b	DMSO
Posaconazol	Schering-Plough Res.,Inst., NJ, EUA	98 % ^a	DMSO
Fluconazol	Pfizer Inc., Madrid, España	82,4 % ^a	Agua
Voriconazol	Pfizer Inc., Madrid, España	100 % ^a	DMSO
Anidulafungina	Pfizer Inc., Madrid, España	82,4 % ^c	DMSO
Caspofungina	Merk & Co ., Inc., Rahway, EUA	100 % ^b	Agua

Dimetilsulfóxido (DMSO; formulación química: CH₃SOCH₃), ^a Conservación a temperatura ambiente, ^b Conservación a 4 °C, ^c Conservación a -20 °C.

3.2.3. Estudios de la sensibilidad antifúngica: método de microdilución en caldo

3.2.3.1. Metodología

Para determinar la sensibilidad de los diferentes antifúngicos (Tabla 8) frente a las especies fúngicas seleccionadas (Tabla 7), se utilizó el método de microdilución en caldo estandarizado por el CLSI. Para las levaduras se siguió el procedimiento descrito en el documento M27-A3 (CLSI, 2008a) y para hongos filamentosos el documento M38-A2 (CLSI, 2008b). A continuación, se detallan los pasos del método:

Materiales y métodos

❖ Preparación de la solución madre y del gradiente de concentraciones de las microplacas de antifúngicos:

Para obtener una solución stock, se pesó la cantidad suficiente de polvo para obtener una concentración inicial 10 (antifúngicos solubles en agua) o 100 veces mayor (antifúngicos insolubles) a la concentración más alta a ensayar. A partir de la solución madre se realizaron diluciones dobles seriadas, diluyendo cada antifúngico en dimetil sulfóxido (DMSO) o en H₂O destilada estéril (Tabla 8) acorde con las instrucciones del fabricante (Figura 6).

A continuación, a partir de cada uno de los tubos obtenidos se realizaron diluciones 1:5 en RPMI, en el caso de antifúngicos solubles en agua, o 1:50 en DMSO para aquellos insolubles en agua (Figura 6). Se dispensaron 100 μ L de cada dilución resultante a una placa de microdilución de 96 pocillos y fondo cóncavo.

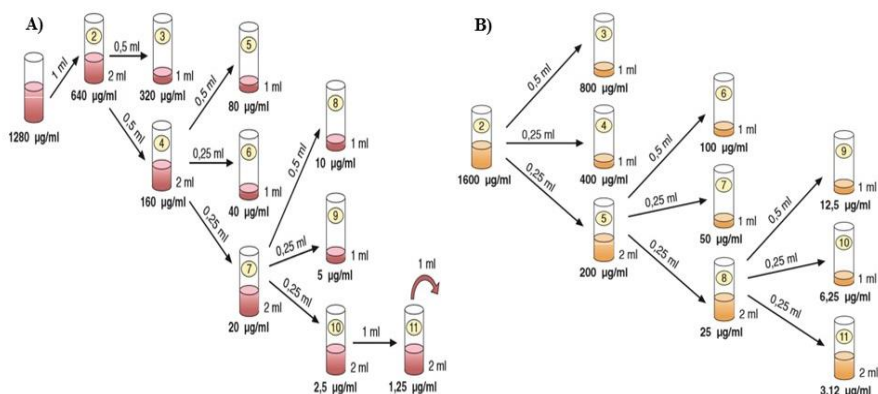


Figura 6. (A) Esquema para las diluciones de antifúngicos solubles en agua, diluyente RPMI 1640. (B) esquema para las diluciones de antifúngicos insolubles en agua, diluyente dimetil sulfóxido.

Las concentraciones de antifúngico ensayadas fueron: de 0.03 a 16 µg/mL en el caso de la anfotericina B, el fluconazol, el voriconazol, el posaconazol, la caspofungina y la anidulafungina. Además, en el caso de la anidulafungina frente a *A. terreus* el rango de concentraciones a evaluar fue de 0.0015 a 2 µg/mL. Los bancos de diluciones se dispensaron en filas en la microplaca, reservando los últimos dos pocillos como control de crecimiento y control de esterilidad. Una vez finalizada la preparación de las microplacas se cubrieron con una lámina adhesiva para evitar la evaporación y se guardaron a -20 °C durante un máximo de seis meses.

* El RPMI 1640 es un medio sintético con glutamina y sin bicarbonato sódico (Gibco, ICN, Oxoid, Sigma), tamponado con ácido morfolino propano sulfónico (MOPS) 0,164 M (ICN, Sigma), ajustado a pH $7 \pm 0,1$ y con 0,2 % de glucosa.

❖ Preparación de los inóculos:

A) Levaduras: En el caso de *C. guilliermondii*, *C. lusitaniae*, *C. kefyi*, *D. rugosa* y *C. glabrata*, las cepas conservadas se subcultivaron en placas de PDA (PDA; Pronadisa, Madrid, Spain) y se incubaron durante 24 - 48 h a 35 °C. El día del ensayo los inóculos fueron preparados suspendiendo dos o tres colonias en un tubo con solución salina fisiológica estéril. La suspensión fue ajustada mediante recuento con la cámara de Neubauer a 1×10^6 - 5×10^6 células/mL, luego se diluyó 1:50 en agua y finalmente se realizó una dilución 1/20 en RPMI.

B) Hongos filamentosos: las cepas conservadas de *Aspergillus terreus* se subcultivaron en placas de PDA (Pronadisa, Madrid, Spain) hasta su esporulación y durante 7 días a 30 °C. Para la preparación del inóculo, con la ayuda de un asa de siembra se procedió a rascar la superficie de la placa, arrastrando parte de la colonia del hongo en

Materiales y métodos

crecimiento. La masa obtenida, que contenía hifas, conidios y fragmentos del medio, se traspasó a un tubo con 10 mL de agua destilada estéril. Después de homogeneizar, la solución se filtró a través de una gasa estéril, para obtener una suspensión final constituida únicamente por conidios. La suspensión se ajustó en cámara de Neubauer a 0.4×10^6 - 5×10^6 células/mL, según indica el CLSI en el documento M38-A2 y se realizó una dilución 1:50 en medio RPMI.

❖ Inoculación e incubación de las placas:

Las microplacas se descongelaron a temperatura ambiente en el momento se inocularlas y se dispensaron 100 μ L de inóculo final indicado anteriormente tanto en el caso de levaduras como de hongos filamentosos en cada pocillo, con excepción del correspondiente al control de esterilidad del medio. Siguiendo las directrices de los documentos estandarizados del CLSI (M38-A2 para hongos filamentosos y M27-A3 para levaduras), las microplacas se incubaron a 35 °C durante 24 - 48 h dependiendo del género estudiado. La concentración y la viabilidad de los inóculos se verificaron sembrando 10 μ l en el caso de las levaduras o 100 μ L para los hongos filamentosos de las diluciones 1:1000 y 1:10000 de los mismos en placas de PDA. Además, siguiendo las recomendaciones de los documentos estandarizados, en cada ensayo se incluyeron las cepas de control *Candida parapsilosis* ATCC 22019 o *Aspergillus fumigatus* ATCC MYA-3626.

3.2.3.2. Lectura e interpretación de los resultados

La lectura de las microplacas inoculadas se realiza de forma visual con ayuda de un espejo invertido. En primer lugar, se realizó una lectura de las CMI de las cepas control de calidad para verificar que los valores de sensibilidad obtenidos para todos los antifúngicos estaban

dentro del rango previamente descrito por el CLSI. Una vez realizado esto y dependiendo del hongo y el antifúngico evaluado, las lecturas se realizaron siguiendo diferentes criterios:

❖ **Levaduras:** en el caso de los hongos levaduriformes se determinó la CMI para el voriconazol, el posaconazol, el fluconazol, la anfotericina B, la anidulafungina y la caspofungina. Siguiendo el protocolo del CLSI en el caso de los azoles y las equinocandinas se utilizó como criterio de lectura la CMI-50 que es la concentración más baja de antifúngico que produce una reducción del 50 % del crecimiento de la levadura comparado con el control positivo después, mientras que en el caso de la anfotericina B la CMI es la concentración más baja que produce una reducción del 100 % del crecimiento.

❖ **Hongos filamentosos:** para anidulafungina frente a *A. terreus*, se determinó la CME (concentración mínima efectiva) que se define como la menor concentración de antifúngico que produce un crecimiento aberrante del hongo con formaciones redondeadas y compactas en comparación con el crecimiento algodonoso observado en el control a las 24 h.

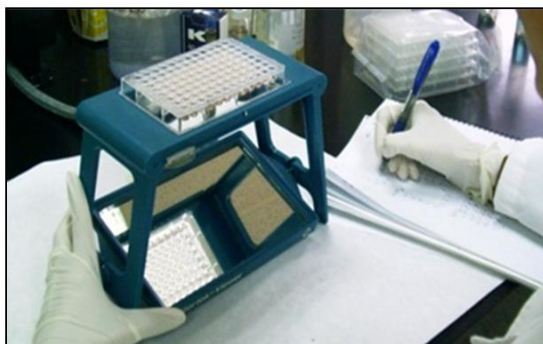


Figura 7. Espejo invertido utilizado para la lectura de concentraciones mínimas inhibitorias.

3.2.4. Curvas de mortalidad-tiempo

Las curvas de mortalidad o letalidad-tiempo son estudios cinéticos *in vitro* que proporcionan información importante acerca de la acción de un antifúngico sobre un microorganismo. Se determina la capacidad de reducir el crecimiento de un hongo enfrentándolo a distintas concentraciones fijas de fármaco en relación con el tiempo. En esta tesis doctoral, dependiendo del estudio realizado se determinaron las curvas de mortalidad para la anidulafungina, caspofungina, anfotericina B, fluconazol, posaconazol y voriconazol, siguiendo los protocolos descritos previamente (Klepser *et al.*, 1998; Cantón *et al.*, 2006, 2013). Se prepararon tubos con diferentes concentraciones del antifúngico a evaluar (0,03 - 32 $\mu\text{L}/\text{mL}$ para los azoles, caspofungina, anidulafungina y la anfotericina B, además de 0,008 - 32 $\mu\text{L}/\text{mL}$ para la anidulafungina frente *A. terreus*) diluyéndolo en RPMI 1640, exceptuando el tubo control que solo contuvo RPMI 1640 sin antifúngico (control). Seguidamente se realizó un recuento de esporas del hongo a estudiar con la cámara de Neubauer y se preparó una suspensión con una concentración de 5×10^6 células/mL. Cada uno de los tubos con y sin antifúngico se inóculo con 1 mL de la suspensión de hongo y se tomó una alícuota a tiempo 0 del tubo control. Posteriormente todos los tubos se incubaron a 35 °C durante 2, 4, 6, 8, 24 y 48 h las levaduras y 4, 8, 24 y 48 *A. terreus* y se tomaron alícuotas de 100 μL de cada uno de los tubos. Se realizaron las diluciones convenientes de las muestras tomadas y se sembraron 30 μL en placas de PDA para realizar recuentos de UFC/mL. Paralelamente se realizó un estudio del efecto de antifúngico arrastrado con la muestra para comprobar que la disminución en el número de UFC/mL no se debía a esto. Los recuentos de UFC/mL se expresan en una escala semilogarítmica en el eje de las ordenadas y el tiempo se representa en una escala aritmética en el eje

de las abscisas. Se considera que un fármaco tiene efecto fungicida sobre un microorganismo cuando se produce una disminución de $\geq 99.9\%$ o $\geq 3 \log_{10}$ unidades comparando con el inóculo mientras que si se produce una reducción del $< 99.9\%$ o $< 3 \log_{10}$ se considera que el antifúngico es fungistático.

3.3. Estudios *in vivo*

3.3.1. Cepas

Para la realización de los estudios *in vivo* se utilizaron 38 cepas clínicas obtenidas de colecciones internacionales de diferentes especies de hongos oportunistas (Tabla 9):

Tabla 9. Relación de cepas utilizadas en los modelos animales

Espece	Origen
<i>Aspergillus terreus</i>	
FMR 8752	Espufo, Reus, España
FMR 8754	Espufo, Reus, España
<i>Candida guilliermondii</i>	
UTHSC 11-142	Clínica, Texas, EUA
UTHSC 11-685	Clínica, Texas, EUA
<i>Candida lusitanae</i>	
UTHSC 11-320	Clínica (vaginal), Texas, EUA
UTHSC 10-3389	Clínica, Texas, EUA
UTHSC 11-53	Clínica, Texas, EUA
<i>Candida kefyr</i>	
FMR 11743	Clínica, Texas, EUA
FMR 11745	Clínica, Texas, EUA
<i>Diutina rugosa</i>	
UTHSC 05-1919	Clínica (Tobillo), Texas, EUA
UTHSC 06-3976	Espufo, Reus, España
<i>Candida glabrata</i>	
UTHSC DI15-86	Clínica, Texas, EUA
FMR 11377	Clínica, Reus, España
UTHSC DI15-87	Clínica, Texas, EUA
FMR 11382	Clínica, Reus, España
UTHSC DI15-88	Clínica, Texas, EUA
FMR 11379	Clínica, Reus, España
FMR 11378	Clínica, Reus, España
FMR 8502	Clínica (exudado de herida), Reus, España
FMR 11383	Clínica, Reus, España
JMI 002-729	Clínica, North Liberty, Iowa, EUA
JMI 002-297	Clínica, North Liberty, Iowa, EUA

Especie	Origen
UTHSC DI15-89	Clínica, Texas, EUA
UTHSC DI15-90	Clínica, Texas, EUA
JMI 002-206	Clínica, North Liberty, Iowa, EUA
JMI 801705	Clínica, North Liberty, Iowa, EUA
JMI 787195	Clínica, North Liberty, Iowa, EUA
UTHSC DI15-91	Clínica, Texas, EUA
UTHSC DI15-92	Clínica, Texas, EUA
JMI 780445	Clínica, North Liberty, Iowa, EUA
JMI 766341	Clínica, North Liberty, Iowa, EUA
JMI 787587	Clínica, North Liberty, Iowa, EUA
JMI 815914	Clínica, North Liberty, Iowa, EUA
JMI 766356	Clínica, North Liberty, Iowa, EUA
JMI 815905	Clínica, North Liberty, Iowa, EUA
JMI 663371	Clínica, North Liberty, Iowa, EUA
JMI 030-10956	Clínica, North Liberty, Iowa, EUA
JMI 698837	Clínica, North Liberty, Iowa, EUA

3.3.2. Animales de experimentación

Para la realización de todos los estudios *in vivo* se utilizaron ratones macho OF-1 (Charles River, Criffa S. A., Barcelona) de 30 gramos de peso. Todos los estudios realizados fueron aprobados por el Comité Ético de la Universidad Rovira i Virgili. Los animales se mantuvieron en condiciones estándar con acceso libre a la comida y a la bebida, controlando diariamente el progreso de la infección hasta el último día del experimento. Para monitorizar el bienestar de los animales se supervisaron diferentes parámetros:

- ❖ Pelaje: liso y brillante o piloerección
- ❖ Cambios de peso: la pérdida notoria de peso corporal es señal de sufrimiento
- ❖ Cambios posturales: postura normal o encorvada
- ❖ Secreciones
- ❖ Convulsiones
- ❖ Alteraciones en la locomoción: movimientos repentinos y rápidos, ataxia, entre otros
- ❖ Comportamiento no provocado: vocalizaciones y auto-mutilaciones

- ❖ Respuesta a estímulos: agresividad, estado comatoso

La eutanasia por sufrimiento de los animales se realizó por inhalación de CO₂. Este mismo procedimiento fue el utilizado al final del estudio para sacrificar a los animales supervivientes.

3.3.3. Inmunosupresión

Para todos los experimentos realizados se utilizaron ratones OF-1 inmunosuprimidos con las siguientes pautas:

- ❖ Administración, el día previo a la infección (día -1), de una dosis única de 200 mg/kg de ciclofosfamida (Genoxal® Baxter, Halle/Westfalen, Alemania) intraperitonealmente (i.p.) junto con una dosis de 150 mg/kg de 5-fluorouracilo intravenosamente (Graybill *et al.*, 1998; Ortoneda *et al.*, 2004).
- ❖ Administración i.p. dos días antes de la infección (día -2) de ciclofosfamida (200 mg/kg) (Genoxal® Baxter, Halle/Westfalen, Alemania) y repitiendo la administración de esta dosis cada cinco días hasta el final del experimento (Clemons *et al.*, 2005).

Con ambas inmunosupresiones se consigue reproducir un estado inmunológico de neutropenia con recuentos de neutrófilos < 100/μL (Figura 8) (Denning *et al.*, 1995).

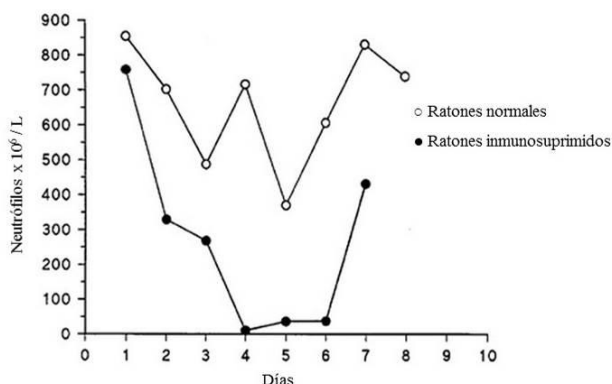


Figura 8. Recuento de neutrófilos después de la administración de una dosis de ciclofosfamida de 200 mg/kg en un modelo murino.

3.3.4. Infección

Los inóculos utilizados para las infecciones realizadas por *Candida* spp. y *A. terreus* se prepararon igual que para los estudios *in vitro*, pero utilizando solución salina fisiológica estéril en lugar de agua destilada estéril. Los inóculos también se ajustaron para conseguir la concentración deseada mediante la cámara de Neubauer y una vez preparado el inóculo, el día 0 se llevó a cabo la infección de los animales mediante la administración intravenosa de 0,2 mL de la suspensión de hongo a través de la vena lateral de la cola. La viabilidad de los inóculos fue comprobada mediante la realización de diluciones seriadas y sembrando en PDA para el recuento de UFC/mL.

3.3.5. Fármacos ensayados *in vivo*: tratamientos, dosis y vías de administración

Los antifúngicos empleados en los tratamientos experimentales se muestran en la Tabla 10 junto con la procedencia de cada uno de los fármacos, el disolvente utilizado para su preparación, las vías de administración, las dosis y volúmenes administrados. Los tratamientos se iniciaron 24 horas después de la infección (día +1) y se administraron

diariamente durante 7 o 10 días dependiendo del estudio. Además, todos los ratones tanto los pertenecientes al grupo control como a los diferentes grupos de tratamiento recibieron diariamente una dosis subcutánea de ceftazidima para evitar infecciones bacterianas oportunistas. Según la naturaleza de los fármacos estudiados, éstos fármacos fueron administrados subcutáneamente, intravenosamente, intraperitonealmente u oralmente a las dosis indicadas en la tabla 10.

Tabla 10. Antifúngicos ensayados *in vivo* y otros fármacos utilizados en los estudios

Antifúngico	Procedencia	Disolvente	Dosis (mg/kg/día)	Vía de administración [Volumen mL]
Anfotericina B	Anfotericina B deoxicolato. Farmacia Xalabarder, Barcelona, España	Solución glucosada al 5 %	0,8	Intravenosa [0,2]
Fluconazol	Diflucan® Pfizer A.A., Madrid, España	Solución salina fisiológica	50	Oral [0,1]
Posaconazol	Noxafil® Shering-Plough, Madrid, España	Solución salina fisiológica	10, 25, 40	Oral [0,1]
Voriconazol	Vfend® Pfizer, Ltd., Madrid, España	Solución salina fisiológica	10, 25, 40	Oral [0,1]
Anidulafungina	Ecalta®, Pfizer Ltd, Kent, Reino Unido	Agua bidestilada	5, 10	Intraperitoneal [0,1]
Caspofungina	Cancidas® Merck & Co. Ltd., Herfordshire, Reino Unido	Solución salina fisiológica	1, 5	Intraperitoneal [0,1]
Otros fármacos:				
Ceftazidima	Combino Pharm S.L., S. Joan Despí, España	Solución salina fisiológica	5	Subcutánea [0,1]
Sevofluorano	Sevorane® Abbott Lab., Madrid, España	[-]	[-]	Inhalatoria [-]

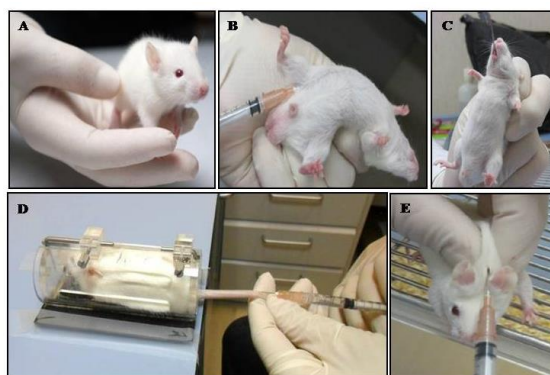


Figura 9. Manejo de los ratones y rutas de administración de los fármacos. Ratón macho OF-1 (A); Vías: intravenosa (B); intraperitoneal (C); oral (D); y subcutánea (E).

3.3.6. Evaluación de la virulencia y de la eficacia de los tratamientos

3.3.6.1. Estudios de supervivencia

Para evaluar la eficacia de la terapia en algunos experimentos se realizaron estudios de supervivencia mediante los cuales se puede estudiar si los animales que reciben un determinado tratamiento antifúngico tienen una supervivencia significativamente más prolongada que el grupo de animales control (infectados con el hongo, pero no tratados).

3.3.6.2. Estudios de carga fúngica en órganos

Se realizaron estudios de carga fúngica en órganos diana: bazo y riñón en el caso de *A. terreus* y en riñón para todas las especies de *Candida* estudiadas. Dependiendo del estudio los animales correspondientes al grupo de recuperación fúngica se sacrificaron los días 7 o 10 después de la infección mediante anoxia por CO₂. Una vez sacrificados, se extrajeron de forma aséptica los órganos diana, se

pesaron y se homogenizaron mecánicamente en 1 mL de solución salina estéril. Se realizaron diluciones seriadas 1:10 de los homogenizados, se sembraron en placas de PDA y finalmente se incubaron entre 30 - 35 °C dependiendo del hongo estudiado para calcular las UFC/g mediante esta fórmula:

$$\text{UFC/g} = \frac{\text{UFC/ml} \times (\text{peso del \acute{o}rgano} + \text{ml utilizados para homogeneizar})^*}{\text{Peso del \acute{o}rgano}}$$

* Considerando que 1 g de tejido ocupa un volumen de 1 ml.

3.3.6.3. Determinación y cuantificación de los niveles séricos de antifúngicos (bioensayo) y de antígenos (galactomanano y (1→3)-β-D-glucano).

Para las determinaciones séricas, tantos los animales del grupo control como los tratados fueron anestesiados por inhalación de sevoflurano los días 7, 10 o 11 después de la infección dependiendo del estudio, después de la administración de la última dosis de fármaco. Mediante punción cardíaca se extrajo alrededor de 1mL de sangre y se procedió a la eutanasia de los animales mediante dislocación cervical. Luego, todas las muestras de sangre fueron centrifugadas para la obtención del suero, el cual se congeló a -20 °C hasta su utilización.

❖ Bioensayo

En algunos estudios se determinó la concentración sérica de los fármacos una vez finalizado el tratamiento mediante la técnica del bioensayo. La finalidad de este estudio es poder determinar si las concentraciones de cada uno de los antifúngicos están por encima de la CMI de las cepas utilizadas al finalizar el tratamiento. Los pasos para realizar el bioensayo fueron los siguientes:

Materiales y métodos

a) Realización de una recta patrón

Se confeccionó una recta patrón para cada antifúngico (Tabla 4) y paralelamente 24 horas antes del ensayo se sembró en placas de PDA a 35 °C un microorganismo control dependiendo del antifúngico ensayado (*Candida parapsilosis* ATCC 22019 o *C. albicans* ATCC 90028). Se utilizó el medio de cultivo de Yeast Nitrogen Base (YNB) el cual fue dispensado en tubos Falcon estériles y al que se añadió un inóculo de 2×10^6 células/ml del microorganismo indicador. Después de homogenizar la muestra, ésta se dispensó en placas Petri y una vez solidificado se realizaron pocillos de 4 mm de diámetro usando un sacabocados estéril. Finalmente, en cada uno de estos pocillos se dispensaron 20 μ L de cada concentración de antifúngico previamente preparado. Todos los ensayos fueron realizados por duplicado. Las placas se incubaron a 35 °C durante 24 horas y se midieron los diámetros de inhibición de crecimiento del hongo para realizar la recta patrón para cada antifúngico.

b) Determinación de concentraciones séricas de antifúngicos

Se utilizaron grupos de cuatro o cinco animales tratados con el antifúngico a estudiar y en otros casos fueron utilizados los mismos animales destinados a sacrificio para evaluación de la carga fúngica en los órganos diana. Los ratones fueron anestesiados inhalatoriamente con sevoflurano y mediante punción cardiaca se extrajo la sangre. A partir de las muestras de sangre se extrajo el suero y se siguió el mismo procedimiento utilizado que para cálculo de la recta patrón a partir de los rangos de concentraciones de los antifúngicos. Dependiendo del experimento, las muestras de suero se obtuvieron siete, diez u once días después de la infección, 24 h y 4 h o 1 h (Cmax) después de la última administración del antifúngico. Una vez medidos los diámetros, éstos

fueron extrapolados en la recta patrón con la finalidad de calcular la concentración del antifúngico en suero al finalizar el tratamiento.

❖ **Detección y cuantificación sérica de antígenos**

Debido a las limitaciones que muchas veces ofrece el cultivo microbiológico para los clínicos, se han desarrollado técnicas diagnósticas alternativas que se basan en la detección de biomarcadores como la detección de antígenos fúngicos como el galactomanano para *Aspergillus* spp. o componentes estructurales como es el caso del (1→3)-β-D-glucano en el caso de *Candida* spp.

a) Galactomanano

En el estudio experimental de *A. terreus* se determinaron los niveles de galactomanano en suero como marcador adicional de la eficacia antifúngica. Para ello se utilizó el kit de Platelia-*Aspergillus*® (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, Francia), el cual es un enzimoimmunoensayo de doble sándwich con un anticuerpo monoclonal de rata dirigido contra el galactomanano de *Aspergillus*. Según las indicaciones del protocolo, se añadieron 100 µL de EDTA 4 % (ácido etilendiaminotetraacético) a 300 µL de la muestra de cada suero a evaluar. Esta mezcla se incubó en un termobloque a 120 °C durante 6 minutos, y a continuación se centrifugó. Se extrajeron 50 µL del sobrenadante de la muestra a los cuales se agregaron 50 µL de conjugado (anticuerpos monoclonales antigalactomanano marcados con peroxidasa) y se cubrieron las placas una lámina adhesiva. A continuación, se incubaron a 37 °C durante 90 minutos y al finalizar ese tiempo se procedió al lavado de la microplaca con una solución de tampón tris NaCl, Tween ® al 1 % y timerosal al 0,01 %. Se añadieron 200 µL de cromógeno (DMSO al 90 % y tetrametilbenzidina al 0,6 %) a cada pocillo y tras 30 minutos de incubación a temperatura ambiente, se

Materiales y métodos

paró la reacción agregando 100 μL de una solución de ácido sulfúrico 1,5 N. Finalmente se procedió a la lectura espectrofotométrica de la densidad óptica de cada pocillo a 450 nm.

b) (1 \rightarrow 3)- β -D-glucano

El glucano es un componente de la pared fúngica formado por monómeros de glucosa unidos por enlaces β -1,3 y β -1,6. La determinación de este antígeno fúngico se realizó como marcador adicional de eficacia terapéutica en los estudios realizados en *C. lusitaniae* y *C. kefyri* mediante el kit de Fungitell (Associates of Cape Cod Inc., Estados Unidos) la cual consiste en la detección cualitativa de (1 \rightarrow 3)- β -D-glucano mediante un ensayo cinético y colorimétrico. Este componente se libera durante la infección y puede detectarse en los líquidos biológicos, principalmente en el suero extraído a partir de muestras de sangre (Pontón, 2009) y por lo tanto mediante este kit es posible determinar la tasa del aumento de la densidad óptica de las muestras a evaluar. Los valores obtenidos se extrapolan a una curva estándar, obteniendo así los valores aproximados de la concentración de (1 \rightarrow 3)- β -D-glucano en la muestra estudiada. Según el procedimiento descrito por el fabricante, el primer paso a realizar fue la centrifugación de los sueros problemas a 1.000 rpm durante 10 minutos. A continuación 5 μL del sobrenadante de cada muestra fueron pipeteados en su correspondiente pocillo de la microplaca (cada muestra por triplicado) y tratados con 20 μL de una solución de 0.6 mol/L KCL y 0.125 mol/L de KOH e incubados a 37 °C durante 10 minutos. Luego se añadieron 100 μL del reactivo Fungitell ya reconstituido a cada pocillo (controles negativos, controles estándares y muestras problemas), se insertó la microplaca en un lector calibrado a 37 °C en agitación durante 5 a 10 segundos y se realizó la lectura de la placa sin tapa a 405/490 nm durante 40 minutos a una temperatura constante (37 °C).

3.3.7. Histopatología

En el estudio de infección diseminada por *A. terreus* se realizó un estudio histopatológico de riñones. Los pasos que se realizaron fueron los siguientes:

❖ **Fijación, deshidratación y aclaramiento:** las muestras de tejido fueron fijadas en formol al 10 %, deshidratadas utilizando concentraciones crecientes de alcohol etílico (al 70 % durante 4 h, al 96 % durante 2 h y por último al 100% durante 3 h) y finalmente sumergidas en xilol para eliminar el alcohol residual.

❖ **Parafinado y cortes histológicos:** se procedió a la inclusión en una mezcla de parafina blanda y xilol de las muestras de tejido previamente deshidratadas. Para obtener un parafinado óptimo y una total impregnación de las muestras de tejido, éstas se dejaron 8 h en contacto con parafina blanda (50 – 55 °C) y seguidamente 4 h con parafina a punto de fusión (60 °C). Se realizaron cortes seriados de 3 µm de grosor de los bloques obtenidos utilizando un microtomo.

❖ **Desparafinado y rehidratación de las muestras:** antes de teñir las muestras, se cubrieron con xilol durante 10 minutos, rehidratadas por inmersión en alcohol absoluto y luego en alcohol al 96 % y al 70 % durante 5 minutos en ambos casos.

❖ **Tinción de las muestras:** se emplearon 3 tinciones diferentes:

- Hematoxilina-eosina (H-E). El citoplasma celular, las sustancias hialinas, amiloides y el colágeno presentaron un color rosado. Las estructuras fúngicas, los núcleos celulares y sustancias mucoides se tiñeron de color morado oscuro.

Materiales y métodos

- Ácido periódico de Schiff (PAS). Los núcleos celulares se tiñeron de color morado, mientras que los mucopolisacáridos y las estructuras fúngicas presentaron un color rojo.
- Nitrato de metenamina argéntica de Grocott (GMS). Los tejidos adoptaron una coloración verde mientras que las células fúngicas se tiñeron de color negro.

Una vez las muestras fueron teñidas, cada uno de los cortes histológicos fue examinado mediante microscopia óptica por un histopatólogo para valorar alteraciones tisulares durante el curso de las infecciones experimentales.

3.3.8. Estudios moleculares: análisis de la secuencia *FKSI* en *C. kefyi*

La amplificación de la región Hot spot 1 (HS1) del gen *FKSI* de las dos cepas de *C. kefyi* incluidas en el estudio, se realizó a partir de ADN genómico mediante las dos parejas de primers descritos previamente por Fekkar *et al.*, 2013 (Tabla 11) y el Hot spot 2 (HS2) perteneciente a este gen se amplificó mediante los primers diseñados con el programa Oligo Primer Analysis Software para Windows (1267 Vondelpark, Colorado Springs, CO, USA).

Tabla 11. Primers utilizados para la amplificación de las regiones Hot spot del gen *FKSI*

Primer	Secuencia 5' → 3'
<i>FKSI</i> HS1	F: GGTGGTTTATTCACTTCCTACA
	R: GCGTAGCCAAAGATTGAGCA
<i>FKSI</i> HS2	F: TGCTTCGTGGTGGTCGTATT
	R: ACTCAACAAAGAAGCAGAATAAA

F: forward; R: reverse

El programa de amplificación consistió en un ciclo de 4 minutos (min) a 96 °C, 40 ciclos de 30 segundos (s) a 94 °C, 30 s a 55 °C y 90 s a 74 °C, seguido de un ciclo final de 4 min a 74 °C. La comprobación de la calidad de las secuencias obtenidas se llevó a cabo mediante el programa Lasergene SeqMan (DNASTAR, Inc., Madison, WI, USA) y para realizar el alineamiento y la comparación de secuencias se utilizó el Mega (version 6). Las secuencias amplificadas de las regiones HS1 y HS2 de ambas cepas de *C. kefyr* se compararon con las secuencias *FKS* de tres cepas wild-type de referencia sin mutaciones relacionadas con resistencia frente a las equinocandinas (*C. kefyr* ATCC 4922 (número de acceso KJ685792 (HS2) y KJ685779 (HS1)), *C. albicans* ATCC 90028 (GQ456066) y *C. glabrata* ATCC 90030 (HM366440)) y también respecto a una cepa de *C. kefyr* con una mutación conocida en el HS1 (número de acceso KJ685787 (HS1)). Sin embargo, no se pudo utilizar un control positivo para mutaciones en el HS2 debido a que no existen aislados de referencia con mutaciones en esta región.

3.3.9. Análisis estadístico

Se utilizó el paquete de programas estadísticos SPSS en las versiones 14.0 y 15.0 y Graph Pad Prism versión 4.0 para Windows. Para realizar los estudios estadísticos, los resultados obtenidos fueron analizados y comparados utilizando los siguientes métodos:

❖ **Método de Kaplan Meier.** Este método permite calcular el tiempo medio de supervivencia (TMS) para un grupo de animales. Tiene en cuenta los animales que quedan vivos al final del estudio y también que día han muerto los animales que no sobreviven hasta el final del período de observación. Una vez calculados los TMS para cada grupo, se utiliza el Log-rank test para comparar los TMS de los diferentes grupos entre sí o respecto al grupo control y establecer

Materiales y métodos

que grupos son estadísticamente diferentes y cuales se han de considerar iguales.

❖ **Análisis de la Variancia.** Este es un método de análisis paramétrico que se aplica a los estudios en que se realiza la cuantificación del hongo en diversos órganos. Permite comparar la media de recuperación para cada órgano entre los diferentes grupos del estudio. Como es un método paramétrico, los datos tienen que seguir una distribución normal, y para ello se suele trabajar con logaritmos en base 10 de los recuentos de colonias obtenidos. Este método no es válido cuando los grupos de datos son muy pequeños, en este caso es recomendable utilizar un test no paramétrico como el test U de Mann-Whitney.

❖ **Test U de Mann-Whitney.** Esta prueba no paramétrica permite comparar los datos obtenidos en los recuentos de colonias por gramo de órgano. No compara las medias, sino que ordena los datos de los dos grupos que se comparan y determina unos rangos. En este test, por lo tanto, no hace falta que los datos sigan una distribución normal y podemos trabajar con los datos originales o con los logaritmos ya que con ambos obtendremos los mismos resultados.

❖ **Kolmogórov-Smirnov.** Esta prueba no paramétrica se utiliza para comparar si dos conjuntos de datos difieren entre sí de forma significativa. Este test permite determinar si los datos de las pruebas de detección y cuantificación de galactomanano, betaglucano y bioensayo poseen una distribución normal.

❖ **T-test.** Esta prueba evalúa si las medianas de dos grupos son estadísticamente diferentes entre sí. Se ha utilizado para detectar diferencias en los niveles de antigenemia y en los bioensayos usados para la cuantificación de los niveles de antifúngico en suero y

tejidos. Este análisis es adecuado cuando el tamaño de la muestra es demasiado pequeño. Se utiliza una estimación de la desviación típica en lugar del valor real, hecho que permite utilizar datos originales.

4. RESULTADOS

4.1. Terapia experimental de los azoles frente *Candida guilliermondii*.

Experimental therapy with azoles against *Candida guilliermondii*.

Sanchis M, Pastor FJ, Capilla J, Sutton DA, Fothergill AW, Guarro J.

Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2014, 58: 6255-6257.

Experimental Therapy with Azoles against *Candida guilliermondii*

Marta Sanchis,^a Francisco Javier Pastor,^a Javier Capilla,^a Deanna A. Sutton,^b Annette W. Fothergill,^b Josep Guarro^a

Unitat de Microbiologia and Unitat d'Anatomia Patològica, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, IISPV, Universitat Rovira i Virgili, Reus, Tarragona, Spain^a; Fungus Testing Laboratory, University of Texas Health Science Center, San Antonio, Texas, USA^b

We evaluated the *in vitro* killing activity of voriconazole (VRC) and posaconazole (PSC) against two clinical isolates of *Candida guilliermondii*. The two drugs showed fungistatic activity against both isolates and were effective in reducing kidney fungal burden in a neutropenic murine model of disseminated candidiasis in infected mice. PSC was significantly more effective than VRC against one of the strains. The serum levels of PSC and VRC were above the corresponding MICs for these isolates.

Candida guilliermondii, an emerging pathogen that causes invasive infections mainly in patients who have malignancies and/or intravascular devices, accounts for 1% to 3% of candidemia cases (1) and is the fourth most frequent cause of candidemia in Latin America (2). *Candida guilliermondii* has poor *in vitro* susceptibility to echinocandins, the recommended first-line therapy, with MICs from 2- to 100-fold higher than those for other *Candida* spp. (3, 4), so treatment regimens often fail. Consequently, we need to look for alternative antifungals in the treatment of these infections (5). Numerous studies have demonstrated that posaconazole (PSC) and voriconazole (VRC) are efficacious in experimental infections due to some non-*albicans* *Candida* species (6–8), but no *in vivo* data exist regarding their effectiveness against *C. guilliermondii*.

We have evaluated the *in vitro* killing activity of PSC and VRC against *C. guilliermondii* and their *in vivo* efficacies in a neutropenic murine model of disseminated candidiasis.

Two clinical strains of *C. guilliermondii* identified by ribosomal DNA (rDNA) sequencing were included in the study. The MICs of PSC and VRC were determined following CLSI guidelines (9) with some modifications (i.e., inocula were adjusted by hemocytometer counts, and viability was assessed by serial plating onto potato dextrose agar [PDA]). The MIC values of PSC and VRC were 0.12 µg/ml and 0.12 µg/ml for strain UTHSC (University of Texas Health Science Center) 11-142 and 0.03 µg/ml and 0.06 µg/ml for strain UTHSC 11-685, respectively.

Time-kill curves of PSC and VRC were generated in duplicate as previously reported (10), and the concentrations for each drug assayed were 0.03, 0.12, 0.5, 1, 2, 8, and 32 µg/ml.

For the *in vivo* studies, 4-week-old male OF1 mice were immu-

nosuppressed by a single intraperitoneal injection of 200 mg/kg of body weight of cyclophosphamide plus a single intravenous injection of 150 mg/kg of 5-fluorouracil (11) 1 day prior to the infection. The mice were infected intravenously via the lateral tail vein with 1×10^8 CFU in 0.2 ml of sterile saline (12, 13). All animal care procedures were supervised and approved by the Universitat Rovira i Virgili Animal Welfare and Ethics Committee.

Six groups (three for each strain) of eight infected animals were established. They received no treatment or 12.5 mg/kg PSC twice daily (BID) or 25 mg/kg VRC once a day (QD), both administered orally by gavage beginning 24 hours after challenge and lasting for 10 days. The doses selected were based on pharmacokinetic studies (14, 15). All the animals received 5 mg/kg ceftazidime subcutaneously once daily until the end of the experiment, and from 3 days before infection, the mice treated with VRC were given diluted (50%) grapefruit juice instead of water (16). Efficacy was evaluated by a reduction of fungal burden in the kidneys on day 11 postinfection. Kidneys from euthanized mice were weighed, homogenized in 1 ml of sterile saline, diluted 10-fold, and placed on PDA plates for determining the number of CFU/g after incubation for 24 hours at 35°C.

Received 11 April 2014 Returned for modification 5 June 2014
Accepted 12 July 2014

Published ahead of print 21 July 2014

Address correspondence to Josep Guarro, josep.guarro@urv.cat.

Copyright © 2014, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.
doi:10.1128/AAC.03051-14

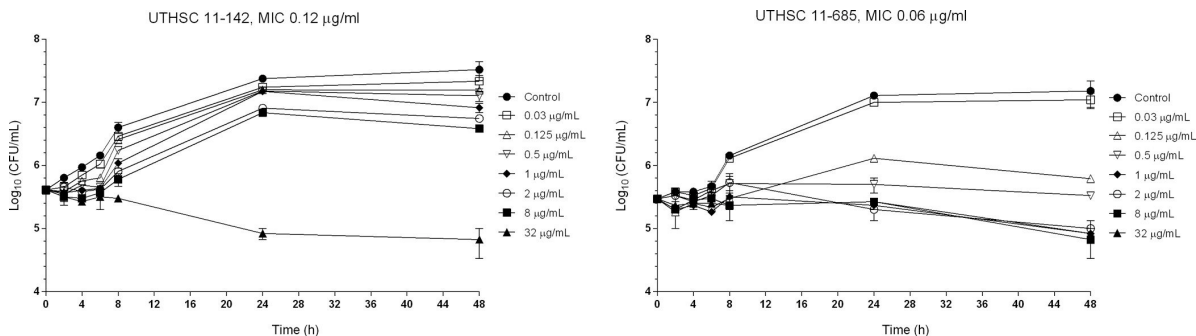


FIG 1 Time-kill kinetic assays of PSC at various concentrations against two strains of *C. guilliermondii*.

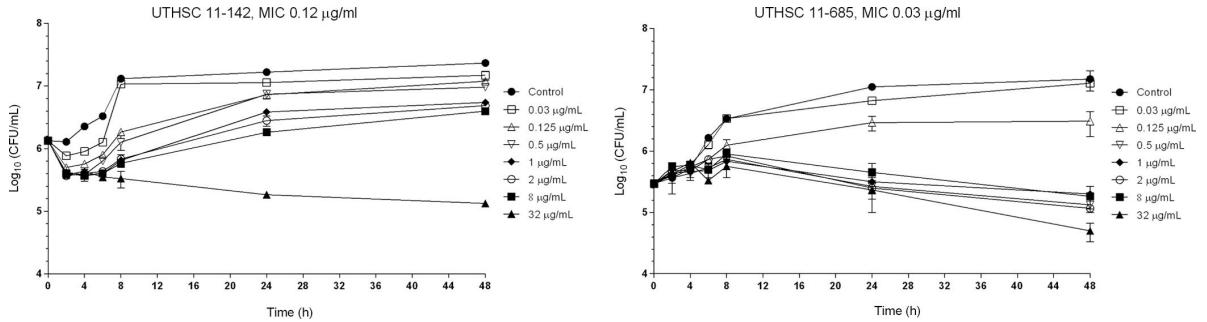


FIG 2 Time-kill kinetic assays of VRC at various concentrations against two strains of *C. guilliermondii*.

Additionally, two groups of 5 mice infected with strain UTHSC 11-685 and treated as described above were anesthetized by inhalatory isoflurane 24 hours after the last dosing, and approximately 1 ml of blood from each mouse was extracted by cardiac puncture. Serum was obtained from centrifuged blood samples and used to determine the drug concentration of each sample by bioassay (17).

Colony counts from the tissue burden studies were analyzed using the Mann-Whitney *U* test, using GraphPad Prism 4.0 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Differences were considered statistically significant at a *P* value of <0.05.

Regarding the starting inoculum, PSC and VRC showed fungistatic activities against the two strains, with 0.845- to 0.64- \log_{10} and 0.795- to 1- \log_{10} decreases in CFU/ml, respectively (Fig. 1 and 2).

PSC and VRC significantly reduced the fungal load in the kidneys of mice infected with each of the two isolates in comparison to that of the control group ($P = 0.0002$) (Fig. 3). No statistically significant differences were found between the two drugs for strain UTHSC 11-142 ($P = 0.0771$); however, for the UTHSC 11-685 isolate, PSC worked better than did VRC ($P = 0.0002$). The mean (\pm the standard deviation) serum concentrations of PSC and VRC on day 11, 24 hours after the last dosing, were 5.4 ± 2.06 $\mu\text{g/ml}$ and 5.65 ± 0.95 $\mu\text{g/ml}$, respectively (i.e., above the corresponding MIC values for the two strains tested).

In a previous experimental murine infection by *C. guilliermondii*, liposomal amphotericin B was the only effective treatment in reducing the fungal load in kidneys, in contrast to the low efficacies of fluconazole (FLC) and anidulafungin (AFG), although both of the tested strains were susceptible to these drugs (13). In this study, using the same fungal isolates, we have demonstrated the good *in vivo* efficacies of VRC and PSC. The MICs of PSC and VRC were within the ranges considered indicative of susceptibility and below the epidemiological cutoff values for *C. guilliermondii* (i.e., 0.5 and 0.12 $\mu\text{g/ml}$, respectively) (18). To our knowledge, there have been no reports of the efficacies of VRC and PSC in the treatment of invasive infections by *C. guilliermondii* in the clinical setting, but in the few clinical cases that reported infection by other non-*albicans* *Candida* species, both drugs demonstrated efficacy (19). In our study, the *in vitro* data were good predictors of the *in vivo* outcomes against strains, showing MIC values of PSC and VRC equal to those of the modal MICs reported in a recent multicenter study (18). To our knowledge, this is the first study to have established a relationship between the *in vitro* activities and *in vivo* efficacies of PSC and VRC against clinical isolates of *C. guilliermondii*.

In summary, our study demonstrated that PSC and VRC were experimentally effective in the treatment of an invasive infection by *C. guilliermondii* caused by isolates refractory to FLC and AFG in a neutropenic murine model in infected mice (13).

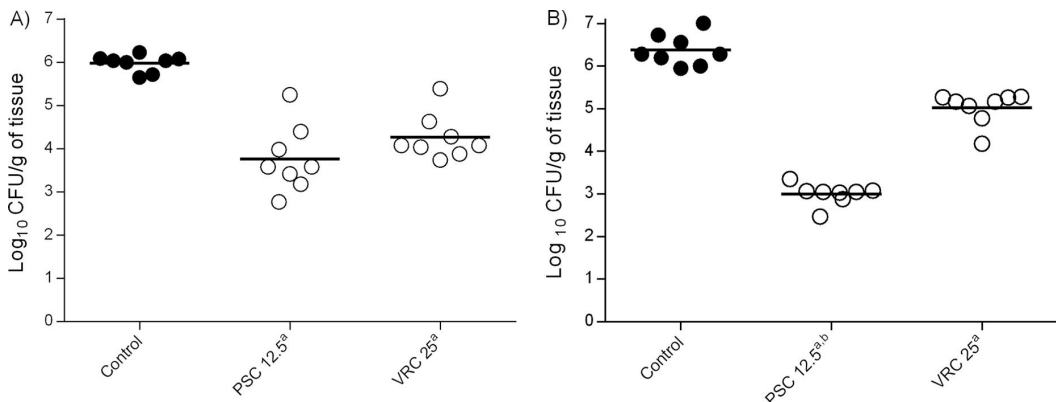


FIG 3 Effects of antifungal treatment on fungal loads in the kidneys of neutropenic mice infected with 1×10^8 CFU/animal of two clinical strains of *C. guilliermondii*, UTHSC 11-142 (A) and UTHSC 11-685 (B), 11 days postinfection. PSC and VRC were administered orally at 12.5 mg/kg BID and 25 mg/kg QD, respectively. ^a, $P < 0.05$ versus control; ^b, $P < 0.05$ versus VRC at 25 mg/kg QD.

REFERENCES

- Savini V, Catavittello C, Onofrillo D, Masciarelli G, Astolfi D, Balbinot A, Febbo F, D'Amario C, D'Antonio D. 2011. What do we know about *Candida guilliermondii*? A voyage throughout past and current literature about this emerging yeast. *Mycoses* 54:434–441. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1439-0507.2010.01960.x>.
- Santolaya ME, Alvarado Matute T, de Queiroz Telles F, Colombo AL, Zurita J, Tiraboschi IN, Cortes JA, Thompson-Moya L, Guzman-Blanco M, Sifuentes J, Echevarría J, Nucci M. 2013. Recommendations for the management of candidemia in neonates in Latin America. *Rev. Iberoam. Micol.* 30:158–170. (In Spanish.) <http://dx.doi.org/10.1016/j.riam.2013.06.002>.
- Arendrup MC, Boekhout T, Akova M, Meis JF, Cornely OA, Lortholary O, ESCMID EFISG Study Group and ECMM. 2014. ESCMID and ECMM joint clinical guidelines for the diagnosis and management of rare invasive yeast infections. *Clin. Microbiol. Infect.* 3:76–98. <http://dx.doi.org/10.1111/1469-0691.12360>.
- Jensen RH, Arendrup MC. 2011. *Candida palmiophila*: characterization of a previously overlooked pathogen and its unique susceptibility profile in comparison with five related species. *J. Clin. Microbiol.* 49:549–556. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.02071-10>.
- Beyda ND, Lewis RE, Garey KW. 2012. Echinocandin resistance in *Candida* species: mechanisms of reduced susceptibility and therapeutic approaches. *Ann. Pharmacother.* 46:1086–1096. <http://dx.doi.org/10.1345/aph.1R020>.
- Majithiya J, Sharp A, Parmar A, Denning DW, Warn PA. 2009. Efficacy of isavuconazole, voriconazole and fluconazole in temporarily neutropenic murine models of disseminated *Candida tropicalis* and *Candida krusei*. *J. Antimicrob. Chemother.* 63:161–166. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkn431>.
- Mariné M, Pastor FJ, Serena C, Guarro J. 2009. Efficacy of triazoles in a murine disseminated infection by *Candida krusei*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53:3585–3588. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00293-09>.
- Mariné M, Pastor FJ, Guarro J. 2010. Efficacy of posaconazole in a murine disseminated infection by *Candida tropicalis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54:530–532. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.01136-09>.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. 2008. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard—3rd ed. CLSI M27-A3. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
- Cantón E, Pemán J, Valentín A, Bosch M, Espinel-Ingroff A, Gobernado M. 2008. Comparison of posaconazole and voriconazole *in vitro* killing against *Candida krusei*. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 62:177–181. <http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2008.07.001>.
- Graybill JR, Bocanegra R, Najvar LK, Loebenberg D, Luther MF. 1998. Granulocyte colony-stimulating factor and azole antifungal therapy in murine aspergillosis: role of immune suppression. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42:2467–2473.
- Arendrup M, Horn T, Frimodt-Møller N. 2002. *In vivo* pathogenicity of eight medically relevant *Candida* species in an animal model. *Infection* 30:286–291. <http://dx.doi.org/10.1007/s15010-002-2131-0>.
- Paredes K, Pastor FJ, Capilla J, Sutton AD, Mayayo E, Fothergill WA, Guarro J. 2014. Therapies against murine *Candida guilliermondii* infection, relationship between *in vitro* antifungal pharmacodynamics and outcome. *Rev. Iberoam. Micol.* (In Spanish.) <http://dx.doi.org/10.1016/j.riam.2013.10.008>.
- Oakley KL, Morrissey G, Denning DW. 1997. Efficacy of SCH-56592 in a temporarily neutropenic murine model of invasive aspergillosis with an itraconazole-susceptible and an itraconazole-resistant isolate of *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41:1504–1507.
- Warn PA, Sharp A, Mosquera J, Spickermann J, Schmitt-Hoffmann A, Heep M, Denning DW. 2006. Comparative *in vivo* activity of BAL4815, the active component of the prodrug BAL8557, in a neutropenic murine model of disseminated *Aspergillus flavus*. *J. Antimicrob. Chemother.* 58:1198–1207. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkl396>.
- Sugar AM, Liu XP. 2000. Effect of grapefruit juice on serum voriconazole concentration in the mouse. *Med. Mycol.* 38:209–212. <http://dx.doi.org/10.1080/mmy.38.3.209.212>.
- Rodríguez MM, Calvo E, Serena C, Mariné M, Pastor FJ, Guarro J. 2009. Effects of double and triple combinations of antifungal drugs in a murine model of disseminated infection by *Scedosporium prolificans*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53:2153–2155. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.01477-08>.
- Espinel-Ingroff A, Pfaller MA, Bustamante B, Canton E, Fothergill A, Fuller J, Gonzalez GM, Lass-Flörl C, Lockhart SR, Martin-Mazuelos E, Meis JF, Melhem MS, Ostrosky-Zeichner L, Pelaez T, Szesz MW, St-Germain G, Bonfietti LX, Guarro J, Turnidge J. 2014. Multilaboratory study of epidemiological cutoff values for detection of resistance in eight *Candida* species to fluconazole, posaconazole, and voriconazole. *Antimicrob. Agents Chemother.* 58:2006–2012. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.02615-13>.
- Zaragoza R, Pemán J. 2012. Antifungal treatment options in the critically ill patient. *Rev. Iberoam. Micol.* 29:108–113 (In Spanish.) <http://dx.doi.org/10.1016/j.riam.2012.03.009>.

4.2. Eficacia experimental de la anidulafungina frente a especies pertenecientes al complejo *Aspergillus terreus*.

Experimental efficacy of anidulafungin against *Aspergillus terreus* species complex.

Sanchis M, Capilla J, Mayayo E, Pastor FJ, Guarro J.
Medical Mycology 2015, 53: 630-635.



Short Communication

Experimental efficacy of anidulafungin against *Aspergillus terreus* species complex

Marta Sanchis¹, Javier Capilla¹, Emilio Mayayo², Francisco J. Pastor¹
and Josep Guarro^{1,*}

¹Unitat de Microbiologia and ²Unitat d'Anatomia Patològica, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, IISPV, Universitat Rovira i Virgili, Reus, Spain

*To whom correspondence should be addressed. Josep Guarro, Mycology Unit, Medical School, Universitat Rovira i Virgili, Sant Llorenç street 21, 43201-Reus, Spain. Tel: +34 977 759359; Fax: +34 977 759322; E-mail: josep.guarro@urv.cat

Received 3 October 2014; Revised 9 March 2015; Accepted 25 March 2015

Abstract

Whereas echinocandins are alternatives for the treatment of invasive aspergillosis, the efficacy of anidulafungin (AFG) against *Aspergillus terreus* infection has not yet been explored. We have evaluated the *in vitro* activity, as well as the *in vivo* efficacy of AFG in neutropenic mice infected by *A. terreus* species complex. Time-kill studies showed *in vitro* fungistatic activity of AFG against two strains. AFG at doses of 5 and 10 mg/kg/day significantly reduced the fungal load in kidney of mice, but only the higher dose was able to prolong survival.

Key words: anidulafungin, *Aspergillus terreus*, antifungals, echinocandins, fungal infections, murine models.

Introduction

Human infections caused by *Aspergillus terreus* are increasing, showing a higher tendency to disseminate than *A. fumigatus* [1,2]. *A. terreus* infections are refractory to amphotericin B [3] and several studies have reported emergence of isolates with acquired resistance to azoles resulting in clinical failure, including voriconazole (VRC), which is the first-line therapy for invasive aspergillosis (IA) [4]. Caspofungin (CFG) and micafungin (MFG) have been recommended as alternative therapies; but in the case of anidulafungin (AFG) there is no experimental or clinical data on its efficacy in the treatment of *A. terreus* infections. By contrast, *in vivo* efficacy of this drug has been demonstrated in experimental infections by other species of *Aspergillus* [5–7]. Therefore, due the pharmacokinetic advantages of AFG compared with other echinocandins such as its low enzymatic degradation and low drug interactions [8], the

aim of this study was to evaluate the *in vivo* efficacy of AFG in the treatment of disseminated aspergillosis by *A. terreus* species complex, testing two isolates in a neutropenic murine model.

Materials and methods

Two clinical isolates of the *A. terreus* species complex, FMR 8754 and FMR 8752, were included in the study. Both strains were subcultured from the stock on potato dextrose agar (PDA) for 7 days at 35°C and inocula were prepared by flooding the agar plates with saline solution. The resulting suspensions were filtered through sterile gauze to remove clumps of cells and hyphae. The conidial suspensions were adjusted to the desired concentration by haemocytometer count, the viability of the inocula being checked by serial plating onto PDA and readjusted if necessary.

The *in vitro* antifungal activity of AFG (Pfizer Inc., Madrid, Spain) was determined by following a broth microdilution reference method [9]. The minimum effective concentration (MEC), defined as the lowest antifungal concentration that produced morphological alterations on hyphal growth compared with that of the control well, was used as endpoint criterion. *A. fumigatus* ATCC MYA-3626 strain was included as quality control.

Time-kill curves were performed according to previous studies with some modifications [10]. In brief, AFG was dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) and drug dilutions were prepared in 9 ml of standard RPMI 1640 medium to obtain concentrations of 0.004, 0.008, 0.03, 0.06, 0.12, 0.25, 1, 2, 8, 16, and 32 $\mu\text{g/ml}$ of AFG. Tubes containing AFG at the indicated concentrations and drug-free controls were inoculated with 1 ml of 5×10^6 CFU/ml of FMR 8754 or FMR 8752 and incubated at 35°C. An aliquot of 100 μl from each tube was collected at 0, 4, 8, 24, and 48 h after inoculation, diluted on sterile water, cultured onto PDA plates and incubated at 35°C for 48 h for CFU/ml determination. A CFU decrease of $\geq 99.9\%$ or $\geq 3 \log_{10}$ units compared to starting inoculum was considered fungicidal, while a reduction of $< 99.9\%$ or $< 3 \log_{10}$ units was considered fungistatic [10]. The limit of detection was 50 CFU/ml. All time-kill curve studies were performed in duplicate.

Four-week-old male OF1 mice weighing 30g (Charles River, Criffa S.A., Barcelona, Spain) were used. Mice were housed in standard boxes with free access to food and water. Animals were immunosuppressed 1 day prior to infection by a single intraperitoneal (i.p.) injection of 200 mg/kg of cyclophosphamide plus a single intravenous (i.v.) injection of 150 mg/kg of 5-fluorouracil. All animal care procedures were supervised and approved by the Universitat Rovira i Virgili Animal Welfare and Ethics Committee. Mice were inoculated i.v. with 0.2 ml of sterile saline containing 1×10^4 CFU of *A. terreus* FMR 8754 or FMR 8752 strains via the lateral tail vein. Previous studies showed that this inoculum was able to produce an acute infection for each of the two strains, with all animals dying within 10 days (data not shown).

AFG was diluted in sterile saline solution and administered at 5 mg/kg or 10 mg/kg i.p. once a day. These doses were selected from previous experimental studies on aspergillosis caused by different species [5] and on pharmacokinetics studies of AFG [11]. Treatment began 24 h after challenge and lasted for 7 days. Control animals received no treatment. To prevent bacterial infections, all animals received ceftazidime at 5 mg/kg subcutaneously once daily.

The efficacy of treatments was evaluated by prolonging survival, reducing tissue burden, histopathology features and determining galactomannan serum levels. For survival studies, groups of 8 mice were established randomly

for each strain and each treatment and checked daily for 30 days after challenge, surviving animals being euthanized by CO₂ anoxia. For tissue burden studies, groups of 8 mice were also established. Owing to the quick death of control animals obtained in previous studies (data not shown) and in order to compare efficacy of treatments, control and treated mice were anesthetized by inhalation of isoflurane 7 days post-infection, 4 h after last drug administration, and 1 ml of blood from each mouse was extracted by cardiac puncture. Sera from centrifuged blood samples were kept frozen at -20°C until needed. Then, animals were euthanized by cervical dislocation and spleens and kidneys aseptically removed. Half of each organ was weighed, homogenized in 1 ml of sterile saline, 10-fold diluted, placed on PDA and incubated for 48 h at 35°C for CFU/g determination.

For the histopathology study, half of each kidney was fixed with 10% buffered formalin. Samples were dehydrated, paraffin embedded, and sliced into 2- μm sections, which were stained with hematoxylin-eosin (H-E), periodic acid-Schiff (PAS) stain, and Grocott methenamine silver (GMS) for histopathological evaluation.

Drug concentration and galactomannan levels were measured from mice sera using bioassay methodology and by an enzyme immunoassay (Platelia™ *Aspergillus* EIA; Bio-Rad, Marnes-laCoquette, France) [5], respectively. For bioassay, drug standards were prepared in methyl alcohol and serum from treated and untreated mice placed in wells of 4 mm in diameter on yeast nitrogen base agar. *Candida albicans* ATCC 90028 was used as the test organism. To calculate serum drug concentrations, diameters of growth inhibition from samples, were extrapolated to the obtained standard curve.

Mean survival time was estimated by the Kaplan-Meier method, and the log rank test was used. Differences were considered statistically significant at $P < 0.05$. Colony counts from tissue burden studies were analyzed using the Mann-Whitney *U*-test.

Results

AFG showed a good *in vitro* activity against both isolates of *A. terreus* tested with MECs $\leq 0.008 \mu\text{g/ml}$. Time-kill studies showed fungistatic activity of AFG against both isolates with $< 3 \log_{10}$ unit reduction in the CFU/ml with respect to the control (Fig. 1).

AFG at 10 mg/kg significantly prolonged the survival for both strains with respect to the control ($P \leq .0024$) (Fig. 2) and at 5 mg/kg only did it in those animals infected with the strain FMR 8752 ($P = .0023$). No statistical differences between both doses against both isolates were observed in the prolonging of survival ($P \leq .4995$).

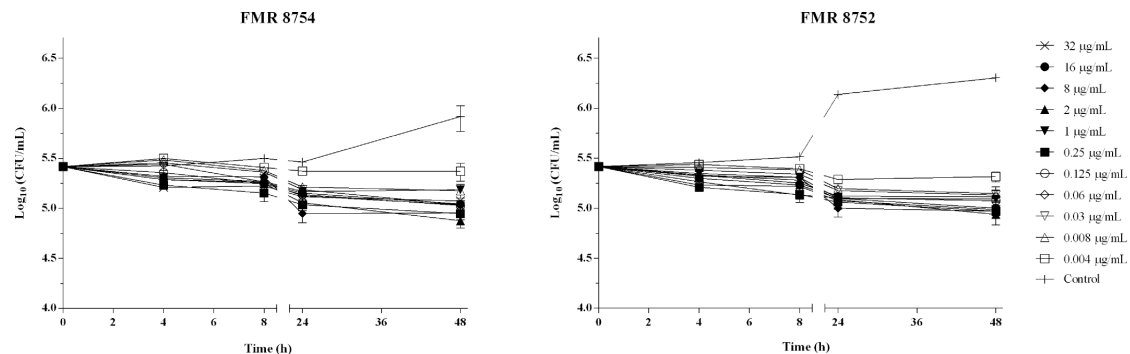


Figure 1. Time-kill plots of anidulafungin (AFG) showing fungistatic activity against two strains of *A. terreus* (FMR 8754 and FMR 8752). Vertical bars represent the standard deviation for two determinations.

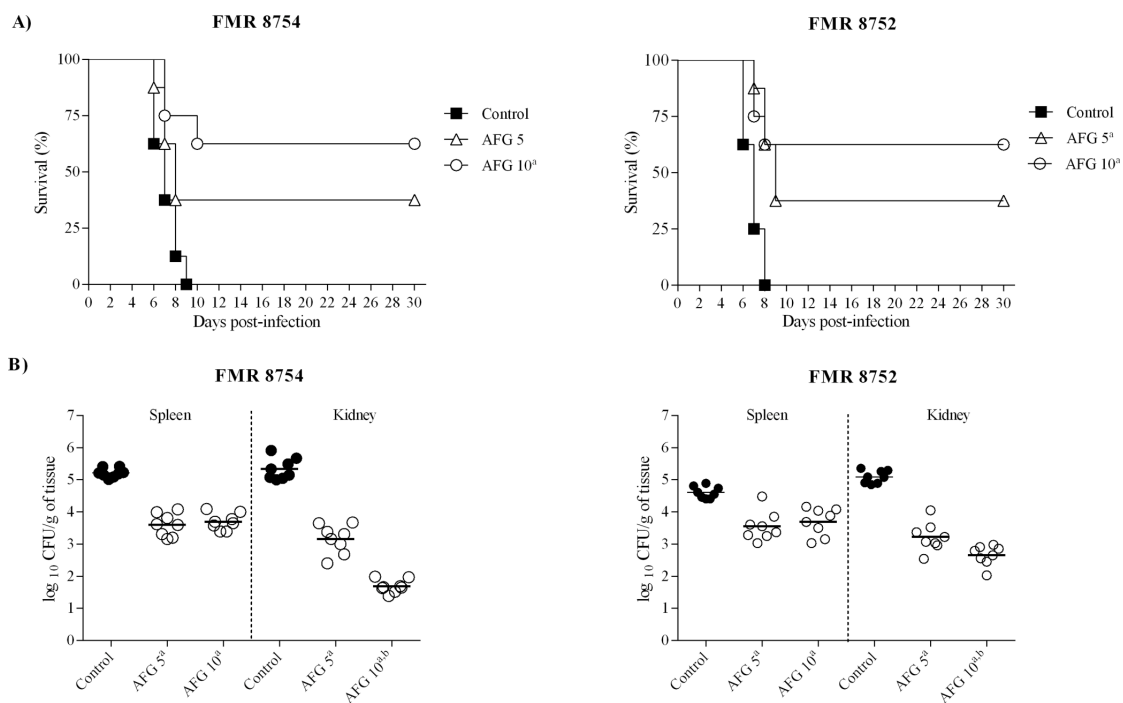


Figure 2. Effect on survival (A) and on colony counts (B) of anidulafungin (AFG) in neutropenic mice infected intravenously with 1×10^4 CFU of two strains of *A. terreus* (FMR 8754 and FMR 8752). Animals received AFG at 5 mg/kg QD (AFG 5) or at 10 mg/kg QD (AFG 10) for 7 days. Colony counts were determined 7 days after infection, 4 hours after the last dose of treatment. a) $P < .05$ versus control; b) $P < .05$ versus AFG 5.

AFG at both doses significantly reduced the fungal load in kidney and spleen of mice infected with each of the two strains ($P \leq .0011$) (Fig. 2) this difference being significantly higher in kidney of those animals receiving 10 mg/kg than in those receiving 5 mg/kg ($P \leq .007$); however, no significant reduction between doses was found in spleen ($P \geq .441$).

The histological findings are shown in Figure 3. Kidneys from control animals showed necrotic and haemorrhagic foci with an inflammatory response and fungal elements located in the renal parenchyma as well as angioinvasion. In mice treated with AFG at 5 and 10 mg/kg, fungal cells were observed focally around the parenchyma with few signs of

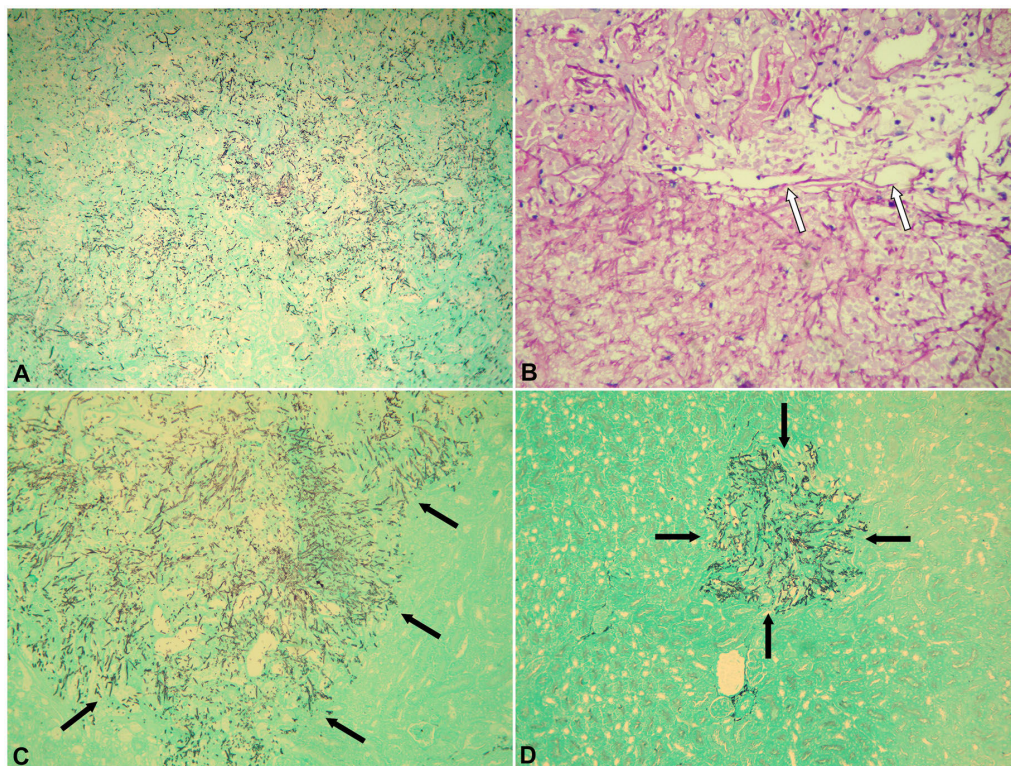


Figure 3. Histopathology findings on mice 7 days after infection with 1×10^4 CFU of *A. terreus* (FMR 8754). A) Section of kidney from a control animal showing scattered tissue invasion by hyphae (Grocott stain, magnification $\times 100$) and B) Invasion of renal parenchyma with angioinvasion (light arrows) (PAS stain, magnification $\times 200$). C) and D) Sections of kidney from mice treated with anidulafungin 5 mg/kg (AFG 5) and 10 mg/kg (AFG 10), respectively. These show a reduction in fungal cells in a dose-dependent manner (Grocott stain, magnification $\times 100$). Dark arrows indicate foci with fungal elements present. This Figure is reproduced in color in the online version of *Medical Mycology*.

necrosis. No inflammatory response or angioinvasion were observed in kidneys (Fig. 3).

Treatment with any dose of AFG achieved serum levels above the MEC values for the two strains of *A. terreus*, the serum concentration being (mean \pm SD) 13.19 ± 1.91 $\mu\text{g/ml}$ and 10.26 ± 2.07 $\mu\text{g/ml}$ in those animals receiving AFG at 10 mg/kg and 5 mg/kg, respectively. In addition, no reduction of serum levels of galactomannan in animals treated with 5 or 10 mg/kg of AFG (galactomannan index \pm SD, 6.29 ± 0.1 and 6.13 ± 0.06 , respectively) was observed in comparison to the control group (6.4 ± 0.14).

Discussion

Invasive fungal infections by *A. terreus* have emerged in recent years with a high level of fatality in the immunosuppressed population. The treatment of these infections is not yet resolved, showing response rates to the therapy lower than those obtained for *A. fumigatus* [1,2]. In the clinical arena, although scarce, there are case reports that demon-

strate the efficacy of echinocandins, that is, CFG [12] and MFG [13] but in the absence of clinical data on the use of AFG as therapy of invasive aspergillosis caused by *A. terreus*, we have studied its *in vitro* activity trying to correlate it with the *in vivo* efficacy in a murine model of disseminated aspergillosis. To our knowledge, this is the first study on the efficacy of AFG in experimental invasive infection by *A. terreus*. Our *in vitro* studies revealed very low AFG MECs against *A. terreus*, with values even lower than those obtained by other authors [14]. However, time-kill studies have demonstrated fungistatic activity of AFG against *A. terreus* isolates, already described in previous studies [15]. In spite of the *in vitro* killing data, we observed a dose-dependent *in vivo* efficacy of AFG. In our study, for one of the two strains tested only AFG at 10 mg/kg significantly prolonged mice survival. Although AFG at both doses reduced the fungal load with respect to untreated control groups, the fungal load in kidney was reduced better with 10 mg/kg than with 5 mg/kg. In spite of the marked fungal burden reduction obtained, a significant decrease in

galactomannan serum levels was not noticed. This phenomenon was also observed in infections by other *Aspergillus* spp. suggesting that this could be due to the fungistatic activity of echinocandins against *Aspergillus* spp. and consequently the levels of circulating galactomannan being maintained [5]. Several studies on animal models have quantified galactomannan antigen for monitoring treatment. However, a reduction in galactomannan levels is rarely detected even when reduction in fungal loads have been found using other methodologies, such as quantification of CFUs by culturing tissue homogenates, or quantification of DNA by real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) [16,17]. For this reason both procedures, CFUs and RT-PCR, are more informative of the progression of the disease than galactomannan detection, at least in experimental set ups but both methods have limitations. Homogenization of tissues for CFU determination can alter the viability of fungal cells underestimating the burden or disrupt the mycelia overestimating the results while quantitative PCR has a low limit of detection but results are not linked to the viability of the cells. Therefore, comparative studies have shown that both techniques are equivalently valid for the determination of fungal load in animal models [18]. In this study, the assayed doses of AFG achieved serum levels of this drug higher than MECs for the both strains with the subsequent efficacy. Our results with AFG 5 mg/kg against systemic *A. terreus* have shown similar efficacy to that previously reported with posaconazole 5 mg/kg BID and with AFG 10 mg/kg similar to that reported with posaconazole 20 mg/kg or with VRC 25 mg/kg [19] in murine models. Overall, the observed efficacy of AFG against systemic *A. terreus* and the previous efficacy shown by CFG and MFG [20,21] indicates a potential usefulness of echinocandins in fighting this infection. The low enzymatic degradation and low drug-drug interactions of AFG [8] relative to other echinocandins, suggest the potential use of this antifungal drug in the treatment of *A. terreus* infections.

Declaration of interest

The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and the writing of the paper.

References

- Pastor FJ, Guarro J. Treatment of *Aspergillus terreus* infections: a clinical problem not yet resolved. *Int J Antimicrob Agents* 2014; **44**: 281–289.
- Steinbach WJ, Marr KA, Anaissie EJ et al. Clinical epidemiology of 960 patients with invasive aspergillosis from the PATH Alliance registry. *J Infect* 2012; **65**: 453–464.
- Steinbach WJ, Benjamin DK, Jr, Kontoyiannis DP et al. Infections due to *Aspergillus terreus*: a multicenter retrospective analysis of 83 cases. *Clin Infect Dis* 2004; **39**: 192–198.
- Planche V, Ducroz S, Alanio A et al. *In vitro* combination of anidulafungin and voriconazole against intrinsically azole-susceptible and-resistant *Aspergillus* spp. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; **56**: 4500–4503.
- Calvo E, Pastor FJ, Mayayo E et al. Efficacy of anidulafungin against *Aspergillus niger* *in vitro* and *in vivo*. *Int J Antimicrob Agents* 2011; **38**: 360–363.
- Calvo E, Pastor FJ, Mayayo E et al. *In vitro* activity and *in vivo* efficacy of anidulafungin in murine infections by *Aspergillus flavus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; **55**: 1290–1292.
- Lewis RE, Liao G, Hou J et al. Comparative *in vivo* dose-dependent activity of caspofungin and anidulafungin against echinocandin-susceptible and -resistant *Aspergillus fumigatus*. *J Antimicrob Chemother* 2011; **66**: 1324–1331.
- Sucher AJ, Chahine EB, Balcer HE. Echinocandins: the newest class of antifungals. *Ann Pharmacother* 2009; **43**: 1647–1657.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi*. Approved standard, M38-A2, 2nd ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standard Institute, 2008.
- Cantón E, Pemán J, Hervás D et al. Examination of the *in vitro* fungicidal activity of echinocandins against *Candida lusitanae* by time-killing methods. *J Antimicrob Chemother* 2013; **68**: 864–868.
- Andes D, Diekema DJ, Pfaller MA et al. *In vivo* pharmacodynamic characterization of anidulafungin in a neutropenic murine candidiasis model. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; **52**: 539–550.
- Walter J, Sobottka I, Roigers X et al. Invasive aspergillosis caused by *Aspergillus terreus* in a living donor liver transplant recipient successfully treated by caspofungin. *Mycoses* 2011; **54**: e220–222.
- Tokimatsu I, Kushima H, Iwata A et al. Invasive pulmonary aspergillosis with hematological malignancy caused by *Aspergillus terreus* and *in vitro* susceptibility of *A. terreus* isolate to micafungin. *Intern Med* 2007; **46**: 775–779.
- Lass-Flörl C, Perkhofers S. *In vitro* susceptibility-testing in *Aspergillus* species. *Mycoses* 2008; **51**: 437–446.
- Pastor FJ, Guarro J. Anidulafungin: experimental therapy of fungal infections in animal models. *Rev Iberoam Micol* 2008; **25**: 119–123.
- Arendrup MC, Perkhofers S, Howard SJ et al. Establishing *in vitro-in vivo* correlations for *Aspergillus fumigatus*: the challenge of azoles versus echinocandins. *Antimicrob Agents Chemother*; **52**: 3504–3511.
- Scotter JM, Chambers ST. Comparison of galactomannan detection, PCR-enzyme-linked immunosorbent assay, and real-time PCR for diagnosis of invasive aspergillosis in a neutropenic rat model and effect of caspofungin acetate. *Clin Diagn Lab Immunol* 2005; **12**: 1322–1327.
- Clemons KV, Stevens DA. Conventional or molecular measurement of *Aspergillus* load. *Med Mycol* 2009; **47**(Suppl 1): S132–S137.
- Salas V, Pastor FJ, Sutton DA et al. MIC values of voriconazole are predictive of treatment results in murine infections by

- Aspergillus terreus* species complex. *Antimicrob Agents Chemother* 2013; 57: 1532–1534.
20. Bowman JC, Abruzzo GK, Flattery AM et al. Efficacy of caspofungin against *Aspergillus flavus*, *Aspergillus terreus*, and *Aspergillus nidulans*. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50: 4202–4205.
21. Warn PA, Morrissey G, Morrissey J et al. Activity of micafungin (FK463) against an itraconazole-resistant strain of *Aspergillus fumigatus* and a strain of *Aspergillus terreus* demonstrating in vivo resistance to amphotericin B. *J Antimicrob Chemother* 2003; 51: 913–919.

4.3. Terapia con voriconazol y posaconazol sobre una infección experimental por *Candida lusitaniae*.

Voriconazole and posaconazole therapy for experimental *Candida lusitaniae* infection.

Sanchis M, Guarro J, Sutton DA, Fothergill AW, Wiederhold N, Capilla J.

Diagnostic Microbiology and Infectious Disease 2016, 84: 48-51.



Mycology

Voriconazole and posaconazole therapy for experimental *Candida lusitanae* infection

Marta Sanchis ^a, Josep Guarro ^a, Deanna A. Sutton ^b, Annette W. Fothergill ^b,
Nathan Wiederhold ^b, Javier Capilla ^{a,*}

^a Unitat de Microbiologia, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, IISPV, Universitat Rovira i Virgili, Reus, Tarragona, Spain

^b Fungus Testing Laboratory, University of Texas Health Science Center, San Antonio, TX, USA

ARTICLE INFO

Article history:

Received 22 June 2015

Received in revised form 10 September 2015

Accepted 11 September 2015

Available online 18 September 2015

Keywords:

Voriconazole

Posaconazole

Candida lusitanae

Antifungal

Fungal infections

Animal model

ABSTRACT

The in vitro activity of posaconazole (PSC) and voriconazole (VRC) was tested by using time-kill studies against 3 strains of *Candida lusitanae*. Both drugs showed fungistatic activity against all strains. The efficacy of those compounds was evaluated by reducing kidney fungal burden and by determining (1→3)-β-D-glucan serum levels in a murine model of invasive infection of *C. lusitanae*. The therapies tested were VRC at 10, 25, or 40 mg/kg/day and PSC at 5, 12.5, or 20 mg/kg/twice a day. All the dosages showed efficacy in a dose-dependant manner being high doses of both antifungals able to sterilize some kidneys after 10 days. With the exception of the strain FMR 9474, against which PSC was more effective than VRC, no differences in reducing tissue burden were found between the treatments. All doses of both antifungals were able to significantly reduce (1→3)-β-D-glucan serum levels with no significant differences between treatments and between the same doses of both drugs.

© 2016 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Invasive candidiasis (IC) is an important cause of death, especially in the critical care setting. Recommendations for the treatment of IC in neutropenic patients include the usage of echinocandins along with liposomal formulations of amphotericin B (Pappas et al., 2009), while other studies recommend caspofungin (CFG) or micafungin as the first choice and anidulafungin or liposomal formulations of amphotericin B as alternatives (Ullmann et al., 2012). Fluconazole (FLC), once considered gold standard in the treatment of candidemia, is considered an alternative only when patients have not been recently exposed to azoles. *Candida lusitanae* is an emerging opportunistic nosocomial pathogen causing candidemia with attributed incidence around 1–2% (Atkinson et al., 2008; Dimopoulos et al., 2008). Little information is available on the therapy against infections by this fungus, and although it seems to be susceptible in vitro to most antifungal agents, resistance to FLC has been reported (Lockhart et al., 2012). Clinical failure has also been associated with the ability to develop resistance to amphotericin B (AMB) and CFG during the course of the therapy (Atkinson et al., 2008; Desnos-Ollivier et al., 2011).

Posaconazole (PSC) and voriconazole (VRC) have shown in vitro activity against most *Candida non-albicans* species including *C. lusitanae* (Espinel-Ingroff et al., 2014), and their efficacy has been demonstrated in murine models of IC caused by *C. krusei*, *C. tropicalis*, and *C. glabrata*

(Majithiya et al., 2009; Mariné et al., 2009, 2010; Spreghini et al., 2008). Based on clinical experience, some authors consider VRC an option for initial empirical treatment of IC by *Candida* spp. in febrile neutropenic patients (Nucci et al., 2013; Ullmann et al., 2012). There are very little clinical data available about the use of PSC in this setting, although case reports in nonneutropenic patients and prophylaxis therapy in patients with neutropenia suggest that PSC may be an alternative therapy (Nucci et al., 2013; Ullmann et al., 2012). The aim of the present study was to determine the activity of PSC and VRC against 3 clinical strains of *C. lusitanae* using time-kill studies and their in vivo efficacy in a neutropenic murine model of disseminated candidiasis.

2. Materials and methods

2.1. Fungal isolates

Three clinical isolates of *C. lusitanae* (FMR 9474, UTHSCSA DI15-25, and UTHSCSA DI15-26) were included in the study. All strains were identified by comparing their large-subunit ribosomal DNA sequences with that of the type strain (Sandoval-Denis et al., 2013). MICs of PSC and VRC were determined by according to the methods in the CLSI M27-A3 standard (CLSI, 2008).

2.2. Inocula preparation

Inocula for in vitro and in vivo assays were obtained from potato dextrose agar (PDA) cultures after 24 h of incubation at 35 °C. Cultures

* Corresponding author. Tel.: +34-977-759381; fax: +34-977-759322.
E-mail addresses: javier.capilla@urv.cat, kpilqu@yahoo.es (J. Capilla).

Table 1

PSC and VRC serum levels determined on day 11 postinfection, 24 h after the last dosing of both drugs in neutropenic mice infected with 1×10^4 CFU/animal of *C. lusitanae* (strain UTHSCSA DI15-25).

Antifungal dose (mg/kg/day)	Serum level ($\mu\text{g/mL}$), mean \pm SD	
	PSC	VRC
10	2 \pm 0.25	2.89 \pm 0.55
25	4.77 \pm 0.36	5.37 \pm 0.32
40	6.08 \pm 0.35	7.77 \pm 0.84

were scraped off with a sterile loop, suspended in sterile saline, and adjusted to the desired concentration by hemocytometer count. Viability of inocula was confirmed by plating 10-fold dilutions onto PDA plates and counting the number of colony-forming units.

2.3. Time-kill studies

Time-kill studies for PSC and VRC were carried out as previously reported (Cantón et al., 2008) with modifications. In brief, drugs as pure powder were prepared at concentrations of 0.03, 0.12, 0.5, 1, 2, 8, and 32 $\mu\text{g/mL}$ of each drug in standard RPMI 1640 medium with final volumes of 9 mL. Drug dilutions and controls (drug free) were inoculated with 1 mL of the starting inoculum consisting on 5×10^5 CFU/mL and then incubated at 35 °C, and the number of colony-forming units per milliliter was determined at 0, 2, 4, 6, 8, 24, and 48 h. All assays were performed in duplicate.

2.4. Animals

Male 4-week-old OF1 mice weighing 30 g (Charles River, Criffa S.A., Barcelona, Spain) were used. All animals were housed under standard conditions, and care procedures were supervised and approved by the Universitat Rovira i Virgili Animal Welfare and Ethics Committee. Mice were immunosuppressed 1 day before the infection by administration of a single intraperitoneal (i.p.) injection of 200 mg/kg of cyclophosphamide plus a single intravenous (i.v.) injection of 150 mg/kg of 5-fluorouracil (Graybill et al., 1998).

2.5. Infection

Animals were challenged by administering 0.2 mL i.v. of a yeast suspension containing 1×10^4 CFU (UTHSCSA DI15-25 and UTHSCSA DI15-26) or 1×10^8 CFU (FMR 9474), via the lateral tail vein. The strain FMR 9474 required a higher inoculum size than the other strains due to its previously reported low virulence (Sandoval-Denis et al., 2013). No death was recorded with the inoculum used (data not shown).

2.6. Treatments

Groups of 8 mice infected with the isolate UTHSCSA DI15-25 received PSC (Noxafil; Schering-Plough, Hertfordshire, United Kingdom), at 5, 12.5, or 20 mg/kg twice daily (BID), or VRC (Vfend; Pfizer S.A., Madrid, Spain) at 10, 25, or 40 mg/kg once a day (QD), both drugs given orally by gavage (p.o.) (Oakley et al., 1997; Warn et al., 2006). Once the efficacy of both drugs was demonstrated at low doses in the escalation study, a second experiment was carried out by infecting mice with 2 additional strains in order to minimize the use of animals. The strains in this assay were FMR 9474 and UTHSCSA DI15-26 with treatments at the low doses established in the initial experiments. An untreated control group was included in all experiments. From 3 days before infection, mice treated with VRC were given diluted (1:2) grapefruit juice instead of water in order to inhibit the metabolism of this agent in the mice (Sugar and Liu, 2000). Treatments began 24 h after challenge and lasted for 10 days. To prevent bacterial infections, all animals received ceftazidime at 5 mg/kg subcutaneously once daily during the experimental period. The efficacy of both triazoles was evaluated by reduction of tissue burden in kidneys and by determining (1 \rightarrow 3)- β -D-glucan serum levels.

2.7. Tissue burden

Mice were euthanized on day 11 postinfection, 24 h after the last dose was administered. Kidneys were aseptically removed, weighed, and homogenized in 1 mL of sterile saline. Then 10-fold dilutions of the homogenates were placed on PDA plates and incubated for 24 h at 35 °C for CFU/g determination.

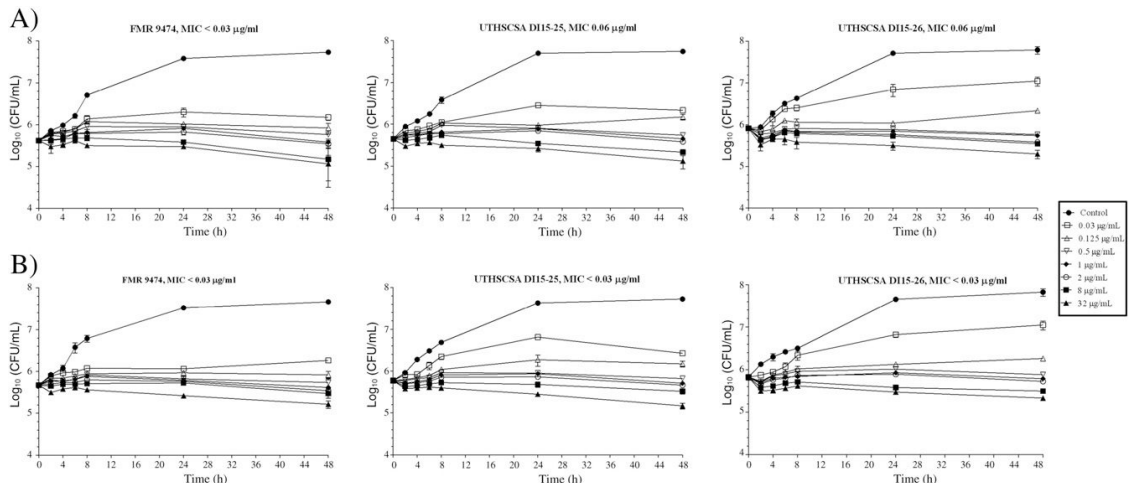


Fig. 1. Time-killing kinetics assays of PSC (A) and VRC (B) against 3 strains of *C. lusitanae* 0.03 $\mu\text{g/mL}$ (\square), 0.125 $\mu\text{g/mL}$ (\triangle), 0.5 $\mu\text{g/mL}$ (∇), 1 $\mu\text{g/mL}$ (\blacklozenge), 2 $\mu\text{g/mL}$ (\circ), 8 $\mu\text{g/mL}$ (\blacksquare), 32 $\mu\text{g/mL}$ (\blacktriangle), control (\bullet).

2.8. Serum levels of drugs and (1→3)-β-D-glucan

Control and treated mice infected with the isolate UTHSCSA DI15-25 were anesthetized by inhalation of isoflurane on day 11 postinfection 24 h after the last dose was administered, and 1 mL of blood from each mouse was extracted by cardiac puncture. Serum from centrifuged blood samples was kept frozen at -20°C until needed. Animals were then euthanized by cervical dislocation. Serum levels of PSC and VRC were determined by bioassay methodology (Calvo et al., 2011), and (1→3)-β-D-glucan was measured using the Fungitell kit (Associates of Cape Cod, East Falmouth, MA, USA). Mice infected with UTHSCSA DI15-26 and FMR 9474 were only used for determining (1→3)-β-D-glucan serum.

2.9. Statistics

Colony counts were analyzed using the Mann–Whitney U test using Graph Pad Prism 4.0 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Differences were considered statically significant at a P value of <0.05 . The normality of the (1→3)-β-D-glucan serum levels was assessed using the Kolmogorov–Smirnov test, and differences in (1→3)-β-D-glucan levels between treatments and strains were assessed for significance using the Student's t test.

3. Results and discussion

We evaluated the in vitro activity, killing kinetics, and the in vivo efficacy of PSC and VRC against IC by *C. lusitanae*. Three strains of *C. lusitanae* were selected with the most common MIC values for both drugs against this species (Espinel-Ingroff et al., 2014). MICs of PSC were $<0.03\ \mu\text{g}/\text{mL}$ for the strain FMR 9474 and $0.06\ \mu\text{g}/\text{mL}$ for the strains UTHSCSA DI15-25 and UTHSCSA DI15-26, while VRC MICs were $<0.03\ \mu\text{g}/\text{mL}$ against all 3 strains. Epidemiological cut-off values (ECVs) for *C. lusitanae* have recently been established at $0.06\ \mu\text{g}/\text{mL}$ for both PSC and VRC (Espinel-Ingroff et al., 2014); therefore, the MIC values used in the present study were equal to or lower than the ECVs for both drugs. In addition, the 3 doses of PSC and VRC assayed showed therapeutic serum concentrations above the corresponding MIC values and increased with dose escalation (Table 1). The time-killing assay showed a fungistatic activity against the 3 isolates tested, with a reduction of $\leq 0.5\ \log_{10}$ units from the starting inoculum (Fig. 1). This demonstrates a similar death rate to that previously described for other *Candida non-albicans* species (Spreghini et al., 2007; Szabó et al., 2009, 2010). Other authors have reported a fungicidal effect of PSC against *Candida inconspicua*, *Candida kefyr*, *Candida krusei*, and also *C. lusitanae* (Sóczó et al., 2007) contrarily to our results. In the present study, PSC and VRC showed efficacy against infections by *C. lusitanae*, with all treatments being able to significantly reduce the fungal burden in animals infected with any of the strains in comparison to their respective controls ($P \leq 0.0002$) (Fig. 2). The dose escalation study showed that both PSC and VRC reduced fungal loads significantly in mice infected with the strain UTHSCSA DI15-25, the higher doses of both drugs being more effective than the lower doses ($P \leq 0.004$) and achieving clearance in some kidneys after long time therapy (10 days). In a similar study, our group reported the experimental efficacy of CFG, AMB, and FLC against *C. lusitanae* being AMB the most effective in reducing fungal loads in this particular study (Sandoval-Denis et al., 2013). In the current study, our in vivo data showed that PSC and VRC reduced fungal load in kidney by approximately $3\ \log_{10}$, as AMB previously did (Sandoval-Denis et al., 2013). Detection of (1→3)-β-D-glucan is used as a biomarker in the diagnosis of fungal infections in experimental and clinical studies (Jajjakul et al., 2012) because it is the main structural component of the majority of fungal cell walls including *Candida* spp. In this study, both drugs at $10\ \text{mg}/\text{kg}/\text{day}$ were significantly effective ($P = 0.0002$) in reducing fungal load following infection with FMR 9474 and UTHSCSA DI15-26. Significant differences were observed between treatments ($P = 0.0003$) only in the infection with FMR 9474, with

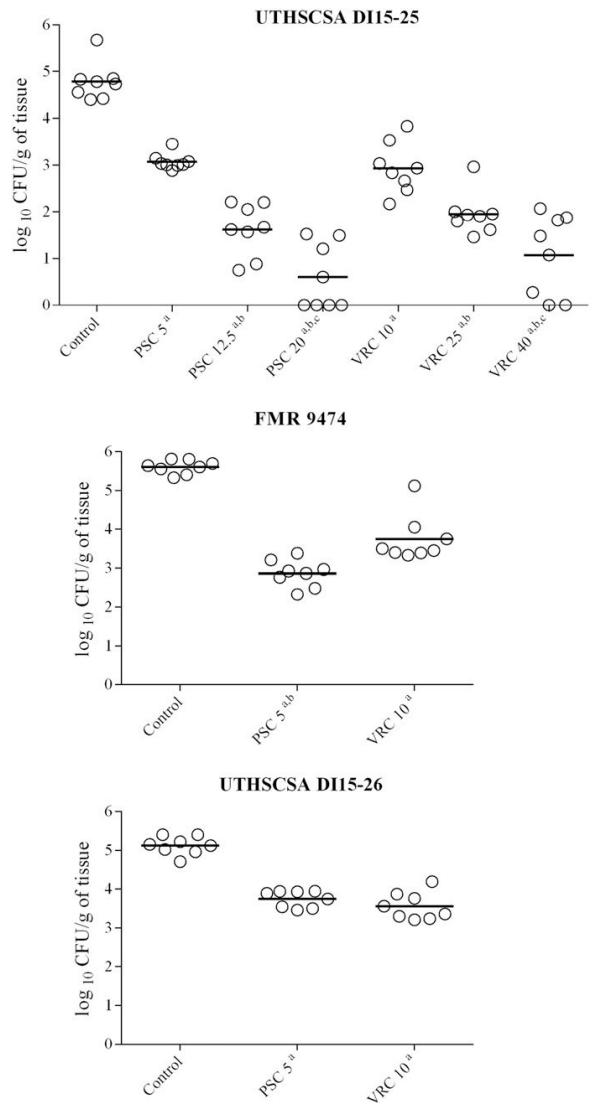


Fig. 2. Effects of antifungal treatment on colony counts on kidney from neutropenic mice 11 days postinfection. Mice were infected with 1×10^8 CFU/animal of *C. lusitanae* FMR 9474 or 1×10^8 CFU/animal of strains UTHSCSA DI15-26 and UTHSCSA DI15-25. Animals received PSC at 5, 12.5, or 20 mg/kg BID and VRC at 10, 25, or 40 mg/kg QD both administered orally by gavage. ^a $P < 0.05$ versus control; ^b $P < 0.05$ versus VRC or PSC 10; ^c $P < 0.05$ versus VRC or PSC 25.

PSC being significantly more effective than VRC ($P \geq 0.001$). We observed that a decrease in fungal load, determined by culturing organ homogenates, correlated with a decrease in (1→3)-β-D-glucan serum concentrations in a dose–response way. Despite this correlation, colony-forming units were undetectable in the kidneys of 50% and 25% of animals receiving 40 mg/kg/day of PSC or VRC, respectively; however, (1→3)-β-D-glucan levels remained above $\geq 80\ \text{pg}/\text{mL}$ (Fig. 3), which is the cut-off established for humans. This might be due to the fungistatic activity of both drugs against *Candida* spp. and the consequent remaining levels of glucans or residual fungal burden in other tissues. This phenomenon has been similarly reported by other authors testing FLC against experimental *C. krusei* and *Acremonium* infections (Fernández-Silva et al., 2013; Ostrosky-Zeichner et al., 2009). This discrepancy indicates that the usefulness of (1→3)-β-D-glucan as a

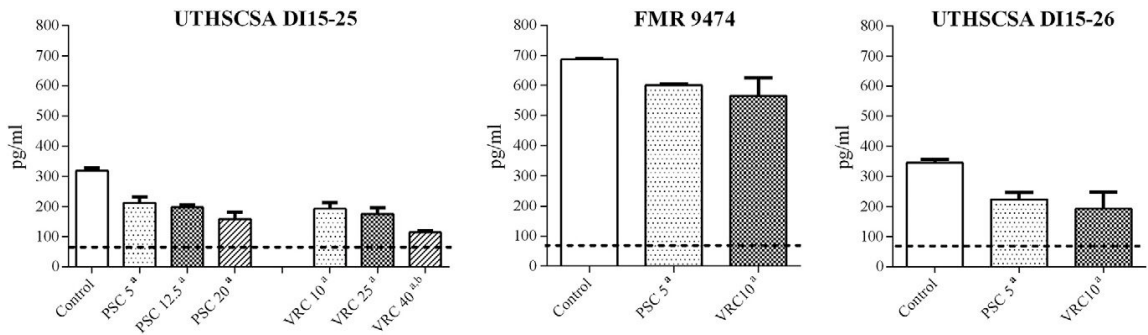


Fig. 3. Serum levels of (1–3)- β -D-glucan in mice 11 days after systemic infection with *C. lusitanae* (strains FMR 9474, UTHSCSA DI15-26, and UTHSCSA DI15-25). Animals received PSC at 5, 12.5, or 20 mg/kg BID or VRC at 10, 25, or 40 mg/kg QD. Controls received no treatment. The horizontal line indicates the cut-off for positivity in humans (≥ 80 pg/ml). * $P < 0.05$ versus control; ^b $P < 0.05$ versus VRC 10.

prognostic marker of antifungal efficacy remains poorly known and should be explored.

In summary, our *in vivo* results suggest that PSC and VRC could be an option in the treatment of systemic *C. lusitanae* infections.

Conflicts of interest

None.

Funding

This project has been partially funded by the European Union's Seventh Framework Programme for research, technological development, and demonstration under grant agreement no. HEALTH-2013-INNOVATION-2-601963.

References

- Atkinson BJ, Lewis RE, Kontoyiannis DP. *Candida lusitanae* fungemia in cancer patients: risk factors for amphotericin B failure and outcome. *Med Mycol* 2008;46:541–6. <http://dx.doi.org/10.1080/13693780801968571>.
- Calvo E, Pastor FJ, Mayayo E, Guarro J. Efficacy of anidulafungin against *Aspergillus niger* *in vitro* and *in vivo*. *Int J Antimicrob Agents* 2011;38:360–3. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2011.06.008>.
- Cantón E, Pemán J, Valentín A, Bosch M, Espinel-Ingroff A, Gobernado M. Comparison of posaconazole and voriconazole *in vitro* killing against *Candida krusei*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2008;62:177–81. <http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2008.07.001>.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard-third edition, M27-A3. Wayne, PA: CLSI; 2008.
- Desnos-Ollivier M, Moquet O, Chouaki T, Guérin AM, Dromer F. Development of echinocandin resistance in *Clavispora lusitanae* during caspofungin treatment. *J Clin Microbiol* 2011;49:2304–6. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.00325-11>.
- Dimopoulos G, Ntziora F, Rachiotis G, Armaganidis A, Falagas ME. *Candida albicans* versus non-*albicans* intensive care unit-acquired bloodstream infections: differences in risk factors and outcome. *Anesth Analg* 2008;106:523–9. <http://dx.doi.org/10.1213/ane.0b013e3181607262>.
- Espinel-Ingroff A, Pfäller MA, Bustamante B, Cantón E, Fothergill A, Fuller J, et al. Multilaboratory study of epidemiological cutoff values for detection of resistance in eight *Candida* species to fluconazole, posaconazole, and voriconazole. *Antimicrob Agents Chemother* 2014;58:2006–12. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.02615-13>.
- Fernández-Silva F, Capilla J, Mayayo E, Sutton DA, Hernández P, Guarro J. Evaluation of the efficacies of amphotericin B, posaconazole, voriconazole, and anidulafungin in a murine disseminated infection by the emerging opportunistic fungus *Sarocladium (Acremonium) kilense*. *Antimicrob Agents Chemother* 2013;57:6265–9. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.01484-13>.
- Graybill JR, Bocanegra R, Najvar LK, Loebenberg D, Luther MF. Granulocyte colony-stimulating factor and azole antifungal therapy in murine aspergillosis: role of immune suppression. *Antimicrob Agents Chemother* 1998;42:2467–73.
- Jajkual S, Vazquez JA, Swanson RN, Ostrosky-Zeichner L. (1,3)- β -D-glucan as a prognostic marker of treatment response in invasive candidiasis. *Clin Infect Dis* 2012;55:521–6. <http://dx.doi.org/10.1093/cid/cis456>.
- Lockhart SR, Iqbal N, Cleveland AA, Farley MM, Harrison LH, Bolden CB, et al. Species identification and antifungal susceptibility of *Candida* bloodstream isolates from population-based surveillance in two US cities. *J Clin Microbiol* 2012;50:3435–42. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.01283-12>.
- Majithiya J, Sharp A, Parmar A, Denning DW, Warn PA. Efficacy of isavuconazole, voriconazole and fluconazole in temporarily neutropenic murine models of disseminated *Candida tropicalis* and *Candida krusei*. *J Antimicrob Chemother* 2009;63:161–6. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkn431>.
- Mariné M, Pastor FJ, Serena C, Guarro J. Efficacy of triazoles in a murine disseminated infection by *Candida krusei*. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;53:3585–8. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00293-09>.
- Mariné M, Pastor FJ, Guarro J. Efficacy of posaconazole in a murine disseminated infection by *Candida tropicalis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2010;54:530–2. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.01136-09>.
- Nucci M, Thompson-Moya L, Guzman-Blanco M, Tiraboschi IN, Cortes JA, Echevarría J, et al. Recommendations for the management of candidemia in adults in Latin America. *Rev Iberoam Micol* 2013;30:179–88. <http://dx.doi.org/10.1016/j.riam.2013.06.001>.
- Oakley KL, Morrissey G, Denning DW. Efficacy of SCH-56592 in a temporarily neutropenic murine model of invasive aspergillosis with an itraconazole-susceptible and an itraconazole-resistant isolate of *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob Agents Chemother* 1997;41:1504–7.
- Ostrosky-Zeichner L, Paetznick VL, Rodriguez J, Chen E, Sheehan DJ. Activity of anidulafungin in a murine model of *Candida krusei* infection: evaluation of mortality and disease burden by quantitative tissue cultures and measurement of serum (1,3)- β -D-glucan levels. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;53:1639–41. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00955-08>.
- Pappas PG, Kauffman CA, Andes D, Benjamin DK, Calandra TF, Edwards JE, et al. Clinical practice guidelines for the management of candidiasis: 2009 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 2009;48:503–35. <http://dx.doi.org/10.1086/596757>.
- Sandoval-Denis M, Pastor FJ, Capilla J, Sutton DA, Fothergill AW, Guarro J. *In vitro* pharmacodynamics and *in vivo* efficacy of fluconazole, amphotericin B and caspofungin in a murine infection by *Candida lusitanae*. *Int J Antimicrob Agents* 2013;43:161–4. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2013.10.024>.
- Sóczó G, Kardos G, McNicholas PM, Balogh E, Gergely L, Varga I, et al. Correlation of posaconazole minimum fungicidal concentration and time kill test against nine *Candida* species. *J Antimicrob Chemother* 2007;60:1004–9.
- Spreghini E, Maida CM, Milici ME, Scalise G, Barchiesi F. Posaconazole activity against *Candida glabrata* after exposure to caspofungin or amphotericin B. *Antimicrob Agents Chemother* 2007;52:513–7.
- Spreghini E, Maida CM, Tomassetti S, Orlando F, Giannini D, Milici ME, et al. Posaconazole against *Candida glabrata* isolates with various susceptibilities to fluconazole. *Antimicrob Agents Chemother* 2008;52:1929–33. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00130-08>.
- Sugar AM, Liu XP. Effect of grapefruit juice on serum voriconazole concentration in the mouse. *Med Mycol* 2000;38:209–12. <http://dx.doi.org/10.1080/mmy.38.3.209.12>.
- Szabó Z, Szilágyi J, Tavanti A, Kardos G, Rozgonyi F, Bayegan S, et al. *In vitro* efficacy of 5 antifungal agents against *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* as determined by time-kill methodology. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2009;64:283–8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2009.03.011>.
- Szabó Z, Borbely A, Kardos G, Somogyvari F, Kemény-Beke A, Asztalos L, et al. *In vitro* efficacy of amphotericin B, 5-fluorocytosine, fluconazole, voriconazole and posaconazole against *Candida dubliniensis* isolates using time-kill methodology. *Mycoses* 2010;53:196–9. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1439-0507.2009.01705.x>.
- Ullmann AJ, Akova M, Herbrecht R, Viscoli C, Arendrup MC, Arikan-Akdagli S, et al. ESCMID Fungal Infection Study Group. ESCMID guideline for the diagnosis and management of *Candida* diseases 2012: adults with haematological malignancies and after haematopoietic stem cell transplantation (HCT). *Clin Microbiol Infect* 2012;18:53–67. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1439-0507.2009.01705.x>.
- Warn PA, Sharp A, Mosquera J, Spickermann J, Schmitt-Hoffmann A, Heep M, et al. Comparative *in vivo* activity of BAL4815, the active component of the prodrug BAL8557, in a neutropenic murine model of disseminated *Aspergillus flavus*. *J Antimicrob Chemother* 2006;58:1198–207.

4.4. Terapias antifúngicas en infecciones murinas causadas por *Candida kefyr*.

Antifungal therapies in murine infections by *Candida kefyr*.

Sanchis M, Martin-Vicente A, Capilla J, Guarro J.

Mycoses 2016, 59: 253-258.

Antifungal therapies in murine infections by *Candida kefyr*

Marta Sanchis, Adela Martin-Vicente, Javier Capilla and Josep Guarro

Unitat de Microbiologia, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, IISPV, Universitat Rovira i Virgili, Reus, Tarragona, Spain

Summary

Candida kefyr is an emerging pathogen able to cause disseminated infection, especially in immunocompromised patients. Although guidelines for the treatment of invasive candidiasis have been published, no specific recommendations against *C. kefyr* are available. We determine the *in vitro* killing activity of amphotericin B (AMB), fluconazole (FLC) and caspofungin (CFG) as well as their efficacy in a murine model of systemic infection by two *C. kefyr* strains. Time-kill curves of AMB, FLC and CFG were determined in final volumes of 10 ml containing the assayed drugs ranged from 0.03 to 32 $\mu\text{g ml}^{-1}$ at different time points and efficacy of the drugs was evaluated in a systemic model of candidiasis, conducted in immunosuppressed mice, through survival, (1 \rightarrow 3)- β -D-glucan levels in serum and fungal load in kidneys. AMB and CFG showed fungicidal and FLC fungistatic activity against both isolates. The three drugs were able to reduce fungal burden in kidneys and (1 \rightarrow 3)- β -D-glucan concentration in serum of infected mice, with CFG showing the highest efficacy, followed by FLC. In conclusion, CFG showed efficacy over AMB and FLC against the systemic candidiasis by *C. kefyr*. The established epidemiological cut-off for anidulafungin seems the best indicator of outcome for echinocandins.

Key words: Caspofungin, amphotericin B, fluconazole, *Candida kefyr*, antifungals, murine model.

Introduction

Candida kefyr is an emerging nosocomial pathogen that causes bloodstream infections in immunosuppressed patients who have haematological malignancies, especially in those undergoing chemotherapy.¹ This fungus is commonly present in several dairy products such as fermented milk and cheeses and has been suggested that this infection may be linked to dietary habits.² Echinocandins such as micafungin (MFG) or caspofungin (CFG) are the first choice treatments for invasive candidiasis (IC) in neutropenic patients, whereas other recommendations include liposomal amphotericin B (LAMB) or fluconazole (FLC) when the

isolates are susceptible *in vitro* to these antifungals.³ There is little data available on the antifungal susceptibility of *C. kefyr*. Some authors have reported high *in vitro* activity of the available antifungal compounds², with the exception of amphotericin B (AMB) for which high MICs have been reported^{1,4,5}; however, these high MICs have not been confirmed in other studies.² There is also little clinical experience on the treatment of *C. kefyr* and practically all the available antifungal drugs have been used to treat IC by this fungus with different outcomes.⁶ A rapid emergence of resistance to CFG has been reported during treatment, resulting in therapeutic failure that may be linked to the presence of mutations in the hot spot (HS) regions of the *FKS1* gene.⁷ Due to lack of recommended treatments for *C. kefyr* infections, animal models are a useful tool that can help to elucidate the most appropriate treatment for this emerging disease.⁸

In this study, the killing kinetics of AMB, FLC and CFG, common drugs used against *C. kefyr* infections, were evaluated against two strains of this fungus. Then, the efficacy of those drugs was assayed in a

Correspondence: J. Guarro, Unitat de Microbiologia, Facultat de Medicina, Universitat Rovira i Virgili, Carrer Sant Llorenç, 21, 43201 Reus, Spain.
Tel.: +977759359. Fax: +977-759322.
E-mail: josep.guarro@urv.cat

Submitted for publication 30 July 2015
Revised 21 December 2015
Accepted for publication 22 December 2015

neutropenic murine model of disseminated infection by *C. kefyr*. The two hot spot regions, i.e. hot spot 1 (HS1) and hot spot 2 (HS2) of the *FKS1* gene were sequenced to detect possible mutations.

Materials and methods

Fungal isolates and inoculum

Two clinical isolates of *C. kefyr* (FMR 11743 and FMR 11745) with known susceptibility to AMB, FLC, CFG, anidulafungin (AFG) and MFG were included in the study. MICs were determined by triplicate using the broth microdilution method according to Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) guidelines for yeasts.⁹ Table 1 shows the MICs for the drugs tested against both strains.¹⁰ Strains were identified by sequencing the internal transcriber spacer region and the D1-D2 domains of the DNA and comparing the sequences with those of the type strain of *C. kefyr* (accession number: NR_111251 and AY497692 respectively). Both strains were grown on potato dextrose agar (PDA) plates and incubated at 35 °C for 24 h. Inocula for *in vitro* and *in vivo* assays were prepared as previously described.¹¹

Time-kill assay

Time-kill curves of AMB, FLC and CFG were performed following previous studies¹² with some modifications. Briefly, 1 ml of a yeast suspension containing 5×10^6 CFU ml⁻¹ was added to tubes with 9 ml of RPMI containing 0.03, 0.12, 0.5, 1, 2, 8 or 32 µg ml⁻¹ of each drug. At different time points, i.e. 0, 2, 4, 6, 8, 24 and 48 h post inoculation, aliquots of 100 µl of each tube were removed, diluted and placed onto PDA for CFU/ml determination. A CFU decrease of $\geq 99.9\%$ or ≥ 3 log₁₀ units compared to the starting inoculum was considered fungicidal, whereas a reduction of $< 99.9\%$ or < 3

Table 1 Strains of *C. kefyr* included in the study and their MIC values obtained using reference CLSI method.⁹ Epidemiological cut-off values (ECV) of AMB, FLC, CFG, AFG and MFG are shown.¹⁰

Strain	MIC (µg ml ⁻¹) [ECV]				
	AMB	FLC [1]	CFG [0.03]	AFG [0.12]	MFG [0.12]
FMR 11743	1	0.12	0.25	0.06	0.06
FMR 11745	1	0.12	0.25	0.12	0.25

AMB, amphotericin B; FLC, fluconazole; CFG, caspofungin; AFG, anidulafungin; MFG, micafungin.

log₁₀ units was considered fungistatic.¹² The limit of detection was 50 CFU ml⁻¹. All time-kill curve studies were performed in duplicate.

Infection

For the *in vivo* assay 64 four-week-old OF1 male mice (Charles River, Criffa S.A., Barcelona, Spain) weighing 30 g were used. Animals were housed under standard conditions with free access to food and water. Mice were immunosuppressed 1 day before infection by a single intraperitoneal (i.p.) injection of 200 mg kg⁻¹ of cyclophosphamide (Genoxal; Laboratories Funk S.A., Barcelona, Spain) plus a single intravenous (i.v.) injection of 150 mg kg⁻¹ of 5-fluorouracil (Fluorouracilo; Ferrer Farma S.A., Barcelona, Spain).¹³ Animal care procedures were supervised and approved by the Universitat Rovira i Virgili Animal Welfare and Ethics Committee. Mice were challenged i.v. via the lateral tail vein with 1×10^7 CFU of each isolate in 0.2 ml of sterile saline. This inoculum was selected based on previous studies that showed this concentration was able to produce an acute infection, however; no mortality was observed in any group (data not shown).

Treatments

Groups of eight immunosuppressed mice were randomly established for each strain and each treatment. Treatments consisted on AMB (Farmacia Xalabarder, Barcelona, Spain) administered at 0.8 mg kg⁻¹ once a day (QD) i.v., FLC (Diflucan; Vinci Farma, Madrid, Spain) administered at 25 mg kg⁻¹ twice daily (BID) orally by gavage or CFG (Cancidas; Merck & Co. Inc., Whitehouse Station, NJ, USA) at 5 mg kg⁻¹ i.p. QD. These doses were selected based on previous pharmacokinetic and experimental studies of invasive infections by *Candida* spp.^{14–16} All treatments were started 24 h after challenge and lasted for 10 days. Control animals received no treatment. To prevent bacterial infections, all animals received ceftazidime at 5 mg kg⁻¹ subcutaneously once daily. The efficacy of treatments was evaluated through fungal load reduction in kidney and by determining (1→3)-β-D-glucan levels in serum. For sera determinations, on day 10 post infection, 1 h after the last dose of treatment, four mice from each group were anaesthetised by inhalation of isoflurane and approximately 1 ml of blood from was extracted by cardiac puncture. Sera from centrifuged blood samples were kept frozen at -20 °C until needed. Drug levels were determined in four mice

from each group by bioassay¹⁷ and (1→3)-β-D-glucan by using the Fungitell kit (Associates of Cape Cod, East Falmouth, MA, USA) following manufacturer's instructions. Then, bleed and non-bleed animals (8 animals total) were killed by cervical dislocation and kidneys were aseptically removed, homogenised in 1 ml of sterile saline, serially 10-fold diluted and placed on PDA at 35 °C for 48 h for CFU g⁻¹ determination.

FKS1 sequence analysis

HS1 was amplified from genomic DNA of both *C. kefyri* strains included in the study using *FKS1* oligonucleotides HS1-fks-F (5'-GGTGGTTTATTCACCTCTACA-3'), and HS1-fks-R (5'-GCGTAGCCAAAGATTGAGCA-3'), as described previously.⁷ HS2 was amplified using the primers HS2-fks-F (5'-TGCTTCGTGGTGGTCGTATT-3') and HS2-fks-R (5'-ACTCAACAAAGAAGCAGAATAAA-3'), designed using Oligo Primer Analysis Software, for Windows (1267 Vondelpark, Colorado Springs, CO, USA). Amplification consisted of one cycle of 4 min at 96 °C, 40 cycles of 30 s at 94 °C, 30 s at 55 °C and 90 s at 74 °C, followed by one final cycle of 4 min at 74 °C. Lasergene SeqMan tool (DNASTAR, Inc., Madison, WI, USA) was used for checking the quality of the sequences and Mega (version 6)¹⁸ for alignment performance and sequence comparison. The sequences were compared with three reference wild-type *FKS* sequences (negative controls), i.e. *C. kefyri* ATCC 4922 (accession number KJ685792 (for HS2) and KJ685779 (for HS1)), *C. albicans* ATCC 90028 (GQ456066) and *C. glabrata* ATCC 90030 (HM366440) and also with a known *C. kefyri* *FKS* mutant (accession number KJ685787 (HS1)) (positive control for HS1 mutation).¹⁹ No positive control for HS2 mutation was used because of the lack of reference isolates with mutations in the mentioned hot spot. The *FKS1* sequences of FMR 11743 and FMR 11745 were deposited in GenBank under accession numbers KT070087 and KT070088 respectively.

Statistical analysis

Colony counts from tissue burden studies were analysed using the Mann–Whitney *U* test. The Kolmogorov–Smirnov test was carried out to determine the normal distribution of (1→3)-β-D-glucan serum levels so that they could be analysed using the *t*-test. The statistical analyses were made by using Graph Pad Prism 4.0 software for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Differences were considered statically significant at a *P* value <0.05.

Results and discussion

Time-kill studies showed fungicidal activity of AMB and CFG against both strains assayed while FLC showed fungistatic activity (Fig. 1). The fungicidal effect of AMB was reached at 18 h at concentrations of 2 µg ml⁻¹ for strain FMR 11745 and at 24 h at concentrations of 8 µg ml⁻¹ for strain FMR 11743. In the case of CFG, the fungicidal activity was observed after 8 h at concentrations of 32 µg ml⁻¹ against strain FMR 11743 and around 12 h for strain FMR 11745.

No mortality was recorded 30 days post infection in immunosuppressed mice (data not shown), however, high kidney affectation was detected in control animals, i.e. log₁₀ 7.38 and 7.25 CFU g⁻¹ after infection by FMR 11743 and FMR 11745 respectively (Fig. 2). Interestingly, in previous experimental infections by *C. kefyri* in immunocompetent mice, no mortality but high kidney involvement was obtained.²⁰ All treatments significantly reduced the fungal load in kidneys with respect to the control group against both strains (*P* < 0.05), CFG being the most effective in reducing burdens (*P* ≤ 0.0003 and ≤ 0.0148 in comparison to FLC and AMB respectively). In addition, FLC demonstrated higher efficacy than AMB in reducing fungal burden against both strains (*P* ≤ 0.0140).

Caspofungin was also the most effective drug in reducing the (1→3)-β-D-glucan serum levels, followed by AMB (Fig. 3). Serum levels of CFG, FLC and AMB on day 10 post infection, 1 h after the last dose, were 12.2 µg ml⁻¹ ± 0.53, 16.23 µg ml⁻¹ ± 0.93 and 6.52 µg ml⁻¹ ± 0.73, respectively, all above the corresponding MIC values for both strains.

The HS1 sequences of the two studied isolates were identical to the wild-type reference strains. The HS2 sequences were identical to *C. glabrata* ATCC 90030 and very similar to both echinocandin-susceptible *C. kefyri* ATCC 4922 and *C. albicans* ATCC 90028, with only a single amino acid modification (Table 2) which has not been related to reduction in CFG susceptibility.⁷

Until now no experimental data has been available on the *in vitro* killing kinetics or the *in vivo* efficacy of AMB, FLC and CFG in the treatment of IC by *C. kefyri*. The time-kill study showed fungicidal activity of CFG and AMB in a concentration-dependent manner, although reached at different concentrations depending on the strain tested. FLC showed fungistatic activity at any concentration assayed. Our results have demonstrated that the three drugs tested have shown a killing kinetics against *C. kefyri* similar to those previously reported for the same drugs against other

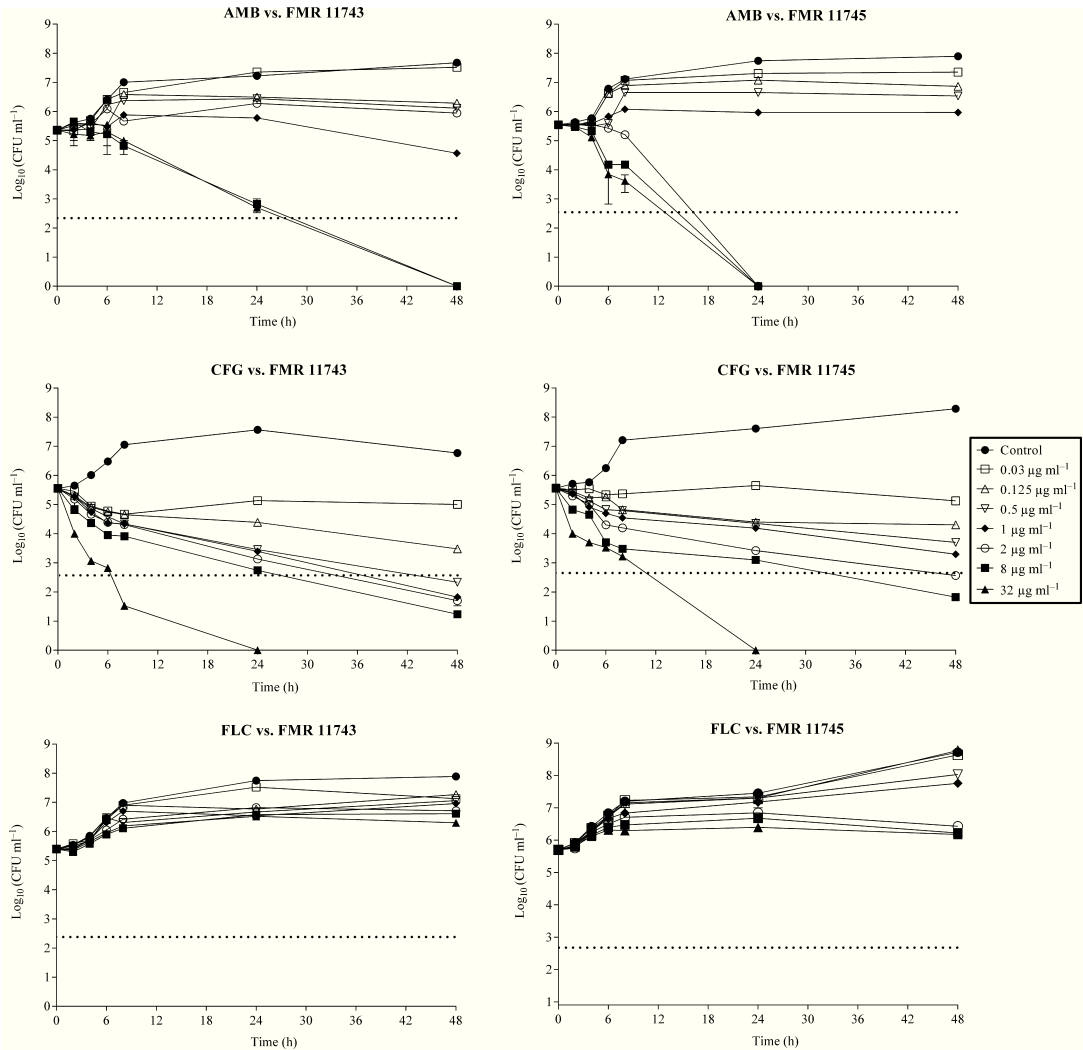


Figure 1 Time-killing kinetics assays of amphotericin B (AMB), caspofungin (CFG) and fluconazole (FLC) against two strains of *C. kefyr* (□) 0.03 µg ml⁻¹, (△) 0.125 µg ml⁻¹, (▽) 0.5 µg ml⁻¹, (◆) 1 µg ml⁻¹, (○) 2 µg ml⁻¹, (■) 8 µg ml⁻¹, (▲) 32 µg ml⁻¹, (●) control. Dotted line represents ≥99.9% growth reduction compared with that of the starting inoculum (fungicidal effect).

non-*albicans* *Candida* species.^{12,21–23} The *in vivo* study showed that all treatments were effective in reducing fungal load in kidney and (1→3)-β-D-glucan serum levels after disseminated infection by *C. kefyr*, CFG showing the highest efficacy followed by FLC and then AMB. These results agree with previous experimental data from testing other *Candida* species such as *C. parapsilosis* or *C. lusitanae* where CFG was the most effective treatment, followed by FLC and AMB.^{22,24} The fungal antigen (1→3)-β-D-glucan has proven to be a

good marker for early diagnosis of fungal infections but its usefulness for monitoring the progression of the infection remains doubtful. Our results showed correlation between the reduction of (1→3)-β-D-glucan and the reduction in viable yeasts in the target organ after the treatment with AMB and CFG, whereas such correlation was weaker with FLC. These discrepancies may be due precisely to the differential activity between the drugs, i.e. fungistatic vs. fungicidal. As clinical breakpoints against *C. kefyr* have not been

Figure 2 Effects of the antifungal treatment on fungal load in kidneys of neutropenic mice infected with *Candida kefyr*, strains FMR 11743 and FMR 11745, 10 days post infection. Animals received amphotericin B at 0.8 mg kg⁻¹ QD (AMB 0.8), fluconazole at 25 mg kg⁻¹ BID (FLC 50) or caspofungin at 5 mg kg⁻¹ QD (CFG 5). ^a*P* < 0.05 vs. control; ^b*P* < 0.05 vs. AMB 0.8; ^c*P* < 0.05 vs. FLC 50.

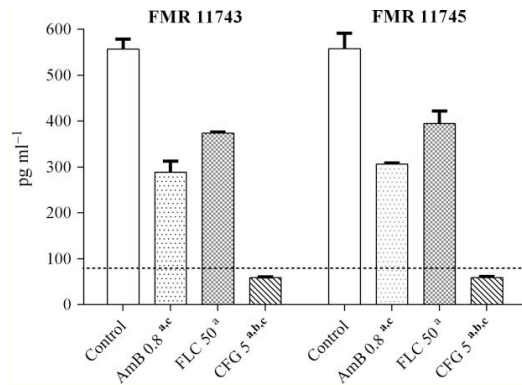
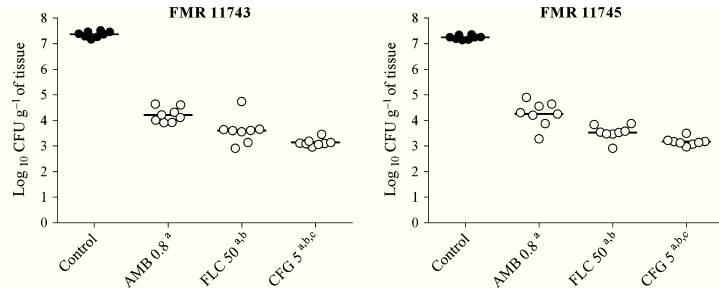


Figure 3 (1→3)-β-D-glucan serum concentrations in mice infected with *C. kefyr* FMR 11743 and FMR 11745 measured on day 10, 1 h after the last dosing with amphotericin B administered at 0.8 mg kg⁻¹ QD (AMB 0.8), fluconazole at 25 mg kg⁻¹ BID (FLC 50) or caspofungin at 5 mg kg⁻¹ QD (CFG 5). Horizontal line indicates the cut-off for positive results (≥80 pg ml⁻¹) in humans. Negative results are considered <60 pg ml⁻¹. ^a*P* < 0.05 vs. control, ^b*P* < 0.05 vs. AMB 0.8, ^c*P* < 0.05 vs. FLC 50.

Table 2 HS1 and HS2 sequences of *C. kefyr* FMR 11743, FMR 11745. Sequences from three wild-type strains (*C. albicans* ATCC 90028, *C. glabrata* ATCC 90030 and *C. kefyr* ATCC 4922) and one strain containing HS1 mutation (*C. kefyr* C132) were included for comparisons.

Strain	Hot spot 1	Hot spot 2 ¹
FMR 11743	FLTL <u>SL</u> RDPI	DWV <u>RR</u> RYTL
FMR 11745	FLTL <u>SL</u> RDPI	DWV <u>RR</u> RYTL
<i>C. glabrata</i> ATCC 90030	FLTL <u>SL</u> RDPI	DWV <u>RR</u> RYTL
<i>C. albicans</i> ATCC 90028	FLTL <u>SL</u> RDPI	DWIRRYTL
<i>C. kefyr</i> ATCC 4922	FLTL <u>SL</u> RDPI	DWIRRYTL
<i>C. kefyr</i> C132	FLTL <u>PL</u> RDPI	DWIRRYTL

¹Changed residues are underlined.

established yet, epidemiological cut-off values (ECV) can be useful to distinguish the wild-type strains from those with probably acquired resistance mechanisms. ECVs for AMB have not been established for *C. kefyr*,

either but MICs of this drug against both strains were within the range considered indicative of susceptibility²⁵, i.e. 0.007 to 1 µg ml⁻¹ according to the efficacy studies in mice. Interestingly, serum levels of AMB (6.52 µg ml⁻¹) were below the concentration that would show a fungicidal effect against strain FMR 11743 (8 µg ml⁻¹) but reduction in CFUs was similar to that observed in strain FMR 11745, which has MIC of AMB lower than the concentration that would show a fungicidal effect. The *in vivo* efficacy of AMB against the strain showing high MIC might be due to its fungistatic effect when serum levels of drug falls below the MIC, as previously reported.²⁶

For FLC the MICs were below the ECV (<1 µg ml⁻¹) and, as expected, this drug showed efficacy in our study. On the other hand, CFG was more effective than AMB and FLC, despite MICs of CFG against both strains being above the ECV (<0.03 µg ml⁻¹). This discrepancy between *in vitro* activity and the *in vivo* efficacy indicates that in our study, MICs of CFG higher than the ECV are not indicative of therapeutic failure. Pfaller *et al.* [27,28] found that CFG MICs higher than the ECV were not predictors of resistance to this echinocandin and attributed that fact to the existence of high interlaboratory variation in MICs of this compound and from batch to batch of drug. For these reasons, AFG and MFG have been proposed as surrogate markers for predicting susceptibility or resistance of *Candida* spp. to echinocandins.^{27,28} In this study, MICs of AFG against both strains were lower than the ECV but not in the case of MFG or in CFG. In addition, the *in vivo* study demonstrated efficacy of the lone echinocandin used as treatment (CFG) and consequently the ECV of AFG seems to predict more accurately the outcome in our experimental setting than those of CFG or MFG. However, further studies including strains with a wider MIC range are necessary to confirm our findings and refine the most suitable therapeutic approaches against this rare and severe infection.

Conflict of interest

The authors report no conflicts of interest.

Funding

This project has been partially funded by the European Union's Seventh Framework Programme for research, technological development and demonstration under Grant Agreement no. HEALTH-F3-2013-601963.

References

- Dufresne SF, Marr KA, Sydnor E *et al.* Epidemiology of *Candida kefyr* in patients with hematologic malignancies. *J Clin Microbiol* 2014; **52**: 1830–7.
- Gomez-Lopez A, Pan D, Cuesta I, Alastruey-Izquierdo A, Rodriguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M. Molecular identification and susceptibility profile *in vitro* of the emerging pathogen *Candida kefyr*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2010; **66**: 116–9.
- Nucci M, Thompson-Moya L, Guzman-Blanco M *et al.* Recommendations for the management of candidemia in adults in Latin America. *Rev Iberoam Micol* 2013; **30**: 179–88.
- Pfaller MA, Diekema DJ, Messer SA, Boyken L, Hollis RJ, Jones RN; International Fungal Surveillance Participant Group. *In vitro* susceptibilities of rare *Candida* bloodstream isolates to ravuconazole and three comparative antifungal agents. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2004; **48**: 101–5.
- Pfaller MA, Andes DR, Diekema DJ *et al.* Epidemiology and outcomes of invasive candidiasis due to non-*albicans* species of *Candida* in 2,496 patients: data from Prospective Antifungal Therapy (PATH) registry 2004–2008. *PLoS ONE* 2014; **9**: e101510.
- Khan Z, Ahmad S, Al-Obaid K, Joseph L, Chandy R. *Candida kefyr* as a cause of bloodstream infection and adjunctive role of biomarkers in its diagnosis. *J Mycol Med* 2015; **25**: 71–5.
- Fekkar A, Meyer I, Brossas JY *et al.* Rapid emergence of echinocandin resistance during *Candida kefyr* fungemia treatment with caspofungin. *Antimicrob Agents Chemother* 2013; **57**: 2380–2.
- Guarro J. Lessons from animal studies for the treatment of invasive human infections due to uncommon fungi. *J Antimicrob Chemother* 2011; **66**: 1447–66.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts*, approved standard-third edition, M27-A3 Wayne, PA: CLSI; 2008.
- Pfaller MA, Diekema DJ. Progress in antifungal susceptibility testing of *Candida* spp. by use of Clinical and Laboratory Standards Institute broth microdilution methods, 2010 to 2012. *J Clin Microbiol* 2012; **50**: 2846–56.
- Sanchis M, Pastor FJ, Capilla J, Sutton DA, Fothergill AW, Guarro J. Experimental therapy with azoles against *Candida guilliermondii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2014; **58**: 6255–7.
- Cantón E, Pemán J, Sastre M, Romero M, Espinel-Ingroff A. Killing kinetics of caspofungin, micafungin, and amphotericin B against *Candida guilliermondii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; **50**: 2829–32.
- Ortoneda M, Capilla J, Pastor FJ, Serena C, Guarro J. Interaction of granulocyte colony-stimulating factor and high doses of liposomal amphotericin B in the treatment of systemic murine scedosporiosis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2004; **50**: 247–51.
- Wiederhold NP, Tam VH, Chi J, Prince RA, Kontoyiannis DP, Lewis RE. Pharmacodynamic activity of amphotericin B deoxycholate is associated with peak plasma concentrations in a neutropenic murine model of invasive pulmonary aspergillosis. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; **50**: 469–73.
- Lortholary O, Nicolas M, Soreda S *et al.* Fluconazole, with or without dexamethasone for experimental cryptococcosis: impact of treatment timing. *J Antimicrob Chemother* 1999; **43**: 817–24.
- Andes D, Diekema DJ, Pfaller MA, Bohrmuller J, Marchillo K, Lepak A. *In vivo* comparison of the pharmacodynamic targets for echinocandin drugs against *Candida* species. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; **54**: 2497–506.
- Calvo E, Pastor FJ, Mayayo E, Salas V, Guarro J. *In vitro* activity and *in vivo* efficacy of anidulafungin in murine infections by *Aspergillus flavus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; **55**: 1290–2.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipksi A, Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* 2013; **30**: 2725–9.
- Staab JF, Neofytos D, Rhee P *et al.* Target enzyme mutations confer differential echinocandin susceptibilities in *Candida kefyr*. *Antimicrob Agents Chemother* 2014; **58**: 5421–7.
- Arendrup M, Horn T, Frimodt-Møller N. *In vivo* pathogenicity of eight medically relevant *Candida* species in an animal model. *Infection* 2002; **30**: 286–91.
- Paredes K, Pastor FJ, Capilla J *et al.* Therapies against murine *Candida guilliermondii* infection, relationship between *in vitro* antifungal pharmacodynamics and outcome. *Rev Iberoam Micol* 2014; **32**: 34–9.
- Sandoval-Denis M, Pastor FJ, Capilla J, Sutton DA, Fothergill AW, Guarro J. *In vitro* pharmacodynamics and *in vivo* efficacy of fluconazole, amphotericin B and caspofungin in a murine infection by *Candida lusitanae*. *Int J Antimicrob Agents* 2013; **43**: 161–4.
- Di Bonaventura G, Spedicato I, Picciani C, D'Antonio D, Piccolomini R. *In vitro* pharmacodynamic characteristics of amphotericin B, caspofungin, fluconazole, and voriconazole against bloodstream isolates of infrequent *Candida* species from patients with hematologic malignancies. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; **48**: 4453–6.
- Salas V, Pastor FJ, Capilla J *et al.* Evaluation of the correlation of caspofungin MICs and treatment outcome in murine infections by wild type strains of *Candida parapsilosis*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2013; **77**: 41–5.
- Diekema DJ, Messer SA, Boyken LB *et al.* *In vitro* activity of seven systemically active antifungal agents against a large global collection of rare *Candida* species as determined by CLSI broth microdilution methods. *J Clin Microbiol* 2009; **47**: 3170–7.
- Andes D, Stamsted T, Conklin R. Pharmacodynamics of amphotericin B in a neutropenic-mouse disseminated-candidiasis model. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; **45**: 922–6.
- Pfaller MA, Diekema DJ, Jones RN, Castanheira M. Use of anidulafungin as a surrogate marker to predict susceptibility and resistance to caspofungin among 4,290 clinical isolates of *Candida* by using CLSI methods and interpretive criteria. *J Clin Microbiol* 2014; **52**: 3223–9.
- Pfaller MA, Messer SA, Diekema DJ, Jones RN, Castanheira M. Use of micafungin as a surrogate marker to predict susceptibility and resistance to caspofungin among 3,764 clinical isolates of *Candida* by use of CLSI methods and interpretive criteria. *J Clin Microbiol* 2014; **52**: 108–14.

4.5. Las concentraciones mínimas inhibitorias del voriconazol (MICs) son predictivas de la eficacia del tratamiento en una infección experimental murina por *Candida glabrata*.

Voriconazole minimum inhibitory concentrations are predictive of treatment outcome in experimental murine infections by *Candida glabrata*.

Sanchis M, Capilla J, Castanheira M, Martin-Vicente A, Sutton DA, Fothergill AW, Wiederhold NP, Guarro J.

International Journal of Antimicrobial Agents 2016, 47: 286-288.



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Antimicrobial Agents

journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/ijantimicag>International Society of Chemotherapy
for Infection and Cancer

Voriconazole minimum inhibitory concentrations are predictive of treatment outcome in experimental murine infections by *Candida glabrata*

Marta Sanchis^a, Javier Capilla^a, Mariana Castanheira^b, Adela Martin-Vicente^a, Deanna A. Sutton^c, Annette W. Fothergill^c, Nathan P. Wiederhold^c, Josep Guarro^{a,*}

^a Unitat de Microbiologia, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, IISPV, Universitat Rovira i Virgili, Carrer Sant Llorenç 21, 43201 Reus, Spain

^b JMI Laboratories, North Liberty, IA, USA

^c Fungus Testing Laboratory, University of Texas Health Science Center, San Antonio, TX, USA

ARTICLE INFO

Article history:

Received 15 September 2015

Accepted 30 December 2015

Keywords:

Voriconazole

Antifungals

Animal model

Fungal infection

Epidemiological cut-off value

Candida glabrata

ABSTRACT

In this study, 27 clinical isolates of *Candida glabrata* with voriconazole (VRC) minimum inhibitory concentrations (MICs) ranging from ≤ 0.03 $\mu\text{g}/\text{mL}$ to 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ were tested to determine whether in vitro data are predictive of in vivo efficacy. The efficacy of VRC administered at 40 mg/kg was assayed in a neutropenic murine model of disseminated infection by *C. glabrata*. The reduction in fungal tissue burden in the kidneys was used as a marker of treatment efficacy. VRC reduced the fungal tissue burden in mice infected with strains that had MICs below the epidemiological cut-off value (ECV) of 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Variable efficacy of VRC was obtained when the MIC equalled the ECV, and VRC was ineffective when the MIC exceeded the ECV. These results suggest that the use of in vitro data could be useful to predict the outcome for infections by this fungus.

© 2016 Elsevier B.V. and the International Society of Chemotherapy. All rights reserved.

1. Introduction

Candida glabrata is the second most frequent bloodstream pathogen affecting ca. 10–20% of patients with candidaemia in North America, especially in the USA [1]. The high incidence of infections caused by this species has been linked to the use of broad-spectrum antibiotics, the use of central venous catheters, stay in an intensive care unit, and renal failure in elderly patients [2]. Although it has been reported that *C. glabrata* is less virulent than *Candida albicans*, the mortality rate is higher due to the emergence of multidrug resistance in bloodstream isolates [3]. Current recommendations for invasive candidiasis (IC) in neutropenic patients include the use of echinocandins as primary therapy along with lipid formulations of amphotericin B [4]. However, recent studies have reported therapeutic failure or recurrence of *C. glabrata* infections following treatment with echinocandins linked to the emergence of strains with mutations in the *FKS* genes [5,6]. In the European and South American guidelines, fluconazole (FLC) is also recommended as prophylactic treatment [7,8]. Moreover, a rapid increase of *C. glabrata* strains showing resistance or low

susceptibility to azoles, especially to FLC, has been recently reported, which could be associated with overexpression of the ABC transporter genes *CDR1* and *CDR2*, probably acquired due to its frequent use as prophylaxis [9–11]. Based on different clinical data, voriconazole (VRC) is considered an option for initial empirical treatment of IC in febrile neutropenic patients [7,8]. However, there are no experimental data on the efficacy of VRC in the treatment of disseminated *C. glabrata* infections, although it has been demonstrated in animal infections by other non-*albicans* *Candida* spp. [12,13]. Clinical breakpoints for VRC against *C. glabrata* have not been established, but recently the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) has suggested an epidemiological cut-off value (ECV) of 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for VRC against *C. glabrata* [14]. To evaluate whether the ECV for VRC is predictive of in vivo efficacy, a murine model of disseminated *C. glabrata* infection using clinical isolates with different minimum inhibitory concentrations (MICs) was developed.

2. Materials and methods

For this study, 27 clinical isolates of *C. glabrata* representing a wide range of VRC MICs were selected. The MICs were determined previously in triplicate using the broth microdilution method according to the CLSI standard for yeasts [15] and, when

* Corresponding author. Tel.: +34 977 759 359; fax: +34 977 759 322.
E-mail address: josep.guarro@urv.cat (J. Guarro).

In vitro activity and in vivo efficacy of voriconazole (VRC) in reducing the fungal load from the kidneys of mice challenged with 27 strains of *Candida glabrata*.^a

Strain	VRC MIC ($\mu\text{g/mL}$)	Mean (\pm S.D.) \log_{10} CFU/g of kidney tissue		
		Controls	Treated group	P-value
UTHSC DI15-86	≤ 0.03	5.480 \pm 0.03916	2.372 \pm 0.1406	0.0159*
FMR 11377	0.03	7.258 \pm 0.2215	4.672 \pm 0.2414	0.0079*
UTHSC DI15-87	0.03	7.386 \pm 0.3025	5.048 \pm 0.4077	0.0079*
FMR 11382	0.03	7.972 \pm 0.6472	4.984 \pm 0.7027	0.0079*
UTHSC DI15-88	0.06	7.162 \pm 0.2114	4.394 \pm 0.2000	0.0159*
FMR 11379	0.06	7.436 \pm 0.3133	5.538 \pm 0.4659	0.0079*
FMR 11378	0.06	7.508 \pm 0.3930	5.360 \pm 0.5240	0.0159*
FMR 8502	0.12	7.474 \pm 0.8935	5.406 \pm 0.7624	0.0079*
FMR 11383	0.12	7.648 \pm 0.6871	5.850 \pm 0.1838	0.0079*
JMI 002-729	0.25	7.305 \pm 0.5510	6.305 \pm 0.5889	0.0571
JMI 002-297	0.25	6.093 \pm 0.1617	5.230 \pm 0.4062	0.0571
UTHSC DI15-89	0.25	7.143 \pm 0.3067	6.330 \pm 0.3603	0.0317*
UTHSC DI15-90	0.5	6.424 \pm 0.1324	6.096 \pm 0.4043	0.2222
JMI 002-206	0.5	7.022 \pm 0.4034	6.520 \pm 0.5070	0.0952
JMI 801705	1	7.612 \pm 0.4183	6.650 \pm 0.7040	0.0566
JMI 787195	1	6.473 \pm 0.2943	5.834 \pm 0.3247	0.0635
UTHSC DI15-91	1	7.550 \pm 0.6399	6.840 \pm 0.3621	0.0952
UTHSC DI15-92	2	7.412 \pm 0.5903	7.038 \pm 0.3819	0.2857
JMI 780445	2	6.822 \pm 0.6613	6.112 \pm 0.3312	0.0556
JMI 766341	2	6.566 \pm 0.3439	6.088 \pm 0.5572	0.3095
JMI 787587	4	6.392 \pm 0.2647	6.070 \pm 0.1478	0.1111
JMI 815914	4	6.330 \pm 0.2736	5.876 \pm 0.3819	0.1508
JMI 766356	4	6.312 \pm 0.3337	5.760 \pm 0.7036	0.3095
JMI 815905	4	7.740 \pm 0.4123	7.144 \pm 0.2493	0.0556
JMI 663371	8	6.400 \pm 0.1177	6.072 \pm 0.2009	0.3095
JMI 030-10956	8	5.312 \pm 0.2860	4.946 \pm 0.3156	0.0873
JMI 698837	8	5.718 \pm 0.1574	5.616 \pm 0.2053	0.4127

MIC, minimum inhibitory concentration; S.D., standard deviation.

^a The treatment group received 40 mg/kg/day for 7 days, whilst controls received no treatment.

* Differences were considered statistically significant at a *P*-value of ≤ 0.05 .

discrepancies were found, the mode of the different values was taken. MICs were below the ECV in 9 isolates (33.3%), equal to the ECV in 3 isolates (11.1%) and above the ECV in 15 isolates (55.6%) (Table 1). The isolates were grown on potato dextrose agar (PDA) plates (Pronadisa, Madrid, Spain) at 35 °C for 48 h. Cultures were scraped off with a sterile loop, were suspended in sterile saline and were adjusted to the desired concentration by haemocytometer count. The viability of the inocula was confirmed by plating 10-fold dilutions onto PDA plates and counting the number of CFU.

Four-week-old male OF1 mice (Charles River Laboratories; Cribra SA, Barcelona, Spain) weighing 30 g were housed under standard conditions. Animals were immunosuppressed 2 days prior to infection by intraperitoneal injection of 200 mg/kg body weight of cyclophosphamide and once every 5 days thereafter (Genoxal®; Laboratories Funk S.A., Barcelona, Spain) [16]. Groups of 16 mice were challenged intravenously via the lateral tail vein with a yeast suspension consisting of 2×10^8 CFU/animal of each isolate in 0.2 mL of sterile saline. In a previous study using different strains, it was demonstrated that this inoculum resulted in a high fungal load in the kidneys [17]. Groups of 8 infected mice received VRC (VFEND®; Pfizer S.A., Madrid, Spain) at 40 mg/kg once daily by oral gavage [18,19]. Previous pharmacokinetic studies in an experimental murine model had demonstrated that this dose provided drug plasma levels above all MIC for all strains tested [17]. From 3 days before infection, mice receiving VRC were given diluted (1:2) grapefruit juice instead of water in order to increase the drug concentration in murine serum [20]. Treatments began 24 h after challenge and lasted 7 days. Controls received no treatment. In addition, to prevent bacterial infections all animals received 5 mg/kg day ceftazidime subcutaneously. The efficacy of VRC was evaluated by reduction of tissue burden in the kidneys. Animals were euthanised by CO₂ anoxia 7 days post-infection, 4 h after the last drug administration, in order to compare the results with untreated controls. Kidneys were then aseptically removed, were homogenised in 1 mL of sterile saline and serial 10-fold dilutions of

the homogenates were plated on PDA and were incubated for 48 h at 35 °C to determine tissue burden (CFU/g of tissue). All animal care procedures were supervised and approved by the Universitat Rovira i Virgili Animal Welfare and Ethics Committee (Reus, Spain). Colony counts from tissue burden studies were analysed using the Mann-Whitney *U*-test. Differences were considered statistically significant at *P* < 0.05.

3. Results and discussion

In this study, the in vitro activity of VRC was determined against 27 clinical isolates of *C. glabrata* with MICs ranging from ≤ 0.03 $\mu\text{g/mL}$ to 8 $\mu\text{g/mL}$. Table 1 shows the VRC MICs and the fungal load in the kidneys 7 days after infection with all strains. To our knowledge, this is the first study evaluating the correlation between the in vitro activity and in vivo efficacy of VRC against experimental murine IC by a wide number of *C. glabrata* strains. The in vitro study was performed in triplicate and no significant variations in the VRC MICs between repeat measurements were found, with only a difference of one two-fold dilution in nine strains (33.3%). The in vivo study showed that VRC was able to significantly reduce the fungal tissue burden in the kidneys in mice infected with those strains showing MICs below the ECV. Efficacy was only obtained against one strain (UTHSC DI15-89) among the three strains showing MICs equal to the ECV (*P* = 0.0317), whilst no response was found against isolates with MICs higher than the ECV. These results demonstrated that the ECV of VRC is a good predictor of response to IC due to *C. glabrata*. Previously, VRC has demonstrated improvement in experimental and clinical infections by other *Candida* spp. such as *Candida krusei*, *Candida tropicalis* and *Candida guilliermondii*, although the correlation between ECV and outcome has not been established [12,13,21]. Although there are limited clinical data on the usefulness of VRC in the treatment of invasive infections by *C. glabrata*, this drug has shown efficacy in the treatment of myocarditis [22] and as salvage therapy treatment

of IC by *C. glabrata* in immunosuppressed and critically ill patients, even in those previously exposed to azoles [23]. In addition, two recent cases of vulvovaginal candidiasis caused by FLC-resistant isolates were successfully treated with VRC [24], suggesting that VRC can constitute a therapeutic option [7]. The present study has some limitations, such as the use of a single efficacy marker (fungal load in the kidneys) and the relatively low number of *C. glabrata* isolates with VRC MICs equal to the ECV. To determine more accurately these findings it would be interesting in future studies to expand the number of isolates as well as the markers used for efficacy evaluation.

Funding: This project has been partially funded by the European Union's Seventh Framework Programme for Research, Technological Development and Demonstration [grant agreement no. HEALTH-2013-INNOVATION-2-601963].

Competing interests: None declared.

Ethical approval: Procedures were supervised and approved by L. Loriente Sanz (ID 39671243) of the Veterinary and Animal Welfare Advisory of the Universitat Rovira i Virgili Animal Welfare and Ethics Committee (Reus, Spain).

References

- [1] Olson JA, Adler-Moore JP, Smith PJ, Proffitt RT. Treatment of *Candida glabrata* infection in immunosuppressed mice by using a combination of liposomal amphotericin B with caspofungin or micafungin. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49:4895–902.
- [2] Malani A, Hmoud J, Chiu L, Carver PL, Bielaczyc A, Kauffman CA. *Candida glabrata* fungemia: experience in a tertiary care center. *Clin Infect Dis* 2005;41:975–81.
- [3] Farmakiotis D, Kyvernitakis A, Tarrand JJ, Kontoyiannis DP. Early initiation of appropriate treatment is associated with increased survival in cancer patients with *Candida glabrata* fungaemia: a potential benefit from infectious disease consultation. *Clin Microbiol Infect* 2015;21:79–86.
- [4] Pappas PG, Kauffman CA, Andes D, Benjamin Jr DK, Calandra TF, Edwards Jr JE, et al. Clinical practice guidelines for the management of candidiasis: 2009 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 2009;48:503–35.
- [5] Beyda ND, John J, Kilic A, Alam MJ, Lasco TM, Garey KW. FKS mutant *Candida glabrata*: risk factors and outcomes in patients with candidemia. *Clin Infect Dis* 2014;59:819–25.
- [6] Alexander BD, Johnson MD, Pfeiffer CD, Jiménez-Ortígoza C, Catania J, Booker R, et al. Increasing echinocandin resistance in *Candida glabrata*: clinical failure correlates with presence of FKS mutations and elevated minimum inhibitory concentrations. *Clin Infect Dis* 2013;56:1724–32.
- [7] Nucci M, Thompson-Moya L, Guzman-Blanco M, Tiraboschi IN, Cortes JA, Echevarría J, et al. Recommendations for the management of candidemia in adults in Latin America. *Rev Iberoam Micol* 2013;30:179–88.
- [8] Ullmann AJ, Akova M, Herbrecht R, Viscoli C, Arendrup MC, Arikan-Akdagli S, et al. ESCMID guideline for the diagnosis and management of *Candida* diseases 2012: adults with haematological malignancies and after haematopoietic stem cell transplantation (HCT). *Clin Microbiol Infect* 2012;18(Suppl. 7):53–67.
- [9] Sanglard D, Ischer F, Calabrese D, Majcherczyk PA, Bille J. The ATP binding cassette transporter gene *CgCDRI* from *Candida glabrata* is involved in the resistance of clinical isolates to azole antifungal agents. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43:2753–65.
- [10] Sanguinetti M, Posteraro B, Fiori B, Ranno S, Torelli R, Fadda G. Mechanisms of azole resistance in clinical isolates of *Candida glabrata* collected during a hospital survey of antifungal resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49:668–79.
- [11] Pfaller MA. Antifungal drug resistance: mechanisms, epidemiology, and consequences for treatment. *Am J Med* 2012;125(1 Suppl):S3–13.
- [12] Majithiya J, Sharp A, Parmar A, Denning DW, Warn PA. Efficacy of isavuconazole, voriconazole and fluconazole in temporarily neutropenic murine models of disseminated *Candida tropicalis* and *Candida krusei*. *J Antimicrob Chemother* 2009;63:161–6.
- [13] Mariné M, Pastor FJ, Serena C, Guarro J. Efficacy of triazoles in a murine disseminated infection by *Candida krusei*. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;53:3585–8.
- [14] Espinel-Ingroff A, Pfaller MA, Bustamante B, Canton E, Fothergill A, Fuller J, et al. Multilaboratory study of epidemiological cutoff values for detection of resistance in eight *Candida* species to fluconazole, posaconazole, and voriconazole. *Antimicrob Agents Chemother* 2014;58:2006–12.
- [15] Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard. 3rd ed. Wayne, PA: CLSI; 2008. Document M27-A3.
- [16] Clemons KV, Espiritu M, Parmar R, Stevens DA. Comparative efficacies of conventional amphotericin B, liposomal amphotericin B (AmBisome), caspofungin, micafungin, and voriconazole alone and in combination against experimental murine central nervous system aspergillosis. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49:4867–75.
- [17] Fernández-Silva F, Lackner M, Capilla J, Mayayo E, Sutton D, Castanheira M, et al. In vitro antifungal susceptibility of *Candida glabrata* to caspofungin and the presence of FKS mutations correlate with treatment response in an immunocompromised murine model of invasive infection. *Antimicrob Agents Chemother* 2014;58:3646–9.
- [18] Andes D, Marchillo K, Stamstad T, Conklin R. In vivo pharmacokinetics and pharmacodynamics of a new triazole, voriconazole, in a murine candidiasis model. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47:3165–9.
- [19] Warn PA, Sharp A, Mosquera J, Spickermann J, Schmitt-Hoffmann A, Heep M, et al. Comparative in vivo activity of BAL4815, the active component of the prodrug BAL8557, in a neutropenic murine model of disseminated *Aspergillus flavus*. *J Antimicrob Chemother* 2006;58:1198–207.
- [20] Sugar AM, Liu XP. Effect of grapefruit juice on serum voriconazole concentrations in the mouse. *Med Mycol* 2000;38:209–12.
- [21] Sanchis M, Pastor FJ, Capilla J, Sutton DA, Fothergill AW, Guarro J. Experimental therapy with azoles against *Candida guilliermondii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2014;58:6255–7.
- [22] Einarssdóttir HM, Danielsen R, Gottfredsson M. Successful treatment of *Candida glabrata* myocarditis with voriconazole. *Scand J Infect Dis* 2002;34:778–80.
- [23] Ostrosky-Zeichner L, Oude Lashof AM, Kullberg BJ, Rex JH. Voriconazole salvage treatment of invasive candidiasis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2003;22:651–5.
- [24] Gomez-Moyano E, Cid Lama A, Fernández Ballesteros MD, Lova Navarro M, Vera Casañó A, Crespo Erchiga V. Efficacy of voriconazole treatment in chronic vulvovaginal candidosis due to *Candida glabrata*. *Rev Iberoam Micol* 2013;30:61–3 [in Spanish].

4.6. Eficacia de las equinocandinas frente a infecciones murinas por *Diutina (Candida) rugosa*.

Efficacy of echinocandins against murine infections by *Diutina (Candida) rugosa*.

Sanchis M, Sutton DA, Wiederhold N, Guarro J, Capilla J.

Diagnostic Microbiology and Infectious Disease 2016, 86: 61-65.



Efficacy of echinocandins against murine infections by *Diutina* (*Candida*) *rugosa*

Marta Sanchis^a, Deanna A. Sutton^b, Nathan P. Wiederhold^b, Josep Guarro^{a,*}, Javier Capilla^a

^a Unitat de Microbiologia, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, IISPV, Universitat Rovira i Virgili, Reus, Tarragona, Spain

^b Fungus Testing Laboratory, University of Texas Health Science Center at San Antonio, San Antonio, TX, USA

ARTICLE INFO

Article history:

Received 29 March 2016

Received in revised form 17 May 2016

Accepted 21 May 2016

Available online xxx

Keywords:

Anidulafungin

Caspofungin

Diutina rugosa

Antifungals

Fungal infections

Animal model

ABSTRACT

Echinocandins are recommended as a first-line therapy for invasive candidiasis. *Candida rugosa* was recently transferred to the new genus *Diutina*. We have determined the *in vitro* killing kinetics of two echinocandins, anidulafungin, and caspofungin and their *in vivo* efficacy, administering doses of 5 or 10 mg/kg, and 1 or 5 mg/kg, respectively against 2 clinical strains of *D. rugosa*. Both drugs showed a fungicidal concentration-dependent activity and, in a neutropenic murine model of disseminated infection, were able to reduce tissue burden and to prolong survival of mice. These results suggest that both echinocandins could be useful to treat infections by this fungus when isolates show minimal inhibitory concentrations within the range of susceptibility for both drugs.

© 2016 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Diutina (formerly *Candida*) *rugosa* is an emerging pathogen isolated from clinical samples such as traumatic lesions, oral mucosa, or sputum and that causes nosocomial fungemia in immunocompromised population, mainly associated with invasive medical practices such as the use of catheters (Behera et al., 2010; Colombo et al., 2003). It is estimated that the incidence of invasive candidiasis (IC) by this species is around 0.2% being higher in India (18.4%) (Paredes et al., 2012). Recently, the phylogeny of *Candida rugosa* species complex has been reviewed and eight species belonging to this complex were redefined and reaccommodated in the new genus *Diutina* (Khunnamwong et al., 2015). The habitat of this fungus remains uncertain however, it has been isolated from soil, water forest human feces and human oral cavities (Pires-Gonçalves et al., 2007). *D. rugosa* has been reported causing mastitis in cattle being commonly isolated from milk from mastitic cows (Crawshaw et al., 2005) and also its lipases are widely used in the biotechnology industry in different processes such as production of many food products (i.e. ice cream, fermented foods, fats and oils)

(Benjamin and Pandey, 1998). Thus, this infection may be linked to dietary habits such as consuming contaminated milk or food product. Current recommendations for the treatment of IC in neutropenic patients include echinocandins as a first-line treatment and fluconazole (FLC) or amphotericin B (AmB) as alternatives (Arendrup et al., 2014; Nucci et al., 2013). There is little information available on the *in vitro* susceptibility of *D. rugosa* species to echinocandins and is considered azole resistant like *C. glabrata* or *C. krusei*. A recent multilaboratory study suggest that this species has a low susceptibility to polyenes, azoles, and echinocandins (Espinel-Ingroff et al., 2014) but some activity of the latter has been reported (Diekema et al., 2009). Clinical experience in the management of such infections is very limited and does not allow therapeutic recommendations to be established. AmB should probably not be used due to its lack of efficacy, even among strains that have *in vitro* susceptibility to this drug (Behera et al., 2010; Diekema et al., 2009). FLC has been reported as effective for two patients with candidemia produced by FLC-susceptible *D. rugosa* strains that displayed negative cultures after therapy (Mincec et al., 2009). There has been only one experimental study conducted in mice on the efficacy of azoles that has shown FLC, voriconazole and posaconazole to be effective against a disseminated infection by two clinical isolates of *D. rugosa* (Hernandez et al., 2004). However, the efficacy of echinocandins has not

* Corresponding author. Tel.: +34-977-759359; fax: +34-977-759322.
E-mail address: josep.guarro@urv.cat (J. Guarro).

been experimentally explored in animals. In order to explore the role that echinocandins can play in the treatment of disseminated infection by *D. rugosa*, *in vitro* kinetics of anidulafungin (AFG) and caspofungin (CFG) using time-kill curves and their *in vivo* efficacy in a neutropenic murine model of disseminated infection by this fungus were evaluated.

2. Materials and methods

2.1. Fungal isolates

Two clinical isolates of *D. rugosa* from the Fungus Testing Laboratory University of Texas Health Science Center at San Antonio (UTHSCSA), (UTHSCSA 06–3976 isolated from sputum and UTHSCSA 05–1919 from a lesion) previously identified by analysis of the D1/D2 domains and the internal transcribed spacer sequences of the rRNA genes, were used (Paredes et al., 2012). Antifungal profile susceptibility was previously determined by following the CLSI guidelines, document M27-A3 (CLSI, 2008) both strains showing susceptibility to azoles (Paredes et al., 2012). MICs of AFG and CFG were 0.5 µg/mL and 1 µg/mL against the strain UTHSCSA 06–3976 and 0.06 µg/mL of both drugs against the strain UTHSCSA 05–1919, as previously reported (Paredes et al., 2012). Both isolated were included in the study due to their echinocandins MICs differences consisting on 3 to 4 dilutions.

2.2. Inocula preparation

Isolates were cultured for 24 h at 35 °C on potato dextrose agar (PDA) plates. On the day of infection, cultures were scraped off with a sterile loop, suspended in sterile saline and yeast cell suspensions were adjusted to the desired concentration by hemocytometer count. Viability of the inocula was confirmed by placing 10-fold dilutions onto PDA plates.

2.3. Time-kill studies

Time-kill curves were performed according to previous studies (Cantón et al., 2013) with some modifications. A range of concentrations of each drug (0.03, 0.12, 0.5, 1, 2, 8, and 32 µg/mL) and controls (drug-free) were prepared in RPMI with final volumes of 9 mL. Then, each tube was inoculated with 1 mL of a yeast suspension containing 5×10^6 colony-forming units (CFU)/mL, and incubated at 35 °C. At predetermined time points (0, 2, 4, 6, 8, 24, and 48 h), an aliquot from each tube was collected to determine the number of CFU/mL by preparing 10-fold dilutions of the aliquots and placing onto PDA plates. A CFU decrease of $\geq 99.9\%$ or $\geq 3 \log_{10}$ units compared to the starting inoculum was considered fungicidal, while a reduction of $< 99.9\%$ or $< 3 \log_{10}$ units was considered fungistatic (Cantón et al., 2013). The limit of detection was 50 CFU/mL. All time-kill curve studies were performed in duplicate.

2.4. Animals

Four-week-old OF-1 male mice weighing approximately 30 g (Charles River, Criffa S.A., Barcelona, Spain) were used. Mice were immunosuppressed 2 days prior to the infection by intraperitoneal (i.p.) administration of 200 mg/kg of body weight of cyclophosphamide and once every 5 days thereafter (Clemons et al., 2005). All animals were housed under standard conditions and care procedures were supervised and approved under the procedure number 8249, by the Universitat Rovira i Virgili Animal Welfare and Ethics Committee.

2.5. Infection

Mice were challenged intravenously (i.v.) via the lateral tail vein with 0.2 mL of a yeast suspension containing 1×10^6 CFU of each strain. This inoculum size has previously been shown to be adequate for

producing an acute infection with a high mortality in 14–15 days post-infection (Hernandez et al., 2004).

2.6. Treatments

Groups of 20 mice were randomly established, 10 for survival and 10 for tissue burden studies. One day after infection, animals received AFG (Ecalta; Pfizer Inc., Madrid, Spain) at 5 or 10 mg/kg or CFG at 1 or 5 mg/kg (Cancidas; Merck & Co. Inc., Whitehouse Station, NJ, USA), both drugs administered i.p. once daily for 7 days. Control animals received no treatment. Doses of CFG and AFG were selected based on previous experimental (Paredes et al., 2015; Salas et al., 2013) and pharmacokinetic studies (Andes et al., 2010). To prevent bacterial infections, all animals received ceftazidime at 5 mg/kg subcutaneously once daily during the experimental period. The efficacy of the drugs was evaluated by prolongation of survival over 30 days and reduction of tissue burden in kidneys.

2.7. Tissue burden

Animals were euthanized by CO₂ anoxia 7 days post infection, 4 h after the last dose was administered. Kidneys were aseptically removed, weighed, and mechanically homogenized in 1 mL of sterile saline. Ten-fold dilutions of the homogenates were placed onto PDA plates and incubated for 24 h at 35 °C for CFU/g determination (Capilla et al., 2007).

2.8. Statistics

Mean survival time was estimated by the Kaplan–Meier analysis, and the long-rank test was used. Tissue burden data were analysed using the Mann–Whitney *U* test, using Graph Pad Prism 4.0 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Differences were considered statistically significant at $P < 0.05$.

3. Results

3.1. *In vitro* studies

Time-kill studies showed fungicidal activity of both drugs against the two isolates evaluated (Fig. 1). AFG required reaching the fungicidal endpoint between 30 h at 8 µg/mL for UTHSC 05–1919 and 46 h at 16 µg/mL for UTHSC 06–3976. However, for CFG fungicidal activity was only achieved at the highest concentration tested, 32 µg/mL, after 8 h against UTHSC 05–1919 and after 20 h against UTHSC 06–3976.

3.2. *In vivo* studies

Control animals began to die from 5 to 6 days post-infection and all had succumbed 9 days after challenge (Fig. 2). Administering high doses of either drug, i.e. AFG 10 mg/kg and CFG 5 mg/kg, significantly prolonged the survival of the mice infected with either of the two strains with respect to the control group ($P \leq 0.040$), with no statistical differences between AFG and CFG ($P \geq 0.308$); however, the lower doses of both drugs only prolonged survival respect to the control group against the strain UTHSC 05–1919 ($P \leq 0.014$) but not against UTHSCSA 06–3976, which showed higher MICs for both drugs ($P \geq 0.284$).

The tissue burden study shows that both drugs at both doses were able to significantly reduce the fungal load in kidneys of mice infected by either strain in comparison to the control group ($P \leq 0.0001$) (Fig. 2), showing a dose-dependent response. For UTHSCSA 05–1919, the high doses of CFG and AFG were significantly more effective in reducing the kidney fungal burden than the low doses of each drug ($P \leq 0.003$). However, against strain UTHSC 06–3976, only the high dose of AFG was more effective than the lower dose ($P \leq 0.035$). Also, significant differences were found between AFG and CFG were administered at

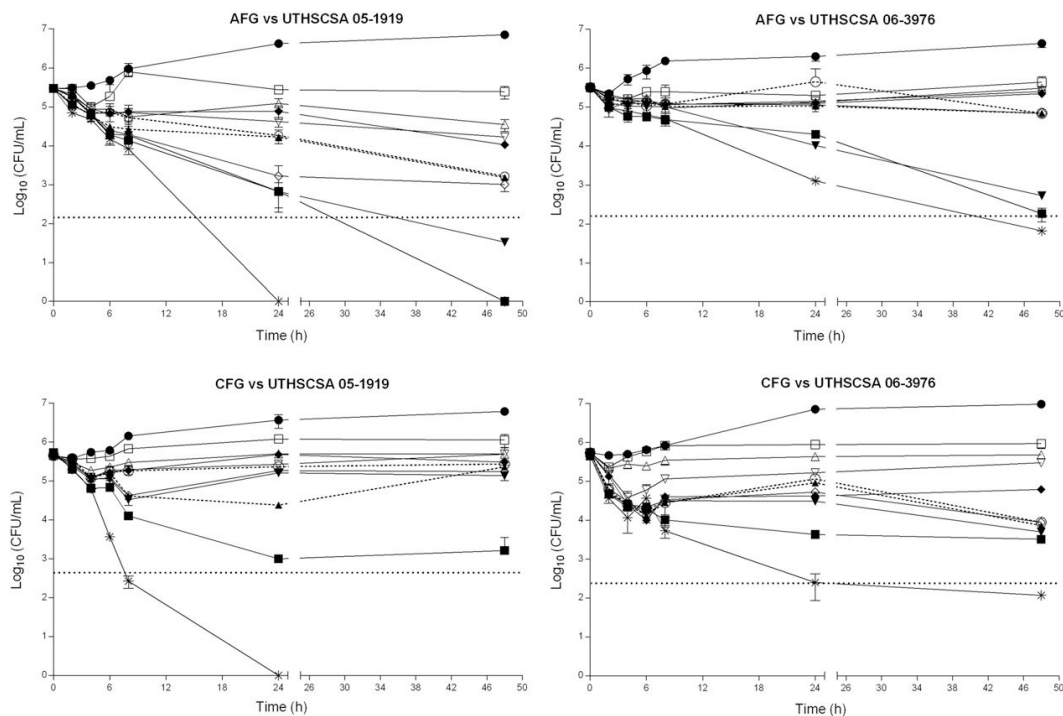


Fig. 1. Time-killing kinetics assays of AFG or CFG against two strains of *D. rugosa* (□) 0.03 µg/mL, (△) 0.06 µg/mL, (▽) 0.25 µg/mL, (◆) 0.5 µg/mL, (○) 1 µg/mL, (▲) 2 µg/mL, (◇) 4 µg/mL, (▼) 8 µg/mL, (■) 16 µg/mL, (*) 32 µg/mL, (●) control. Dotted line represents ≥ 3 log₁₀ growth reduction compared with that of the starting inoculum (fungicidal effect).

high doses being AFG at 10 mg/kg more effective than CFG against both strains ($P \leq 0.030$).

4. Discussion

During the last decade, the application of molecular methods has resulted in a major revision of fungal taxonomy as in the case of the genus *Candida*. The use of DNA sequence analysis has enabled identify, redefine and re-accommodate more accurately species not distinguishable only by phenotypic characteristics. At present study was evaluated the *in vitro* killing kinetics and the *in vivo* efficacy of CFG and AFG in a murine model of invasive infection by *D. rugosa* (formerly *C. rugosa*). Although there is little *in vitro* data on the antifungal activity of echinocandins against *D. rugosa*, the modal MIC of echinocandins has been reported to be 0.25 µg/mL for AFG and 1 µg/mL for CFG and MFG, with 16 µg/mL being the highest MIC reported (Diekema et al., 2009; Espinel-Ingroff et al., 2014). The epidemiological cut-off values for *D. rugosa* have not yet been established and the relevance of the *in vitro* data to the clinical outcome remains undetermined. In this study, 2 strains of *D. rugosa* with MICs of AFG and CFG within the common range previously reported for this species were used (Paredes et al., 2012). Both drugs showed a fungicidal concentration and strain-dependent activity against both strains. However, fungicidal effect was achieved at concentrations much higher than the MICs of both agents. Various studies with echinocandins have shown either fungicidal or fungistatic activity against *Candida* depending on the species assayed. For instance, against *C. guilliermondii*, *C. glabrata*, *C. braccarensis*, or *C. krusei*, echinocandins have shown fungicidal activity (Cantón et al., 2009; Gil-Alonso et al., 2015a; Paredes et al., 2015) while against *C. africana* the activity was fungistatic (Gil-Alonso et al., 2015b). In the case of other species of *Candida*, such as *C. lusitanae*, *C. nivariensis*, and *C. albicans*, echinocandins have shown a paradoxical effect or a different kill kinetic activity that seems isolate-dependent (Cantón et al., 2013;

Gil-Alonso et al., 2015a, 2015b). Although further studies with more isolates of the mentioned species are necessary to prove if such activity is stable and species dependent, the effect might be due to the amount of β -glucan in the fungal cell wall, differences in growth characteristics and/or genetic differences between species in their affinity to bind the antifungal drug to its target (Gil-Alonso et al., 2015c). The *in vivo* results from the two echinocandins against *D. rugosa* in the present study agree with previous studies that reported efficacy in experimental infections by non-*albicans* *Candida* spp. (Barchiesi et al., 2006; Salas et al., 2013; Spreghini et al., 2012), while other studies have only shown modest fungal burden reduction in murine infections by *C. guilliermondii* and *C. parapsilosis* (Paredes et al., 2015; Salas et al., 2013). These different responses of *Candida* spp. to echinocandin-based treatments demonstrate the importance of correct identification of rare species of this genus in order to ensure a successful treatment outcome (Paredes et al., 2012). In the present study, a relationship was observed between the *in vitro* and the *in vivo* results in that both drugs were more effective in reducing tissue burden in mice infected with the strain showing the lowest MIC for AFG and CFG, in this case strain UTHSC 05-1919. In addition, the time-kill study demonstrated a faster effect of both drugs against this strain at concentrations that are clinically achievable after therapy with the high doses of both compounds (Sanchis et al., 2015, 2016). Together with the low MICs, that would explain the different response of the two isolates tested.

In summary, the present study demonstrates the efficacy of echinocandins in the treatment of *D. rugosa* infections; however, further studies using a wider range of isolates are necessary in order to define more accurately the therapeutic role of these compounds and the correlation of *in vitro* data to *in vivo* outcomes.

Conflicts of interest

None.

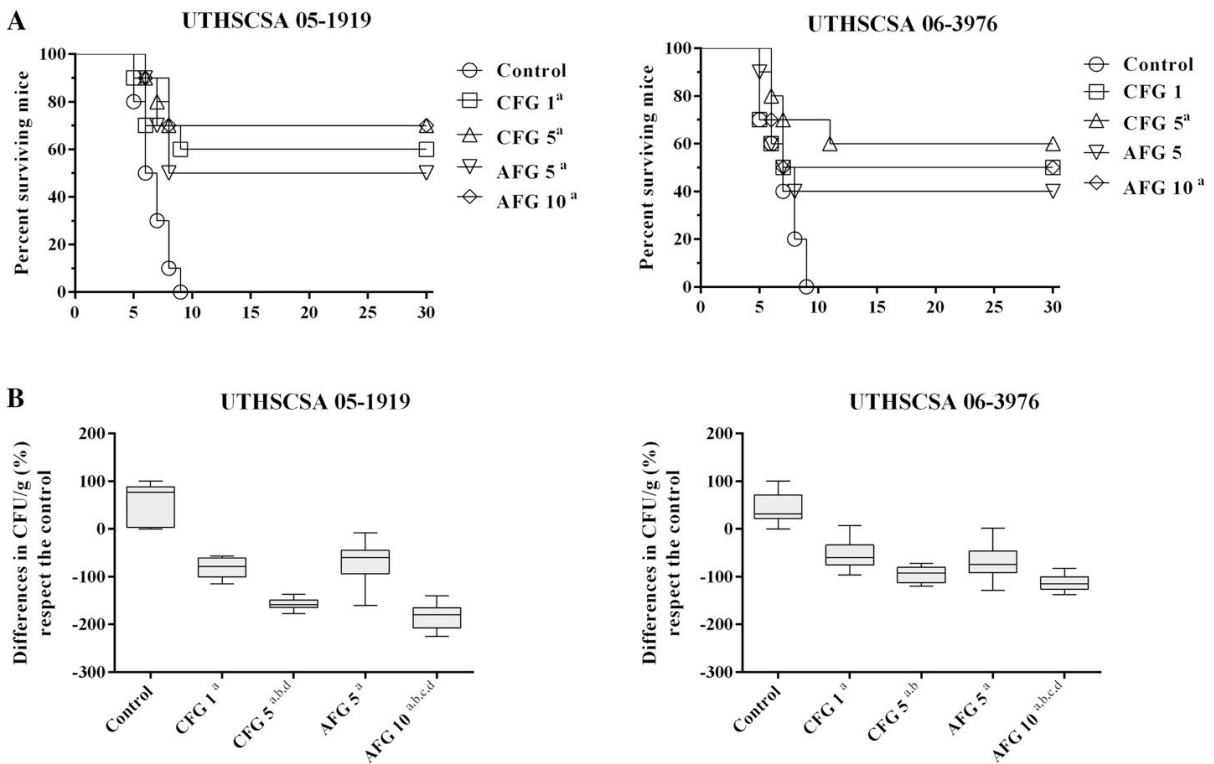


Fig. 2. Effect of antifungal treatments on survival through 30 days (A) and on fungal loads reduction in kidneys (B) 7 post infection in neutropenic mice infected intravenously (i.v.) with 1×10^6 colony-forming units (CFU) of *D. rugosa* strains UTHSCSA 05-1919 and UTHSCSA 06-3976. Animals received anidulafungin (AFG) at 5 mg/kg or at 10 mg/kg QD or caspofungin (CFG) at 5 mg/kg or at 1 mg/kg QD. Treatments began 24 h after infection and lasted for 7 days. ^a $P < 0.05$ versus control, ^b $P < 0.05$ versus CFG 1, ^c $P < 0.05$ versus CFG 5, and ^d $P < 0.05$ versus AFG 5.

Funding

This project has been partially funded by the European Union's Seventh Framework Programme for research, technological development and demonstration under grant agreement no. HEALTH-2013-INNOVATION-2-601963.

References

- Andes D, Diekema DJ, Pfäler MA, Bohrmüller J, Marchillo K, Lepak A. In vivo comparison of the pharmacodynamic targets for echinocandin drugs against *Candida* species. *Antimicrob Agents Chemother* 2010;54:2497-506. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.01584-09>.
- Arendrup MC, Boekhout T, Akova M, Meis JF, Cornely OA, Lortholary O, et al. ESCMID and ECMJ joint clinical guidelines for the diagnosis and management of rare invasive yeast infections. *Clin Microbiol Infect* 2014;3:76-98. <http://dx.doi.org/10.1111/1469-0691.12360>.
- Barchiesi F, Spreghini E, Tomassetti S, Della Vittoria A, Arzeni D, Manso E, et al. Effects of caspofungin against *Candida guilliermondii* and *Candida parapsilosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2006;50:2719-27.
- Behera B, Singh RI, Xess I, Mathur P, Hasan F, Misra MC. *Candida rugosa*: a possible emerging cause of candidaemia in trauma patients. *Infection* 2010;38:387-93. <http://dx.doi.org/10.1007/s15010-010-0044-x>.
- Benjamin S, Pandey A. *Candida rugosa* lipases: molecular biology and versatility in biotechnology. *Yeast* 1998;14:1069-87.
- Cantón E, Pemán J, Valentin A, Espinel-Ingroff A, Gobernado M. *In vitro* activities of echinocandins against *Candida krusei* determined by three methods: MIC and minimal fungicidal concentration measurements and time-kill studies. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;53:3108-11. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00160-09>.
- Cantón E, Pemán J, Hervás D, Espinel-Ingroff A. Examination of the *in vitro* fungicidal activity of echinocandins against *Candida lusitanae* by time-killing methods. *J Antimicrob Chemother* 2013;68:864-8. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dks489>.
- Capilla J, Clemons KV, Stevens DA. Animal models: an important tool in mycology. *Med Mycol* 2007;45:657-84.

- Clemons KV, Espiritu M, Parmar R, Stevens DA. Comparative efficacies of conventional amphotericin b, liposomal amphotericin B (AmBisome), caspofungin, micafungin, and voriconazole alone and in combination against experimental murine central nervous system aspergillosis. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49:4867-75.
- Colombo AL, Melo AS, Crespo Rosas RF, Salomão R, Briones M, Hollis RJ, et al. Outbreak of *Candida rugosa* candidemia: an emerging pathogen that may be refractory to amphotericin B therapy. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2003;46:253-7.
- Crawshaw WM, MacDonald NR, Duncan G. Outbreak of *Candida rugosa* mastitis in a dairy herd after intramammary antibiotic treatment. *Vet Rec* 2005;156:812-3.
- Diekema DJ, Messer SA, Boyken LB, Hollis RJ, Kroeger J, Tendolkar S, et al. *In vitro* activity of seven systemically active antifungal agents against a large global collection of rare *Candida* species as determined by CLSI broth microdilution methods. *J Clin Microbiol* 2009;47:3170-7. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.00942-09>.
- Espinel-Ingroff A, Pfäler MA, Bustamante B, Canton E, Fothergill A, Fuller J, et al. Multilaboratory study of epidemiological cutoff values for detection of resistance in eight *Candida* species to fluconazole, posaconazole, and voriconazole. *Antimicrob Agents Chemother* 2014;58:2006-12. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.02615-13>.
- Gil-Alonso S, Jauregizar N, Cantón E, Eraso E, Quindós G. *In vitro* fungicidal activities of anidulafungin, caspofungin, and micafungin against *Candida glabrata*, *Candida braccarensis*, and *Candida nivariensis* evaluated by time-kill studies. *Antimicrob Agents Chemother* 2015a;59:3615-8. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.04474-14>.
- Gil-Alonso S, Jauregizar N, Cantón E, Eraso E, Quindós G. Comparison of the *in vitro* activity of echinocandins against *Candida albicans*, *Candida dubliniensis*, and *Candida africana* by time-kill curves. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2015b;82:57-61. <http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2015.01.010>.
- Gil-Alonso S, Jauregizar N, Eraso E, Quindós G. Postantifungal effect of micafungin against the species complexes of *Candida albicans* and *Candida parapsilosis*. *PLoS One* 2015c;10:e0132730. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0132730>.
- Hernandez S, Gonzalez GM, McCarthy DI, Colombo AL, Najjar LK, Bocanegra R, et al. Alternatives to amphotericin B for *Candida rugosa* infection. *J Antimicrob Chemother* 2004;54:477-80.
- Khunnamwong P, Lertwattanasakul N, Jindamorakot S, Limtong S, Lachance MA. Description of *Diutina* gen. nov., *Diutina siamensis*, f. sp. nov., and reassignment of *Candida catenulata*, *Candida mesorugosa*, *Candida neorugosa*, *Candida pseudorugosa*, *Candida ramongensis*, *Candida rugosa* and *Candida scorzetiae* to the genus *Diutina*. *Int J Syst Evol Microbiol* 2015;65:4701-9. <http://dx.doi.org/10.1099/ijsem.0.000634>.
- Mince LR, Ho KS, Veldkamp PJ, Clancy CJ. *Candida rugosa*: a distinctive emerging cause of candidaemia. A case report and review of the literature. *Scand J Infect Dis* 2009;41:892-7. <http://dx.doi.org/10.3109/00365540903161531>.

- Nucci M, Thompson-Moya L, Guzman-Blanco M, Tiraboschi IN, Cortes JA, Echevarría J, et al. Latin America Invasive Mycosis Network. Recommendations for the management of candidemia in adults in Latin America. *Rev Iberoam Micol* 2013;30:179–88. <http://dx.doi.org/10.1016/j.riam.2013.05.007>.
- Paredes K, Sutton DA, Cano J, Fothergill AW, Lawhon SD, Zhang S, et al. Molecular identification and antifungal susceptibility testing of clinical isolates of the *Candida rugosa* species complex and proposal of the new species *Candida neorugosa*. *J Clin Microbiol* 2012;50:2397–403. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.00688-12>.
- Paredes K, Pastor FJ, Capilla J, Sutton AD, Mayayo E, Fothergill WA, et al. Therapies against murine *Candida guilliermondii* infection, relationship between *in vitro* antifungal pharmacodynamics and outcome. *Rev Iberoam Micol* 2015;32:34–9. <http://dx.doi.org/10.1016/j.riam.2013.10.008>.
- Pires-Gonçalves RH, Miranda ET, Baeza LC, Matsumoto MT, Zaia JE, Mendes-Giannini MJ. Genetic relatedness of commensal strains of *Candida albicans* carried in the oral cavity of patients' dental prosthesis users in Brazil. *Mycopathologia* 2007; 164:255–63.
- Salas V, Pastor FJ, Capilla J, Sutton DA, Mayayo E, Fothergill AW, et al. Evaluation of the correlation of caspofungin MICs and treatment outcome in murine infections by wild type strains of *Candida parapsilosis*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2013;77:41–5. <http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2013.05.01>.
- Sanchis M, Capilla J, Mayayo E, Pastor FJ, Guarro J. Experimental efficacy of anidulafungin against *Aspergillus terreus* species complex. *Med Mycol* 2015;53:630–5. <http://dx.doi.org/10.1093/mmy/myv027>.
- Sanchis M, Martín-Vicente A, Capilla J, Guarro J. Antifungal therapies in murine infections by *Candida kefyr*. *Mycoses* 2016. <http://dx.doi.org/10.1111/myc.12468>. (Epub ahead of print).
- Spreghini E, Orlando F, Sanguinetti M, Posteraro B, Giannini D, Manso E, et al. Comparative effects of micafungin, caspofungin, and anidulafungin against a difficult-to-treat fungal opportunistic pathogen, *Candida glabrata*. *Antimicrob Agents Chemother* 2012;56:1215–22. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.05872-11>.
- Wayne, PA. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard-third edition, M27-A3. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI); 2008.

5. DISCUSIÓN

5. Discusión

5.1. *Aspergillus terreus*: Eficacia de la anidulafungina

Aspergillus terreus es un patógeno emergente oportunista cuya incidencia ha aumentado en los últimos años. Si bien *A. fumigatus* es la especie mayoritaria implicada en casos de AI, la relevancia clínica de *A. terreus* radica en su mayor tendencia a la diseminación en comparación a otras especies del género y la alta tasa de mortalidad asociada a infecciones causadas por este patógeno a pesar de las terapias disponibles (Pastor & Guarro 2014; Steinbach *et al.*, 2012). Diferentes estudios han demostrado que esta especie es intrínsecamente resistente a la anfotericina B desoxicolato y que existe un porcentaje elevado de aislados clínicos con resistencia adquirida a los azoles, especialmente al voriconazol, considerado como el tratamiento de primera línea para la AI. Sin embargo, diferentes estudios han demostrado muy buena actividad de las equinocandinas, con rangos de CMEs menores para la micafungina y la anidulafungina que para la caspofungina (Baddley *et al.*, 2009; Lass-Flör *et al.*, 2008). La micafungina y la caspofungina son consideradas terapias de elección dada la buena eficacia clínica obtenida en el tratamiento de las aspergilosis causadas por *A. terreus* así como por otras especies del género. En los pocos estudios experimentales existentes se ha observado una eficacia variable de la caspofungina y moderada para la micafungina frente a infecciones causadas por *A. terreus* pero no existen datos clínicos ni experimentales acerca de la eficacia de la anidulafungina. Sin embargo, se ha podido observar éxito terapéutico de éste fármaco frente a otras especies como *A. fumigatus* tanto en infecciones diseminadas como pulmonares y frente a *A. flavus* o *A. niger* (Calvo *et al.*, 2011a, 2011b). Por esta razón, consideramos interesante llevar a cabo un estudio experimental para evaluar si la anidulafungina podría ser una posible terapia alternativa al voriconazol en infecciones causadas por dos cepas pertenecientes al complejo de *A.*

terreus. Para llevar a cabo nuestro propósito, realizamos estudios *in vitro* e *in vivo* en un modelo de infección diseminada en ratones inmunocomprometidos en el que valoramos la capacidad del fármaco para prolongar la supervivencia, reducir la invasión fúngica en riñón y bazo, se determinaron niveles séricos del antifúngico y de galactomanano al finalizar la terapia y se llevó a cabo un estudio histológico en riñón. En nuestro estudio la anidulafungina mostró una muy buena actividad *in vitro* frente a los aislados estudiados, corroborando los datos obtenidos en estudios previos. Además, se confirmó mediante las curvas de mortalidad la actividad fungistática de este fármaco frente a *A. terreus* (Pastor & Guarro, 2009). Además en el modelo experimental pudimos confirmar la eficacia dosis dependiente de la anidulafungina, muy similar a la obtenida en estudios previos frente a otras especies del género *Aspergillus* (Pastor & Guarro, 2008) y demostrar su eficacia. Sin embargo, ninguna de las dos dosis evaluadas de este fármaco (5 mg/kg o 10 mg/kg) fue capaz de reducir los niveles del antígeno galactomanano en suero respecto a los animales control (no tratados) lo cual indica que la medición de este antígeno en nuestro estudio no es un buen marcador de eficacia terapéutica. En otros estudios experimentales se han observado resultados similares, sugiriendo que la actividad fungistática de las equinocandinas frente *Aspergillus* spp., es la responsable de que se obtengan niveles circulantes y mantenidos del antígeno en el plasma. La eficacia del tratamiento antifúngico también se pudo confirmar en el estudio histopatológico en el cual se observó una menor presencia de células fúngicas en aquellos cortes histológicos de los órganos de los ratones tratados, llegando a ser la presencia de células fúngicas muy focalizada. Además, en estudios experimentales previos se evaluó la eficacia del posaconazol y el voriconazol frente a las dos cepas de *A. terreus* utilizadas en este estudio (Salas *et al.*, 2010, 2013b). Si realizamos una comparativa entre los resultados obtenidos en todos los trabajos se puede observar que los tres fármacos muestran una eficacia similar indicando el posible uso potencial de la anidulafungina en el

tratamiento de infecciones causadas por esta especie. Los resultados obtenidos en este estudio acerca de la eficacia de la anidulafungina frente a aislados clínicos de *A. terreus* fueron publicados en la revista *Medical Mycology* 2015; 53:630-635.

5.2. *Candida* spp. no-*albicans*: Exploración de nuevas terapias antifúngicas

A pesar de que *C. albicans* sigue siendo la especie con mayor incidencia clínica del género *Candida*, diferentes estudios epidemiológicos muestran un incremento de CI causadas por especies *no-albicans* con incidencias variables geográficamente (Quindós, 2014). Existen pocos datos de la eficacia de los fármacos antifúngicos disponibles frente a *Candida* spp. *no-albicans* y es por ello que no existe una terapia recomendada para infecciones causadas por la mayoría de estas especies. Además, las especies *no-albicans* tienen en común su particular perfil de sensibilidad antifúngica ya que la mayoría de ellas son resistentes o muestran una baja sensibilidad frente a los antifúngicos, entre ellos los recomendados como tratamientos de elección frente a CI. En base a lo expuesto, consideramos interesante llevar a cabo estudios experimentales para evaluar la actividad *in vitro* y la eficacia *in vivo* de diferentes antifúngicos frente a *C. guilliermondii*, *C. lusitaniae*, *C. kefyr*, *D. rugosa* y *C. glabrata*, las especies que han experimentado una mayor presencia en la clínica humana. Diferentes estudios han demostrado que *D. rugosa*, *C. guilliermondii* y un porcentaje elevado de aislados de *C. glabrata* presentan una baja sensibilidad o resistencia a la anfotericina B (Kovacikova *et al.*, 2001; Pfaller *et al.*, 2004, 2014; Espinel-Ingroff *et al.*, 2014), mientras que los resultados obtenidos frente a *C. kefyr* han demostrado actividad variable (Gomez-Lopez *et al.*, 2010) y buena frente *C. lusitaniae*. Sin embargo, en la clínica se ha observado fracaso terapéutico frente a *C. guilliermondii*, *D. rugosa* y *C. lusitaniae* y resultados variables en infecciones por *C. kefyr*. Los triazoles presentan una baja actividad frente a *D. rugosa*, sin embargo, se ha

observado éxito clínico con el fluconazol y buena eficacia en el tratamiento experimental de todo este grupo de antifúngicos (Hernández *et al.*, 2004; Espinel-Ingroff *et al.*, 2014). Dentro del grupo de los triazoles, el posaconazol y el voriconazol son los fármacos con mayor actividad *in vitro* y eficacia experimental y/o clínica frente al resto de especies de *Candida* estudiadas en la presente tesis doctoral (Einarsdóttir *et al.*, 2002; Otrouky-Zeichner *et al.*, 2003; Spreghini *et al.*, 2008; Majithiya *et al.*, 2009; Mariné *et al.*, 2009, 2010; Gomez-Moyano *et al.*, 2013), exceptuando el fluconazol el cual sólo posee actividad *in vitro* frente a *C. kefyr* (Khan *et al.*, 2015) y se ha observado buena eficacia experimental frente a esta especie y frente a *C. lusitaniae* (Paredes *et al.*, 2013; Sandoval-Denis *et al.*, 2013; Beyda *et al.*, 2014;). Por último, se ha observado que las equinocandinas poseen actividad muy baja frente *C. glabrata* y *C. guilliermondii*, moderada frente a *D. rugosa* y alta frente a *C. lusitaniae* y *C. kefyr*. En clínica, se han observado casos de fallo terapéutico debido a la aparición de resistencias durante el curso de la terapia, principalmente de la caspofungina, frente a todas las especies estudiadas en esta tesis, incluyendo aquellas sensibles *in vitro*.

5.2.1. *C. guilliermondii* y *C. lusitaniae*. Eficacia del posaconazol y voriconazol

Diferentes estudios demuestran que *C. guilliermondii* presenta sensibilidad reducida a las equinocandinas, las cuales se recomiendan como terapia de elección, con CMIs para estos fármacos de 2 a 100 veces mayores respecto a las que presentan otras especies del género y la resistencia de *C. lusitaniae* frente al fluconazol (Jensen *et al.*, 2011; Lockhart *et al.*, 2012; Arendrup *et al.*, 2014). El posaconazol y el voriconazol han demostrado ser muy activos *in vitro* frente a estas dos especies (Espinel-Ingroff *et al.*, 2014) y a pesar de que existen datos experimentales de éxito terapéutico de estos fármacos frente a infecciones causadas por otras especies del género, no existen trabajos experimentales

ni datos clínicos acerca de la posible eficacia de ambos triazoles frente a CI causada por estas especies (Majithiya *et al.*, 2009; Mariné *et al.*, 2009, 2010; Spreghini *et al.*, 2008) Por ello, en este trabajo nos propusimos estudiar las curvas de mortalidad y la eficacia *in vivo* del voriconazol y el posaconazol en modelos experimentales con ratones neutropénicos infectados con aislados de *C. guilliermondii* y *C. lusitaniae* con valores de CMIs para ambos fármacos dentro del rango de sensibilidad e inferiores a los PCE establecidos para cada una de las especies (Espinell-Ingroff *et al.*, 2014). Las curvas de mortalidad obtenidas para el posaconazol y el voriconazol mostraron una actividad fungistática frente a las dos especies, correlacionándose con la actividad observada para los azoles frente a muchas especies del género (Spreghini *et al.*, 2007; Szabó *et al.*, 2009, 2010) aunque en otro estudio previo se reportó actividad fungicida del posaconazol frente a *C. inconspicua*, *C. kefyri*, *C. krusei* y *C. lusitaniae* (Sóczó *et al.*, 2007). Sin embargo, a pesar de observarse esta cinética en las curvas de mortalidad, *in vivo* ambos tratamientos fueron eficaces en reducir significativamente la carga fúngica en los animales infectados por cada una de las cepas de ambas especies respecto a los animales control. En el estudio de *C. guilliermondii* se evaluó la eficacia de dosis de 25 mg/kg de ambos fármacos y se observó que 24 h después de finalizar el tratamiento los niveles séricos de posaconazol y voriconazol estaban por encima de las CMIs de ambas cepas estudiadas. En el caso de *C. lusitaniae* se estudiaron dosis escaladas de los dos antifúngicos (10, 25 y 40 mg/kg) observándose que la eficacia era dosis dependiente y que todas las dosis fueron eficaces respecto a los grupos de animales no tratados. Además como marcadores adicionales de eficacia también se estudiaron los niveles séricos de fármaco y los niveles (1→3)-β-D-glucano en los animales infectados el día 11 post-infección al finalizar todos los tratamientos. Las tres dosis de posaconazol y voriconazol ensayadas mostraron concentraciones séricas terapéuticas por encima de los valores de CMIs incrementándose escaladamente. En la detección del (1→3)-β-D-glucano también se observó una reducción dosis

dependiente, correlacionándose los valores séricos con la carga fúngica determinada a partir de los órganos homogenizados. Sin embargo, en algunos animales tratados con la dosis mayor (40mg/kg) no se detectaron recuentos de UFCs lo cual no se correlaciona con la actividad fungistática observada en general para ambos fármacos frente a muchas especies de *Candida* spp. Si comparamos ambos estudios, a dosis de 25 mg/kg ambos fármacos fueron efectivos en el tratamiento de infecciones causadas por estas especies, aunque en algunos casos el posaconazol fue el tratamiento más eficaz reduciendo la carga fúngica significativamente respecto al voriconazol. Los resultados obtenidos en el trabajo de *C. guilliermondii* fueron publicados en la revista *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2014; 58: 6255-6257 y los del estudio de *C. lusitaniae* en la revista *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 2016; 84: 48-51.

5.2.2. *C. glabrata*. Correlación entre la actividad *in vitro* del voriconazol y su eficacia *in vivo* frente a *C. glabrata*

En los últimos años se está detectando un aumento en la incidencia de aislados multiresistentes de *C. glabrata*, incluyendo tratamientos de primera línea y las alternativas (Farmakiotis *et al.*, 2015). Aunque no existen datos experimentales ni clínicos acerca de la eficacia del voriconazol en el tratamiento de CI causada por *C. glabrata*, si se ha observado éxito terapéutico de este fármaco en infecciones producidas por cepas sensibles de esta especie al voriconazol o como terapia de rescate en CI en pacientes críticos y inmunosuprimidos (Einarsdóttir *et al.*, 2002; Otrósky-Zeichner *et al.*, 2003; Gomez-Moyano *et al.*, 2013). A pesar de que no existe un punto de corte clínico establecido que ayude a predecir la eficacia de este fármaco frente a *C. glabrata*, recientemente se ha sugerido un PCE de 0,25 µg/mL basándose en las distribuciones de las CMI_s el cual permite detectar cepas con posibles mecanismos de resistencia (Espinel-Ingroff *et al.*, 2014). Por ello nuestro objetivo en este estudio fue comprobar si el PCE en este caso es útil como indicador de la eficacia *in vivo*. Para

establecer una correlación entre los datos *in vitro* e *in vivo*, se utilizaron 27 cepas clínica de *C. glabrata* con diferentes CMI_s (de 0,03 a 8 µg/mL). Estas CMI_s se determinaron mediante la técnica de microdilución en caldo concordando el rango de valores obtenidos con los resultados de los estudios *in vitro* realizados previamente por otros autores (Espinel-Ingroff *et al.*, 2014). En cuanto al estudio *in vivo*, los estudios de recuento fúngico en riñón, único órgano estudiado, demostraron que el voriconazol fue eficaz en el tratamiento de los animales infectados con cepas de *C. glabrata* con valores de CMI_s menores a su PCE, y solamente en el de los infectados con una cepa con una CMI igual que el PCE, no observándose respuesta terapéutica en aquellos animales infectados con cepas con CMI_s por encima del PCE establecido. En otros estudios publicados se ha observado una buena eficacia de este fármaco frente a especies no-*albicans* como *C. krusei*, *C. tropicalis*, *C. lusitaniae*, *C. guilliermondii*, pero en ninguno de ellos se ha establecido una correlación entre los PCEs sugeridos con la eficacia *in vivo* (Majithiya *et al.*, 2009; Mariné *et al.*, 2009; Sanchis *et al.*, 2014, 2016). Nuestro estudio demostró una buena correlación entre las CMI_s y la eficacia *in vivo* del fármaco en infecciones causadas por *C. glabrata*. Además, el PCE establecido para el voriconazol y esta especie (0,25 µg/mL) resultó ser útil a la hora de predecir la eficacia terapéutica. Los resultados obtenidos se han publicado en la revista International Journal of Antimicrobial Agents 2016; 47: 286-288.

5.2.3. *C. kefyi*. Eficacia de la anfotericina B, el fluconazol y la caspofungina

A pesar de que la incidencia de las infecciones causadas por *C. kefyi* es baja, la tasa de mortalidad en pacientes inmunocomprometidos es muy elevada (Dufresne *et al.*, 2014). Dada la ausencia de estudios experimentales y los escasos datos clínicos existentes, nuestro propósito fue evaluar la eficacia de los antifúngicos recomendados en las guías de tratamiento de las candidiasis como son la caspofungina, la anfotericina B y

el fluconazol (Nucci *et al.*, 2013). Para ello, seleccionamos dos cepas con las mismas CMIs para cada uno de los fármacos, estando los valores para la caspofungina por encima del PCE establecido (0,03 $\mu\text{g/ml}$) (Pfaller & Diekema, 2012). Además, realizamos un modelo de infección diseminada en ratones inmunocomprometidos en el que valoramos la capacidad de los tres tratamientos para reducir la carga fúngica en riñón, los niveles de (1 \rightarrow 3)- β -D-glucano y si las concentraciones de fármaco estaban por encima de las CMIs al finalizar el tratamiento. Las curvas de mortalidad revelaron una actividad fungicida para la caspofungina y la anfotericina B y una actividad fungistática para el fluconazol, lo cual se correlaciona con los datos obtenidos para estos fármacos frente a otras especies del género (Di-Bonaventura *et al.*, 2004; Cantón *et al.*, 2006; Sandoval-Denis *et al.*, 2013; Paredes *et al.*, 2014). Todos los fármacos redujeron significativamente la carga fúngica en riñón, siendo la caspofungina el tratamiento más eficaz, seguido del fluconazol y por último la anfotericina B. Además estos resultados se correlacionaron con la detección de los niveles séricos de (1 \rightarrow 3)- β -D-glucano volviendo a ser de nuevo la caspofungina el fármaco más efectivo. La anfotericina B redujo más los niveles de antígeno que el fluconazol lo cual puede ser debido a la actividad fungistática de este último. En estudios experimentales previos, estos fármacos también fueron eficaces en el tratamiento de *C. parapsilosis* o *C. lusitaniae* (Salas *et al.*, 2013; Sandoval-Denis *et al.*, 2013). Por último, hay que resaltar que a pesar de que la CMI de la caspofungina fue la más alta para ambas cepas, el tratamiento fue eficaz, indicando estos resultados que los valores de CMIs por encima del PCE establecido para la caspofungina no son indicativos de fallo terapéutico ni tampoco predictivos de resistencias ya que no se observaron mutaciones en las regiones HS del gen *FKSI*. Nuestros resultados concuerdan con lo sugerido por otros autores que proponen que los valores de CMIs de la anidulafungina o la micafungina son mejores marcadores que la caspofungina para predecir la sensibilidad o la resistencia *in vitro* de las *Candida* spp. frente a las equinocandinas (Pfaller *et al.*,

2014a; 2014b). Los resultados de este estudio fueron publicados a la revista *Mycoses*, 2016; 59: 253-258.

5.2.4. *D. rugosa*. Equinocandinas: correlación valores *in vitro* versus eficacia *in vivo*

En los últimos años ha habido cambios importantes en la taxonomía de los hongos, como es el caso de las principales levaduras implicadas en clínica. Muchas veces es complicado poder diferenciar especies crípticas mediante estudios fenotípicos lo cual puede conllevar a identificaciones incorrectas que pueden tener un gran impacto en clínica ya que las especies menos comunes suelen poseer patrones de sensibilidad antifúngica disminuida. En este sentido, recientemente se ha revisado la filogenia del complejo de especies de *Candida rugosa* y ocho de las especies pertenecientes a este complejo han sido reasignadas en el nuevo género *Diutina* (Khunnamwong *et al.*, 2015). A pesar de que las CI debidas a *D. rugosa* tienen una incidencia baja, su pobre respuesta a los tratamientos antifúngicos hace necesaria la mejora de las terapias existentes y la obtención de información predictiva acerca de la eficacia de tratamientos aun no explorados. Para determinar la eficacia experimental de la anidulafungina y de la caspofungina se realizaron estudios de supervivencia y carga fúngica utilizando diferentes dosis de ambos fármacos en modelos de infección diseminada en ratones neutropénicos. Se usaron cepas con diferentes CMI's para estas equinocandinas y se intentó establecer una correlación entre los resultados *in vitro* e *in vivo*. Existen pocos datos de la sensibilidad antifúngica y de *D. rugosa* y no existen puntos de corte establecidos para determinar a partir de qué valores se consideran sensibles o resistentes los aislados de esta especie. Las cepas seleccionadas en el presente trabajo presentaban valores de CMI's comunes para ambos fármacos y dentro del rango de sensibilidad observado por otros autores (0,03 - 16 µg/mL) (Diekema *et al.*, 2009; Espinel-Ingroff *et al.*, 2014). Coincidiendo con estudios anteriores, nuestras curvas de mortalidad

demostraron la actividad fungicida concentración dependiente de ambas equinocandinas frente a *D. rugosa* (Cantón *et al.*, 2009; Gil-Alonso *et al.*, 2015; Paredes *et al.*, 2015). Tanto la anidulafungina como la caspofungina, a las dosis más altas empleadas (5 mg/kg y 10 mg/kg, respectivamente), fueron capaces de prolongar la supervivencia de los animales tratados, sin embargo, las dosis más bajas solo prolongaron la supervivencia en los animales tratados con la cepa con una CMI de 0,06 µg/mL para ambas equinocandinas. En el estudio de carga fúngica todas las dos dosis administradas de ambos fármacos redujeron la carga fúngica de manera dosis dependiente. En estudios anteriores ya se había podido comprobar la eficacia de estos fármacos frente a CI por otras especies no-*albicans* y una respuesta moderada frente a *C. guilliermondii* y *C. parapsilosis* (Salas *et al.*, 2013a; Paredes *et al.*, 2015). En conclusión, en nuestro estudio se puede observar una correlación entre los resultados *in vitro* e *in vivo* ya que se observó mayor eficacia experimental en aquellos ratones infectados con la cepa con CMIs bajas (0,06 µg/mL) para ambos fármacos. A pesar de estos resultados, es necesario realizar más estudios en los que se incluya un mayor número de cepas para poder definir con más precisión el papel terapéutico de las equinocandinas frente a *D. rugosa*. Estos resultados fueron publicados en la revista Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 2016; 86: 61-65.

En general, los resultados obtenidos en todos nuestros estudios sobre *Candida* spp. no-*albicans* demuestran la cinética fungistática de los azoles y una actividad fungicida concentración dependiente de las equinocandinas y de la anfotericina B. Sin embargo, en el caso de *A. terreus* la anidulafungina mostró actividad fungistática como se ha observado en otros estudios frente a diferentes *Aspergillus* spp. Esta actividad fungistática podría explicar, en los casos en los que se determinaron los niveles de antígeno galactomanano en suero, la leve disminución ya que los niveles permanecen circulantes en plasma. En general, se observó una buena

Discusión

correlación *in vitro* e *in vivo*, siendo predictivos los valores *in vitro* de los resultados de la terapia experimental.

6. CONCLUSIONES

6.1. Hongos filamentosos: *Aspergillus terreus*

6.1.1. Se han evaluado las curvas de mortalidad y la actividad *in vitro* mediante la técnica de microdilución de la anidulafungina frente a dos aislados clínicos del complejo *Aspergillus terreus*. Posteriormente, se estudió la eficacia *in vivo* de este fármaco frente a estas dos cepas utilizando un modelo de infección diseminada en ratón neutropénico.

- ❖ La anidulafungina mostró una actividad fungistática frente a las dos cepas evaluadas.
- ❖ Se observó una buena actividad *in vitro* de este antifúngico obteniendo valores de concentración mínima efectiva dentro del rango establecido en estudios previos.
- ❖ La anidulafungina ha mostrado una buena eficacia dosis dependiente *in vivo*, con lo que este fármaco podría constituir una alternativa eficaz para tratar infecciones causadas por este hongo.

6.2. Hongos levaduriformes: *Candida spp. no-albicans*

6.2.1. Se han determinado las curvas de mortalidad del posaconazol y voriconazol frente a dos aislados clínicos de *Candida guilliermondii*, así como su eficacia *in vivo* en un modelo murino de infección sistémica en ratones inmunocomprometidos. Se ha determinado la carga fúngica en riñón y los niveles séricos de ambos fármacos al finalizar el tratamiento. Con ello concluimos que:

- ❖ Los dos azoles mostraron una actividad fungistática.
- ❖ Tanto el posaconazol como el voriconazol han mostrado una buena eficacia *in vivo* en ratones infectados con aislados clínicos de *C. guilliermondii* con CMI's para ambos fármacos dentro del rango considerado indicativo de sensibilidad para esta especie. Sin embargo, el posaconazol fue significativamente más eficaz frente a uno de los dos

aislados. Los datos *in vitro* pueden ser un buen predictor de la eficacia *in vivo* en aquellas cepas con CMI's modales para ambos antifúngicos frente a esta especie.

❖ Los niveles séricos obtenidos para ambos fármacos estuvieron por encima de las CMI's correspondientes en las dos cepas evaluadas.

6.2.2. Hemos evaluado la actividad *in vitro* y la eficacia *in vivo* del posaconazol y del voriconazol frente a tres aislados clínicos de *Candida lusitaniae* con los valores de CMI's más comunes para ambos fármacos.

❖ Las curvas de mortalidad demostraron que ambos fármacos mostraron una actividad *in vitro* fungistática.

❖ En el correspondiente modelo murino se pudo observar que tanto el posaconazol como el voriconazol a todas las dosis evaluadas mostraron eficacia dosis dependiente. Se obtuvo una mayor eficacia tanto en la reducción de carga fúngica como en la detección de los niveles de (1→3)-β-d-glucano con las dosis más altas tanto de ambos antifúngicos. En general, no se observaron diferencias significativas entre tratamientos y entre la misma dosis de ambos fármacos.

6.2.3. Hemos construido las curvas de mortalidad y determinado la actividad *in vitro* de la anfotericina B, el fluconazol y la caspofungina frente a *Candida kefyr* y hemos desarrollado un modelo de infección diseminada por dicha especie en ratones inmunosuprimidos para evaluar la eficacia de dichos antifúngicos.

❖ Las curvas de mortalidad para la anfotericina B y la caspofungina demostraron una actividad fungicida frente a ambas cepas mientras que el fluconazol mostró una cinética fungistática.

❖ A pesar de las diferentes cinéticas *in vitro* de los tres fármacos, *in vivo* todos los tratamientos disminuyeron significativamente la carga fúngica en riñón y los niveles de (1→3)-β-D-glucano, siendo la

Conclusiones

casposfungina la terapia más efectiva, seguida del fluconazol y por último de la anfotericina B.

❖ Al finalizar la terapia las concentraciones en suero de todos los tratamientos se encontraron por encima de los correspondientes valores de CMIs.

6.2.4. Se ha determinado la actividad *in vitro* del voriconazol frente a 27 aislados de *Candida glabrata* y su correlación con los valores de CMI en un modelo de infección diseminada por dicha especie en el ratón neutropénico.

❖ El voriconazol fue eficaz en el tratamiento de infecciones causadas por cepas de *C. glabrata* con CMIs menores al PCE (0,25 µg/mL), mostró resultados variables frente a aislados con CMIs iguales al PCE y el tratamiento fue ineficaz en las infecciones causadas por cepas con CMIs por encima del PCE, sugiriéndose que el uso del PCE para el voriconazol frente a *C. glabrata* puede ser predictivo de una buena eficacia en infecciones causadas por dicha especie.

6.2.5. Se ha determinado la actividad *in vitro* de la anidulafungina y la casposfungina frente a *Diutina (Candida) rugosa* mediante curvas de mortalidad y la eficacia *in vivo* de dichos fármacos mediante curvas de supervivencia y estudios de carga fúngica en riñón. Las conclusiones obtenidas son:

❖ Ambas equinocandinas mostraron actividad fungicida concentración dependiente frente a ambas cepas, observándose mayor actividad de la anidulafungina.

❖ Ambos fármacos han demostrado ser eficaces en el tratamiento de infecciones diseminadas por *D. rugosa*.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Alexander BD, Johnson MD, Pfeiffer CD, Jiménez-Ortigosa C, Catania J, Booker R, Castanheira M, Messer SA, Perlin DS, Pfaller MA.** Increasing echinocandin resistance in *Candida glabrata*: Clinical failure correlates with presence of *FKS* mutations and elevated minimum inhibitory concentrations. *Clin Infect Dis* 2013; 56: 1724–1732.
- Álvarez Duarte E.** El Subphylum Mucoromycotina: generalidades y aspectos taxonómicos recientes. *Boletín Micológico* 2013; 28: 16–25.
- Andes D, Safdar N, Marchillo K, Conklin R.** Pharmacokinetic-pharmacodynamic comparison of amphotericin B (AMB) and two lipid-associated AMB preparations, liposomal AMB and AMB lipid complex, in murine candidiasis models. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50: 674-684.
- Andes D, Diekema DJ, Pfaller MA, Bohrmuller J, Marchillo K, Lepak A.** *In vivo* comparison of the pharmacodynamic targets for echinocandin drugs against *Candida* species. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54: 2497-2506.
- Arendrup MC.** *Candida* and Candidaemia: Susceptibility and Epidemiology. *Dan Med J* 2013; 60: 1–32.
- Arendrup MC, Boekhout T, Akova M, Meis JF, Cornely OA, Lortholary O, ESCMID EFISG Study Group and ECMM.** ESCMID and ECMM joint clinical guidelines for the diagnosis and management of rare invasive yeast infections. *Clin Microbiol Infect* 2014; 3: 76-98.
- Atkinson BJ, Lewis RE, Kontoyiannis DP.** *Candida lusitanae* fungemia in cancer patients: risk factors for amphotericin B failure and outcome. *Med Mycol* 2008; 46: 541-546.

Bibliografía

- Baddley JW, Pappas PG, Smith AC, Moser SA.** Epidemiology of *Aspergillus terreus* at a university hospital. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 5525-5529.
- Behera B, Singh RI, Xess I, Mathur P, Hasan F, Misra MC.** *Candida rugosa*: a possible emerging cause of candidaemia in trauma patients. *Infection* 2010; 38: 387-393.
- Beyda ND, Lewis RE, Garey KW.** Echinocandin resistance in *Candida* species: mechanisms of reduced susceptibility and therapeutic approaches. *Ann Pharmacother* 2012; 46: 1086-1096.
- Beyda ND, John J, Kilic A, Alam MJ, Lasco TM, Garey KW.** *FKS* mutant *Candida glabrata*: Risk factors and outcomes in patients with candidemia. *Clin Infect Dis* 2014; 59: 819–825.
- Calvo E, Pastor FJ, Mayayo E, Guarro J.** Efficacy of anidulafungin against *Aspergillus niger* *in vitro* and *in vivo*. *Int J Antimicrob Agents* 2011a; 38: 360-363.
- Calvo E, Pastor FJ, Mayayo E, Salas V, Guarro J.** *In vitro* activity and *in vivo* efficacy of anidulafungin in murine infections by *Aspergillus flavus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2011b; 55: 1290-1292.
- Cantón E, Pemán J, Sastre M, Romero M, Espinel-Ingroff A.** Killing kinetics of caspofungin, micafungin, and amphotericin B against *Candida guilliermondii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50: 2829-2832.
- Cantón E, Pemán J, Valentín A, Espinel-Ingroff A, Gobernado M.** *In vitro* activities of echinocandins against *Candida krusei* determined by three methods: MIC and minimal fungicidal concentration measurements and time-kill studies. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53: 3108-3111.

- Cantón E, Pemán J, Hervás D, Espinel-Ingroff A.** Examination of the *in vitro* fungicidal activity of echinocandins against *Candida lusitanae* by time-killing methods. *J Antimicrob Chemother* 2013; 68: 864–868.
- Cantón E, Martín-Mazuelos E, Espinel-Ingroff A.** Métodos estandarizados por el CLSI para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos (documentos M27-A3, M38-A y M44-A). En: Pemán J, Martín-Mazuelos E, Rubio MC (eds.). *Identificación y diagnóstico en micología clínica*. 2ª ed. Revista Iberoamericana de Micología, Bilbao, España. 2007.
- Chandrasekar P.** 2011. Management of invasive fungal infections: a role for polyene. *J Antimicrob Chemother* 2011; 66: 457-465.
- Chapman S, Cleary J, and Rogers D.** Amphotericin B. pp 41-56. *Essentials of clinical mycology*. Kauffman C, Sobel J, Pappas P, Dismukes W. *Essentials in Clinical Mycology*. 2nd edition 2009.
- Clemons KV, Espiritu M, Parmar R, Stevens DA.** Comparative efficacies of conventional amphotericin B, liposomal amphotericin B (AmBisome), caspofungin, micafungin, and voriconazole alone and in combination against experimental murine central nervous system aspergillosis. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49:4867–4875.
- Clemons K, Stevens D.** Animal models testing monotherapy versus combination antifungal therapy: lessons learned and future directions. *Curr Opin Infect Dis* 2006; 19: 360-364.
- Clinical and Laboratory Standards Institute.** Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard-third edition. Document M27-A3. CLSI, Wayne, Pa, USA, 2008a.

Bibliografía

- Clinical and Laboratory Standards Institute.** Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. Approved standard-second edition. Document M38-A2. CLSI, Wayne, Pa, USA, 2008b.
- Colombo AL, Melo AS, Crespo Rosas RF, Salomão R, Briones M, Hollis RJ, Messer SA, Pfaller MA.** Outbreak of *Candida rugosa* candidemia: an emerging pathogen that may be refractory to amphotericin B therapy. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis* 2003; 46: 253-257.
- Colombo AL, Cortes JA, Zurita J, Guzman-Blanco M, Alvarado Matute T, de Queiroz Telles F, Santolaya ME, Tiraboschi IN, Echevarría J, Sifuentes J, Thompson-Moya L, Nucci M; Grupo Proyecto Épico.** Recommendations for the diagnosis of candidemia in Latin America. Grupo Proyecto Épico. *Rev Iberoam Micol* 2013; 30: 150-157.
- de Hoog GS, Guarro J, Gené F, Figueras MJ.** Atlas of Clinical Fungi. Electronic version 3.1 CBS Knaw, Utrecht, NL, 2011.
- Denning DW, Hall L, Jackson M, Hollis S.** Efficacy of D0870 compared with those of itraconazole and amphotericin B in two murine models of invasive aspergillosis. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39: 1809-1814.
- Desai A, Kovanda L, Kowalski D, Lu Q, Townsend R, Bonate PL.** Population Pharmacokinetics of isavuconazole from phase 1 and phase 3 (SECURE) trial in adults and target attainment in patients with invasive aspergillosis and other filamentous fungi. *Antimicrob Agents Chemother* 2016; pii: AAC.02819-15. [Epub ahead of print].
- Desnos-Ollivier M, Moquet O, Chouaki T, Guérin AM, Dromer F.** Development of echinocandin resistance in *Clavispora lusitaniae* during caspofungin treatment. *J Clin Microbiol* 2011; 49: 2304–2306.

Di-Bonaventura G, Spedicato I, Picciani C, D'Antonio D, Piccolomini R.

In vitro pharmacodynamic characteristics of amphotericin B, caspofungin, fluconazole, and voriconazole against bloodstream isolates of infrequent *Candida* species from patients with hematologic malignancies. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 4453-4456.

Diekema DJ, Messer SA, Boyken LB, Hollis RJ, Kroeger J, Tendolkar S, Pfaller MA.

In vitro activity of seven systemically active antifungal agents against a large global collection of rare *Candida* species as determined by CLSI broth microdilution methods. *J. Clin. Microbiol* 2009; 47:3170-3177.

Dignani, M, Solomkin, JS, Anaissie, EJ. *Candida*. *Clinical Mycology*, second edition, Elsevier Inc, 1998; p. 197-229.

Dimopoulos G, Ntziora F, Rachiotis G, Armaganidis A, Falagas ME.

Candida albicans versus non-*albicans* intensive care unit-acquired bloodstream infections: Differences in risk factors and outcome. *Anesth Analg* 2008; 106: 523–529.

Dolton MJ, Ray JE, Marriott D, McLachlan AJ. Posaconazole exposure-response relationship: evaluating the utility of therapeutic drug monitoring. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; 56: 2806-2813.

Dufresne SF, Marr KA, Sydnor E, Staab JF, Karp JE, Lu K, Zhang SX, Lavallée C, Perl TM, Neofytos D.

Epidemiology of *Candida kefyr* in patients with hematologic malignancies. *J Clin Microbiol* 2014; 52: 1830–1837.

Einarsdóttir HM, Danielsen R, Gottfredsson M.

Successful treatment of *Candida glabrata* myocarditis with voriconazole. *Scand J Infect Dis* 2002; 34:778–780.

Eschenauer G, Depestel DD, Carver PL. Comparison of echinocandin antifungals. *Ther Clin Risk Manag* 2007; 3: 71-97.

Bibliografia

- Espinel-Ingroff A, Pfaller MA, Bustamante B, Canton E, Fothergill A, Fuller J, Gonzalez GM, Lass-Flörl C, Lockhart SR, Martin-Mazuelos E, Meis JF, Melhem MS, Ostrosky-Zeichner L, Pelaez T, Szeszs MW, St-Germain G, Bonfietti LX, Guarro J, Turnidge J.** Multilaboratory study of epidemiological cutoff values for detection of resistance in eight *Candida* species to fluconazole, posaconazole, and voriconazole. *Antimicrob Agents Chemother* 2014; 58: 2006–2012.
- Fekkar A, Meyer I, Brossas JY, Dannaoui E, Palous M, Uzunov M, Nguyen S, Leblond V, Mazier D, Datry A.** Rapid emergence of echinocandin resistance during *Candida kefyr* fungemia treatment with caspofungin. *Antimicrob Agents Chemother* 2013; 57: 2380–2382.
- Falci DR, Pasqualotto AC.** Profile of isavuconazole and its potential in the treatment of severe invasive fungal infections. *Infect Drug Resist* 2013; 6:163-174.
- Farmakiotis D, Kyvernitakis A, Tarrand JJ, Kontoyiannis DP.** Early initiation of appropriate treatment is associated with increased survival in cancer patients with *Candida glabrata* fungaemia: a potential benefit from infectious disease consultation. *Clin Microbiol Infect* 2015; 58: 2006-2012.
- Fernández-Silva F, Lackner M, Capilla J, Mayayo E, Sutton D, Castanheira M, Fothergill AW, Lass-Flör C, Guarro J.** *In vitro* antifungal susceptibility of *Candida glabrata* to caspofungin and the presence of *FKS* mutations correlate with treatment response in an immunocompromised murine model of invasive infection. *Antimicrob Agents Chemother* 2014; 58: 3646–3649.

- Ferrari S, Sanguinetti M, Torelli R, Posteraro B, Sanglard D.** Contribution of *CgPDR1*-regulated genes in enhanced virulence of azole-resistant *Candida glabrata*. PLoS One 2011; 6: e17589.
- Fisher MC, Henk DA, Briggs CJ, Brownstein JS, Madoff LC, McCraw SL, Gurr SL.** Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health. Nature 2012; 11: 484 (7393).
- Gil-Alonso S, Jauregizar N, Cantón E, Eraso E, Quindós G.** *In vitro* fungicidal activities of anidulafungin, caspofungin, and micafungin against *Candida glabrata*, *Candida bracarensis*, and *Candida nivariensis* evaluated by time-kill studies. Antimicrob Agents Chemother 2015; 59: 3615-3618.
- Gobernado M, Cantón E.** Anidulafungina. Rev Esp Quimioter 2008; 21: 99-114.
- Gomes MZ, Lewis RE, Kontoyiannis DP.** Mucormycosis caused by unusual mucormycetes, non-*Rhizopus*, *Mucor*, and *Lichtheimia* species 2011; 24: 411:445.
- Gómez J, García-Vázquez E, Hernández A, Espinosa C, Ruiz J.** Candidemias nosocomiales: Nuevos retos de un problema emergente. Rev Esp Quimioter 2010; 23: 158–168.
- Gomez-Lopez A, Pan D, Cuesta I, Alastruey-Izquierdo A, Rodriguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M.** Molecular identification and susceptibility profile *in vitro* of the emerging pathogen *Candida kefyr*. Diagn Microbiol Infect Dis, 2010; 66: 116-119.
- Gomez-Moyano E, Cid Lama A, Fernández Ballesteros MD, Lova Navarro M, Vera Casaño A, Crespo Erchiga V.** Efficacy of voriconazole treatment in chronic vulvovaginal candidosis due to *Candida glabrata*. Rev Iberoam Micol 2013; 30:61–63.

Bibliografía

- Graybill JR, Bocanegra R, Najvar LK, Loebenberg D, Luther MF.** Granulocyte colony-stimulating factor and azole antifungal therapy in murine aspergillosis: role of immune suppression. *Antimicrob. Agents Chemother* 1998; 42: 2467-2473.
- Guarro J.** Lessons from animal studies for the treatment of invasive human infections due to uncommon fungi. *J Antimicrob Chemother* 2011; 66: 1447-1466.
- Guarro J.** Taxonomía y biología de los hongos causantes de infección en humanos. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2012; 30: 33–39.
- Gubbins P and Anaissie E.** Antifungal therapy. pp 165-199. Anaissie E, McGinnis M, Pfaller M. *Clinical Mycology*. 2nd edition 2009.
- Hernandez S, Gonzalez GM, McCarthy DI, Colombo AL, Najvar LK, Bocanegra R, Graybill JR.** Alternatives to amphotericin B for *Candida rugosa* infection. *J Antimicrob Chemother* 2004; 54: 477-480.
- Hibbett DS, Binder M, Bischoff JF, Blackwell M, Cannon PF, Eriksson OE, Huhndorf S, James T, Kirk PM, Lücking R, Thorsten Lumbsch H, Lutzoni F, Matheny PB, McLaughlin DJ, Powell MJ, Redhead S, Schoch CL, Spatafora JW, Stalpers JA, Vilgalys R, Aime MC, Aptroot A, Bauer R, Begerow D, Benny GL, Castlebury LA, Crous PW, Dai YC, Gams W, Geiser DM, Griffith GW, Gueidan C, Hawksworth DL, Hestmark G, Hosaka K, Humber RA, Hyde KD, Ironside JE, Kõljalg U, Kurtzman CP, Larsson KH, Lichtwardt R, Longcore J, Miadlikowska J, Miller A, Moncalvo JM, Mozley-Standridge S, Oberwinkler F, Parmasto E, Reeb V, Rogers JD, Roux C, Ryvarden L, Sampaio JP, Schüssler A, Sugiyama J, Thorn RG, Tibell L, Untereiner WA, Walker C, Wang Z, Weir A, Weiss M, White MM, Winka K, Yao YJ, Zhang N.** A higher-level phylogenetic classification of the fungi. *Mycol Res*

2007; 111: 509-547.

Hoffmann K, Voigt K, Kirk PM. *Mortierellomycotina* subphyl. nov., based on multi-gene genealogies. Mycotaxon 2011; 115: 353–363.

Humber RA. Entomophthoromycota: A new phylum and reclassification for entomophthoroid fungi. Mycotaxon 2012; 120: 477–492.

Jensen RH, Arendrup MC. *Candida palmioleophila*: characterization of a previously overlooked pathogen and its unique susceptibility profile in comparison with five related species. J Clin Microbiol 2011; 49: 549-556.

Kanafani ZA, Perfect JR. Antimicrobial resistance: resistance to antifungal agents: mechanisms and clinical impact. Clin Infect Dis 2008; 46 :120-128.

Khan Z, Ahmad S, Al-Obaid K, Joseph L, Chandy R. *Candida kefyr* as a cause of bloodstream infection and adjunctive role of biomarkers in its diagnosis. J Mycol Med 2015; 25: 71 –75.

Khodadadi H, Mirhendi H, Makimura K, Satoh K, Karimi L, Izadi S. β -D-glucan assay in diagnosis and monitoring the systemic candidiasis in a rat model. Jundishapur J Microbiol 2014; 7:e10247.

Khunnamwong P, Lertwattanasakul N, Jindamorakot S, Limtong S, Lachance MA. Description of *Diutina* gen. nov., *Diutina siamensis*, f.a. sp. nov., and reassignment of *Candida catenulata*, *Candida mesorugosa*, *Candida neorugosa*, *Candida pseudorugosa*, *Candida ranongensis*, *Candida rugosa* and *Candida scorzettiae* to the genus *Diutina*. Int J Syst Evol Microbiol 2015; 65: 4701-4709.

Kirk PM, Cannon PF, Minter DW, Stalpers JA. Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi. 10th ed. Wallingford: CAB International 2008.

Bibliografia

- Klepser ME, Wolfe EJ, Jones RN, Nightingale CH, Pfaller MA.** Antifungal pharmacodynamic characteristics of fluconazole and amphotericin B tested against *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41: 1392–5247.
- Kolaczowska A, Kolaczowski M.** 2016. Drug resistance mechanisms and their regulation in non-*albicans Candida* species. *J Antimicrob Chemother* 2016; 71: 1438-1450.
- Kovacicova G, Hanzen J, Pisarcikova M, Sejnova D, Horn J, Babela R, Svetlansky I, Lovaszova M, Gogova M, Krcmery V.** Nosocomial fungemia due to amphotericin B-resistant *Candida* spp. in three pediatric patients after previous neurosurgery for brain tumors. *J Infect Chemother* 2001;7: 45-48.
- Lattif A and Swindell K.** History of Antifungals 2010 pp 1-10. Ghannoum M, John R. Perfect. Antifungal therapy. 1st edition.
- Lass-Flörl C, Perkhofer S.** *In vitro* susceptibility-testing in *Aspergillus* species. *Mycoses* 2008; 51: 437-446.
- Lengerova M, Kocmanova I, Racil Z, Hrnairova K, Pospisilova S, Mayer J, Najvar LK, Wiederhold NP, Kirkpatrick WR, Patterson TF.** Detection and measurement of fungal burden in a guinea pig model of invasive pulmonary aspergillosis by novel quantitative nested real-time PCR compared with galactomannan and (1,3)- β -D-glucan detection. *J Clin Microbiol* 2012; 50: 602-608.
- Lipp HP.** Clinical pharmacodynamics and pharmacokinetics of the antifungal extended-spectrum triazole posaconazole: an overview. *Br J Clin Pharmacol* 2010; 70: 471-480.
- Lockhart SR, Iqbal N, Cleveland AA, Farley MM, Harrison LH, Bolden CB, Baughman W, Stein B, Hollick R, Park BJ, Chiller T.** Species identification and antifungal susceptibility testing of *Candida*

bloodstream isolates from population-based surveillance studies in two U.S. cities from 2008 to 2011. *Journal of Clinical Microbiology* 2012; 50: 3435–3442.

Maertens JA, Raad II, Marr KA, Patterson TF, Kontoyiannis DP, Cornely OA, Bow EJ, Rahav G, Neofytos D, Aoun M, Baddley JW, Giladi M, Heinz WJ, Herbrecht R, Hope W, Karthaus M, Lee DG, Lortholary O, Morrison VA, Oren I, Selleslag D, Shoham S, Thompson GR 3rd, Lee M, Maher RM, Schmitt-Hoffmann AH, Zeiher B, Ullmann AJ. Isavuconazole versus voriconazole for primary treatment of invasive mould disease caused by *Aspergillus* and other filamentous fungi (SECURE): a phase 3, randomised-controlled, non-inferiority trial. *Lancet* 2016; 20: 760-769.

Majithiya J, Sharp A, Parmar A, Denning DW, Warn PA. Efficacy of isavuconazole, voriconazole and fluconazole in temporarily neutropenic murine models of disseminated *Candida tropicalis* and *Candida krusei*. *J Antimicrob Chemother* 2009; 63: 161–166.

Mariné M, Pastor FJ, Serena C, Guarro J. Efficacy of triazoles in a murine disseminated infection by *Candida krusei*. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53: 3585–3588.

Mariné M, Pastor FJ, Guarro J. Efficacy of posaconazole in a murine disseminated infection by *Candida tropicalis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54:530-532.

Martin-Vicente A, Capilla J, Guarro J. *In vivo* synergy of amphotericin B plus posaconazole in murine aspergillosis. *Antimicrob Agents Chemother* 2015; 60: 296-300.

Nucci M, Marr K. Emerging fungal diseases. *Clin Infect Dis* 2005; 41: 521–526.

Bibliografía

- Nucci M, Thompson-Moya L, Guzman-Blanco M, Tiraboschi IN, Cortes JA, Echevarría J, Sifuentes J, Zurita J, Santolaya ME, Alvarado Matute T, de Queiroz Telles F, Colombo AL; Grupo Proyecto Épico.** Recommendations for the management of candidemia in adults in Latin America. *Rev Iberoam Micol* 2013; 30: 179–188.
- Odds FC, van Gerven F, Espinel-Ingroff A, Bartlett MS, Ghannoum MA, Lancaster MV, Pfaller MA, Rex JH, Rinaldi MG, and Walsh TJ.** Evaluation of possible correlations between antifungal susceptibilities of filamentous fungi *in vitro* and antifungal treatment outcomes in animal infection models. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42: 282–288.
- Ortoneda M, Capilla J, Pastor FJ, Serena C, Guarro J.** Interaction of granulocyte colony-stimulating factor and high doses of liposomal amphotericin B in the treatment of systemic murine scedosporiosis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2004; 50: 247-251.
- Ostrosky-Zeichner L, Oude Lashof a ML, Kullberg BJ, Rex JH.** Voriconazole salvage treatment of invasive candidiasis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2003; 22: 651–655.
- Pappas PG, Kauffman CA, Andes DR, Clancy CJ, Marr KA, Ostrosky-Zeichner L, Reboli AC, Schuster MG, Vazquez JA, Walsh TJ, Zaoutis TE, Sobel JD.** Clinical Practice Guideline for the Management of Candidiasis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 2016; 62: e1-50.
- Paredes K, Sutton DA, Cano J, Fothergill AW, Lawhon SD, Zhang S, Watkins JP, Guarro J.** Molecular identification and antifungal susceptibility testing of clinical isolates of the *Candida rugosa* species complex and proposal of the new species *Candida neorugosa*. *J Clin Microbiol* 2012; 50: 2397-2403.

- Paredes K, Pastor FJ, Capilla J, Sutton DA, Mayayo E, Fothergill AW, Guarro J.** Therapies against murine *Candida guilliermondii* infection, relationship between *in vitro* antifungal pharmacodynamics and outcome. Rev Iberoam de Micol 2015; 32: 34–39.
- Pastor FJ, Guarro, J.** *In vitro* activity of the echinocandins- How should it be evaluated?. Rev Iberoam Micol 2005; 22: 133-140.
- Pastor FJ, Guarro, J.** Micafungina en el tratamiento de la infección fúngica en modelos animales. Rev Iberoam Micol 2009; 26: 42–48.
- Pastor FJ, Guarro J.** Treatment of *Aspergillus terreus* infections: A clinical problem not yet resolved. Int J Antimicrob Agents 2014; 44: 281–289.
- Pemán J, Salavert M.** General epidemiology of invasive fungal disease. Enferm Infecc Microbiol Clin 2012; 30: 90-98.
- Perfect JR, Dismukes WE, Dromer F, Goldman DL, Graybill JR, Hamill RJ, Harrison TS, Larsen RA, Lortholary O, Nguyen MH, Pappas PG, Powderly WG, Singh N, Sobel JD, Sorrell TC.** Clinical practice guidelines for the management of cryptococcal disease: 2010 update by the Infectious Diseases Society of América. Clin Infect Dis 2010; 1: 291-322.
- Pfaller MA, Diekema DJ, Messer SA, Boyken L, Hollis RJ, Jones RN; International Fungal Surveillance Participant Group.** *In vitro* susceptibilities of rare *Candida* bloodstream isolates to ravuconazole and three comparative antifungal agents. Diagn Microbiol Infect Dis Pfall 2004; 48: 101–105.
- Pfaller MA, McGinnis MR.** The laboratory and clinical mycology. Clinical mycology second edition, Elsevier Inc, 2009; p. 55-77.
- Pfaller M, Diekema D, Gibbs D, Newell V, Meis J, Gould I, Fu W, Colombo AL, Rodriguez-Noriega E; Global Antifungal Surveillance Study.** Results from the ARTEMIS DISK Global

Bibliografía

- Antifungal Surveillance study, 1997 to 2005: An 8.5-year analysis of susceptibilities of *Candida* species and other yeast species to fluconazole and voriconazole determined by CLSI standardized disk diffusion testing. *J Clin Microbiol* 2007; 45: 1735–1745.
- Pfaller MA.** Antifungal drug resistance: Mechanisms, epidemiology, and consequences for treatment. *Am J Med* 2012; 125:S3–13.
- Pfaller MA, Diekema DJ.** Progress in antifungal susceptibility testing of *Candida* spp. by use of Clinical and Laboratory Standards Institute broth microdilution methods, 2010 to 2012. *J Clin Microbiol* 2012; 50: 2846-2856.
- Pfaller MA, Diekema DJ, Jones RN, Castanheira M.** Use of anidulafungin as a surrogate marker to predict susceptibility and resistance to caspofungin among 4,290 clinical isolates of *Candida* by using CLSI methods and interpretive criteria. *J Clin Microbiol* 2014; 52: 3223–3229.
- Pfaller MA, Messer SA, Diekema DJ, Jones RN, Castanheira M.** Use of micafungin as a surrogate marker to predict susceptibility and resistance to caspofungin among 3,764 clinical isolates of *Candida* by use of clsi methods and interpretive criteria. *J Clin Microbiol* 2014; 52: 108–114.
- Pfaller MA, Andes DR, Diekema DJ, Hoen DL, Reboli AC, Rotstein C, Franks B, Azie NE.** Epidemiology and outcomes of invasive candidiasis due to non-*albicans* species of *Candida* in 2,496 patients: data from Prospective Antifungal Therapy (PATH) registry 2004-2008. *PLoS ONE* 2014; 9: e101510.
- Pontón J, Moragues MD, Gené J, Guarro J, Quindós G.** Hongos y actinomicetos alergénicos. *Rev Iberoam Micol.* 2002; pp. 1-46.
- Pontón J.** Utilidad de los marcadores biológicos en el diagnóstico de la

candidiasis invasora. Rev Iberoam Micol 2009; 26: 8-14.

Quindós G, Eraso E. Importancia actual de las aspergilosis invasora. En: Pontón J. (ed.). Aspergilosis invasora. 2ª ed. Revista Iberoamericana de Micología-Asociación Española de Micología, Bilbao, España. 2008; pp. 3-6.

Quindós G. Epidemiology of candidaemia and invasive candidiasis. A changing face. Rev Iberoam Micol 2014; 31: 42–48.

Rex JH, Pfaller MA. Has antifungal susceptibility testing come of age?. Clin Infect Dis 2002; 35: 982-989.

Ruiz-Camps I, Cuenca-Estrella M. Antifungal for systemic use. Enferm Infecc Microbiol Clin 2009; 27: 353-362.

Sabatelli F, Patel R, Mann P, Mendrick C, Norris C, Hare R, Loebenberg D, Black TA, McNicholas PM. *In vitro* activities of posaconazole, fluconazole, itraconazole, voriconazole, and amphotericin B against a large collection of clinically important moulds and yeasts. Antimicrob Agents Chemother 2006; 50: 2009–2015.

Salas V, Pastor FJ, Rodríguez MM, Calvo E, Mayayo E, Guarro J. *In vitro* activity and *in vivo* efficacy of posaconazole in treatment of murine infections by different isolates of the *Aspergillus terreus* complex. Antimicrob Agents Chemother 2010; 55: 676-679.

Salas V, Pastor FJ, Capilla J, Sutton DA, Mayayo E, Fothergill AW, Rinaldi MG, Guarro J. Evaluation of the correlation of caspofungin MICs and treatment outcome in murine infections by wild type strains of *Candida parapsilosis*. Diagn Microbiol Infect Dis 2013a; 77: 41-45.

Bibliografía

- Salas V, Pastor FJ, Sutton DA, Calvo E, Mayayo E, Fothergill AW, Rinaldi MG, Guarro J.** MIC values of voriconazole are predictive of treatment results in murine infections by *Aspergillus terreus* species complex. *Antimicrob Agents Chemother* 2013b; 57: 1532-1534.
- Sanchis M, Pastor FJ, Capilla J, Sutton DA, Fothergill AW, Guarro J.** Experimental therapy with azoles against *Candida guilliermondii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2014; 58: 6255–6257.
- Sanchis M, Guarro J, Sutton DA, Fothergill AW, Wiederhold N, Capilla J.** Voriconazole and posaconazole therapy for experimental *Candida lusitanae* infection. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2016; 84: 48–51.
- Sandoval-Denis M, Pastor FJ, Capilla J, Sutton DA, Fothergill AW, Guarro J.** *In vitro* pharmacodynamics and *in vivo* efficacy of fluconazole, amphotericin B and caspofungin in a murine infection by *Candida lusitanae*. *Int J Antimicrob Agents* 2013; 43: 161-164.
- Sanglard D, Ischer F, Calabrese D, Majcherczyk P a, Bille J.** The ATP binding cassette transporter gene *CgCDR1* from *Candida glabrata* is involved in the resistance of clinical isolates to azole antifungal agents. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43:2753–2765.
- Sanguinetti M, Posteraro B, Fiori B, Ranno S, Torelli R, Fadda G.** Mechanisms of azole resistance in clinical isolates of *Candida glabrata* collected during a hospital survey of antifungal resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49:668–679.
- Santolaya ME, Alvarado Matute T, de Queiroz Telles F, Colombo AL, Zurita J, Tiraboschi IN, Cortes JA, Thompson-Moya L, Guzman-Blanco M, Sifuentes J, Echevarría J, Nucci M.** Recommendations for the management of candidemia in neonates in Latin America. *Rev Iberoam. Micol* 2013; 30:158-170.

- Savini V, Catavittello C, Onofrillo D, Masciarelli G, Astolfi D, Balbinot A, Febbo F, D'Amario C, D'Antonio D.** What do we know about *Candida guilliermondii*? A voyage throughout past and current literature about this emerging yeast. *Mycoses* 2011; 54: 434–441.
- Sims CR, Jaijakul S, Mohr J, Rodriguez J, Finkelman M, Ostrosky-Zeichner L.** Correlation of clinical outcomes with β -glucan levels in patients with invasive candidiasis. *J Clin Microbiol* 2012; 50: 2104-2106.
- Smith J, Andes D.** Therapeutic drug monitoring of antifungals: pharmacokinetic and pharmacodynamic considerations. *Ther Drug Monit* 2008; 30: 167-172.
- Sóczó G, Kardos G, McNicholas PM, Balogh E, Gergely L, Varga I, Kelentey B, Majoros L.** Correlation of posaconazole minimum fungicidal concentration and time-kill test against nine *Candida* species. *J Antimicrob Chemother* 2007; 60: 1004–1009.
- Spellberg B, Edwards JE.** Type 1/Type 2 immunity in infectious diseases. *Clin Infect Dis* 2001; 32: 76-102.
- Spreghini E, Maida CM, Milici ME, Scalise G, Barchiesi F.** Posaconazole activity against *Candida glabrata* after exposure to caspofungin or amphotericin B. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 52: 513–517.
- Spreghini E, Maida CM, Tomassetti S, Orlando F, Giannini D, Milici ME, Scalise G, Barchiesi F.** Posaconazole against *Candida glabrata* isolates with various susceptibilities to fluconazole. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52: 1929-1933.
- Steinbach WJ, Perfect JR.** Newer antifungal therapy for emerging fungal pathogens. *Int J Infect Dis* 2003; 7: 5-20.
- Steinbach, WJ, Benjamin Jr DK, Kontoyiannis DP, Perfect JR, Lutsar I, Marr KA, Lionakis MS, Torres HA, Jafri H, Walsh TJ.** *Infections*

Bibliografía

- due to *Aspergillus terreus*: a multicenter retrospective analysis of 83 cases. Clin Infect Dis 2004; 39: 192-198.
- Steinbach WJ, Marr KA, Anaissie EJ, Azie N, Quan SP, Meier-Kriesche HU, Apewokin S, Horn DL.** Clinical epidemiology of 960 patients with invasive aspergillosis from the PATH Alliance registry. J Infect 2012; 65: 453-64.
- Szabó Z, Szilágyi J, Tavanti A, Kardos G, Rozgonyi F, Bayegan S, Majoros L.** *In vitro* efficacy of 5 antifungal agents against *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* as determined by time-kill methodology. Diagn Microbiol Infect Dis 2009; 64: 283–288.
- Szabó Z, Borbely A, Kardos G, Somogyvari F, Kemény-Beke A, Asztalos L, Rozgonyi F, Majoros L.** *In vitro* efficacy of amphotericin B, 5-fluorocytosine, fluconazole, voriconazole and posaconazole against *Candida dubliniensis* isolates using time-kill methodology. Mycoses 2010; 53: 196–199.
- Torrado JJ, Espada R, Ballesteros MP, Torrado-Santiago S.** Amphotericin B formulations and drug targeting. J Pharm Sci 2008; 97: 2405-2425.
- Torres-Narbona M, Guinea J, Muñoz P, Bouza E.** Zigomicetos y zigomicosis en la era de las nuevas terapias antifúngicas. Rev Esp Quimioterap 2007; 20: 375-386.
- Ullmann AJ, Akova M, Herbrecht R, Viscoli C, Arendrup MC, Arikian-Akdagli S, Bassetti M, Bille J, Calandra T, Castagnola E, Cornely OA, Donnelly JP, Garbino J, Groll AH, Hope WW, Jensen HE, Kullberg BJ, Lass-Flörl C, Lortholary O, Meersseman W, Petrikos G, Richardson MD, Roilides E, Verweij PE, Cuenca-Estrella M; ESCMID Fungal Infection Study Group.** ESCMID* guideline for the diagnosis and management of *Candida* diseases

2012: Adults with haematological malignancies and after haematopoietic stem cell transplantation (HCT). *Clin Microbiol Infect* 2012; 18 Suppl 7: 53-67.

Walsh TJ, Anaissie EJ, Denning DW, Herbrecht R, Kontoyiannis DP, Marr KA, Morrison VA, Segal BH, Steinbach WJ, Stevens DA, van Burik JA, Wingard JR, Patterson TF; Infectious Diseases Society of America. Treatment of aspergillosis: clinical practice guidelines of the infectious diseases society of America. *Clin Infect Dis* 2008; 46: 327-360.

Whittaker RH. New concepts of kingdoms of organisms. *Science* 1969; 163:150–160.

Zaragoza R, Pemán J. Antifungal treatment options in the critically ill patient. *Rev. Iberoam. Micol* 2012; 29: 108-113.

