



EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD IN VITRO Y DE LA EFICACIA EXPERIMENTAL IN VIVO DE ANTIBIÓTICOS ANTIFÚNGICOS FRENTE A HONGOS OPORTUNISTAS EMERGENTES

Valentina Lidia Salas Cifuentes

Dipòsit Legal: T. 1294-2012

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

WARNING. Access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
DEPARTAMENT DE CIÈNCIES MÈDIQUES BÀSIQUES

**Evaluación de la actividad *in vitro* y de la
eficacia experimental *in vivo* de antibióticos
antifúngicos frente a hongos oportunistas
emergentes**

Valentina Lidia Salas Cifuentes
Tesis Doctoral
2012

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD IN VITRO Y DE LA EFICACIA EXPERIMENTAL
IN VIVO DE ANTIBIÓTICOS ANTIFÚNGICOS FRENTE A HONGOS
OPORTUNISTAS EMERGENTES
Valentina Lidia Salas Cifuentes
Dipòsit Legal: T. 1294-2012



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 y Francisco Javier Pastor Molas, Profesor Titular de la Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud de la Universidad Rovira i Virgili

HACEN CONSTAR QUE:

La Tesis Doctoral titulada “**Evaluación de la actividad *in vitro* y de la eficacia experimental *in vivo* de antibióticos antifúngicos frente a hongos oportunistas emergentes**”, presentada por Valentina Lidia Salas Cifuentes, ha sido realizada bajo su dirección 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, 25 de Junio de 2012

Dr. Josep Guarro Artigas

Dr. Francisco Javier Pastor Molas

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD IN VITRO Y DE LA EFICACIA EXPERIMENTAL
IN VIVO DE ANTIBIÓTICOS ANTIFÚNGICOS FRENTE A HONGOS
OPORTUNISTAS EMERGENTES
Valentina Lidia Salas Cifuentes
Dipòsit Legal: T. 1294-2012

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD IN VITRO Y DE LA EFICACIA EXPERIMENTAL
IN VIVO DE ANTIBIÓTICOS ANTIFÚNGICOS FRENTE A HONGOS
OPORTUNISTAS EMERGENTES
Valentina Lidia Salas Cifuentes
Dipòsit Legal: T. 1294-2012

A mi madre

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD IN VITRO Y DE LA EFICACIA EXPERIMENTAL
IN VIVO DE ANTIBIÓTICOS ANTIFÚNGICOS FRENTE A HONGOS
OPORTUNISTAS EMERGENTES
Valentina Lidia Salas Cifuentes
Dipòsit Legal: T. 1294-2012

Agradecimientos

Quisiera expresar mis agradecimientos a todas y cada una de las personas que han hecho posible la realización de la presente tesis.

A mis directores de tesis, Dr. Josep Guarro Artigas, por brindarme la oportunidad de integrarme a su grupo de investigación, por el respeto infundido, y por compartir parte de tu experiencia y conocimientos en pos de la formación de cada uno de sus doctorandos. Al Dr. Francisco Javier Pastor Molas, por la orientación, y el constante esmero en cada una de las correcciones de los trabajos llevadas a cabo a lo largo de estos años.

Al Dr. Luis Zaror, porque depositaste mucha confianza en mí, gracias! A la Dra. María José Figueras, quien me hizo partícipe de un proyecto sin el cual, nada de ésto sería posible. Extiendo mis agradecimientos a las Dras. Josepa Gené, Roxana Beaz y Kendra Rodríguez, y a los Dres. Josep Cano, Alberto Stchigel, Emilio Mayayo y Javier Capilla, por la simpatía y por estar siempre prestos a resolver las dudas suscitadas en el camino. Asimismo, agradezco a la Dra. Dania García por el cariño y las sonrisas que eres capaz de dibujar.

Como no agradecer a cada uno de los amigos que este proyecto ha “insertado” en mi vida. Al Dr. Eduardo Alvarez, gracias por la motivación, por tu confianza, cariño, amistad y por compartir sin egoísmos! A la Dra. Carolina Silvera, amiga sincera, luz brillante y alegre, como olvidar cada abrazo que me haz dado, esos que han convertido una lágrima en una sonrisa, gracias por siempre! A mi compañera de tantas bellas rutas, de alegrías y sin sabores, de risas y llantos, Fabiola Fernández, por abrir caminos de amistad y confianza, por lo mucho vivido y por lo que queda aún, gracias Fa!! Al Dr. Hugo Madrid, la Dra. Haybrig Perdomo (*Loca!!!*) valoro cada minuto que me han regalado, ha sido muy grato compartir con ustedes esta experiencia y agradezco infinitamente su constante empuje, no duden de mi gran cariño hacia ustedes. A la Dra. Mar Rodríguez y al Dr. Enrique Calvo, mis compañeros y maestros, gracias por haberme enseñado con tanta paciencia cada uno de los pasos que han conducido a este capítulo. Gracias por su cariño, por cada café compartido y por animarme siempre, estoy orgullosa de conocerlos. Y como olvidarte “Rubia” siempre me haces reir, eres especial, lo mejor para tí Yasmina Marín!

A Kathiuska Paredes y Arturo Levican, chiquillos: *gracias totales!* A cada uno de mis compañeros de laboratorio, Margarita, Keith, Fadua, Ale, Marcelo, porque hemos compartido buenos momentos. A mi compañera y colega, ahora Sra. Alejandra Otárola., gracias y todo el éxito en tu vida.

A cada persona que ha pasado por este laboratorio y ha dejado una huella imborrable: Dra. Anabel Alperi, gran compañera y gran mujer. Max Aravena, quien diría que la vida me regalaría amigos como tú y Naomi, los quiero. Jessica Pérez e Ingrid Arrillaga, he extrañado innumerables veces su alegría. A Shiva, *a very good person!* A Julio Mena, gracias por tu cercanía y por esos buenos mojitos! A Mabel Inza, mil gracias, fuiste una súper jefa y una mano comprensiva. A Mónica Azor, por su calidez. A mis primeras compañeras, Noelia y Luisa, gracias por su apoyo, comprensión y por construir un equipo conmigo.

Cati Núñez. Gracias por ser tan buena en tu trabajo y como persona, cordial, amable, esforzada, simplemente eres genial, mereces lo mejor. Nuria Pilas y Carme Sanmartí, muchísimas gracias por su ayuda y simpatía. Amparo Aguilar, como no valorar el cariño y el apoyo que me haz dado, eres una súper mujer, nunca olvidaré esa calçotada, muchas gracias! A Esperanza y a Juan, por su amabilidad, por su ayuda y por su simpatía. A Montse Pallàs e Imma Abelló gracias por resolver cada duda, por esas conversaciones alegres y por toda la ayuda que me han brindado. A Phil, por tener tanto temple y constancia para que yo pudiera aprender algo de inglés: *thank you so much!* A Pilar Hernández gracias por cada análisis estadístico, por la buena disponibilidad, sin tí nunca hubiera hecho esos gráficos tan bellos!!

A la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Católica de Temuco, a Ceci y a Yasna por contestar cada duda, a mis profesores de carrera, en especial a Gabriel Peña, Ángela Olavarría y Oriana Betancourt gracias por su impulso y sus enseñanzas. A Miguel Ángel Mansilla, por darme la oportunidad de desarrollarme en mis primeros pasos como profesional, aprendí mucho a tu lado.

A Carmen Gloria y a Rodri, a Sil y a Miguel, Dayand y familia, Karin Berndt, a Renata y a Natalia, a cada compañero de carrera, a cada persona que forma parte de mi historia, para bien o para mal, cada paso se transforma en experiencia, a cada persona que ha levantado su voz, pronunciando un simple “tú puedes”, que sepan que cada impulso a empedrado mi camino.

A mi Lukis y a mi Florencia, mis acompañantes de largos senderos, por su cariño infinito, sus miradas afables y efusivas, por escoltar mi marcha sin reclamos, gracias.

A mis *amiguis*: Lore, Aly, y Shon, a mis amigos y amigas, Nivia Cristian, Moni, Pame, Eve, Clau, Vivi, Tere, Katy y Marce, mis compañeros de vida, porque a pesar de estar tan lejos, nunca han soltado mi mano. La amistad es un privilegio del cual disfruto cada día porque ustedes lo hacen posible. A mi tía Cristina Gajardo, mi profesora y amiga, compañera fiel toda mi vida...te re quiero!!

A mi gran familia, primitas y primitos, tías y tíos, hermanitos y cuñis, sobrinos (as), por estar siempre a mi lado, por creer en mí en todo momento. A mi papá, Guillermo Salas, por tu cariño inmenso y por enfrentar con entereza y paciencia las vicisitudes impuestas por la vida. Carito y Cynthia con y por ustedes: al infinito y más allá! No se pueden imaginar lo que significan en mi vida. Ely, gracias por estar siempre, te quiero demasiado y deseo lo mejor en tu vida, eres una mujer admirable.

A mi hermanita Emelyn y mi sobrina Jhael Valentina, quienes trazan sonrisas de alegría, risas de felicidad y lágrimas de emoción y orgullo, ustedes iluminan mi vida con su luz, Las amo. Y como no decir gracias a mi tío René por tu cariño y por cuidar a mis tesoros!

A Valentina Cifuentes Quiroga, mi mejor amiga, mi mejor compañera y mi madre. Gracias infinitas por tu dedicación, esfuerzo y por tu amor sin límites. Gracias por secar mis lágrimas con un beso. Gracias por abrazar mis alegrías. Tú eres la gran artífice de mi felicidad. Tú eres mi súper heroína. Te re-amo.

Gracias a Dios por todo lo que ha puesto en mis manos.

Finalmente, a cada persona que se esfuerza por enseñar con humildad, a cada persona que se empeña en destronar la soberbia, a cada persona dispuesta a construir.....

¡Gracias!

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD IN VITRO Y DE LA EFICACIA EXPERIMENTAL
IN VIVO DE ANTIBIÓTICOS ANTIFÚNGICOS FRENTE A HONGOS
OPORTUNISTAS EMERGENTES
Valentina Lidia Salas Cifuentes
Dipòsit Legal: T. 1294-2012

1. Introducción

1.1 Generalidades	3
1.2 Micosis causadas por hongos oportunistas	5
Micosis superficiales.....	6
Micosis subcutáneas.....	6
Micosis sistémicas.....	7
1.3 Micosis causadas por hongos levaduriformes	8
1.3.1 Candidiasis	8
1.3.1.1. <i>Candida parapsilosis</i>	9
1.4 Micosis causadas por hongos filamentosos	9
1.4.1 Aspergilosis	9
1.4.1.1 <i>Aspergillus fumigatus</i>	11
1.4.1.2 <i>Aspergillus terreus</i>	11
1.4.2 Mucoramicosis	12
1.4.2.1 <i>Mucor circinelloides</i>	14
1.4.2.2 <i>Apophysomyces</i> spp. y <i>Saksenaea</i> spp.....	14
1.5 Antifúngicos	15
1.5.1 Polienos.....	16
1.5.2 Azoles	17
1.5.3 Análogos de precursores de ácidos nucleicos	19
1.5.4 Equinocandinas	19
1.5.5 Alilaminas	20

1.6 Determinación de la sensibilidad a los antifúngicos	20
1.6.1 Métodos <i>in vitro</i>.....	21
1.6.1.1 Las levaduras.....	22
1.6.1.2 Los hongos filamentosos.....	23
1.6.2 Modelos <i>in vivo</i>. Modelos experimentales.....	25
1.6.3 Correlación entre los métodos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	26
2. Interés y objetivos del estudio	29
3. Materiales y Métodos	37
3.1 Estudios <i>in vitro</i>	39
3.1.1 Cepas.....	39
3.1.2 Conservación de las cepas.....	40
3.1.3 Agentes antifúngicos.....	40
3.1.4 Metodología.....	41
3.1.4.1 Preparación de las microplacas de antifúngicos.....	41
3.1.4.2 Preparación de los inóculos para los estudios <i>in vitro</i>	43
3.1.4.3 Estudio de disco difusión.....	44
3.1.4.4 Definiciones.....	45
3.2 Estudios <i>in vivo</i>.....	46
3.2.1 Cepas.....	46
3.2.2 Animales de experimentación.....	48
3.2.3 Inmunosupresión.....	48
3.2.4 Infección.....	49
3.2.5 Fármacos.....	49
3.2.6 Tratamiento, dosis y vías de administración.....	50

3.2.7	Recuperación fúngica a partir de órganos del animal infectado.....	51
3.2.8	Análisis adicionales de la eficacia de los antifúngicos...	51
3.2.9	Bioensayo.....	51
3.2.10	Detección y cuantificación de antígenos en suero.....	53
3.2.11	Histopatología.....	55
3.2.12	Análisis estadístico.....	56
4.	Resultados	59
4.1	Anidulafungin in the treatment of experimental invasive infection by <i>Candida parapsilosis</i>: <i>in vitro</i> activity, (1→3)-β-D-glucan and mannan serum levels, histopathological findings, and <i>in vivo</i> efficacy.	61
	Salas V, Pastor FJ, Calvo E, Mayayo E, Quindós G, Carrillo A, Guarro J. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2011, 55: 4985-4989.	
4.2	Efficacy of caspofungin in a murine model of disseminated infection by <i>Candida parapsilosis</i>.	69
	Salas V, Pastor FJ, Calvo E, Sutton DA, Fothergill AW, Rinaldi MG, Guarro J. En preparación.	
4.3	<i>In vitro</i> activity and <i>in vivo</i> efficacy of posaconazole in the treatment of murine infections by different isolates of the <i>Aspergillus terreus</i> complex .	85
	Salas V, Pastor FJ, Rodríguez MM, Calvo E, Mayayo E, Guarro J. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2011, 55: 676-679.	
4.4	Minimal concentration inhibitory values of voriconazole are predictive of treatment results in murine infections by <i>Aspergillus terreus</i> species complex.	91
	Salas V, Pastor FJ, Sutton DA, Calvo E, Mayayo M, Fothergill AW, Rinaldi MG, Guarro J. Enviado a la revista Antimicrobial Agents and Chemotherapy	

4.5 Evaluation of *in vitro* activity of voriconazole as predictive of *in vivo* outcome in a murine *Aspergillus fumigatus* infection model. 105

Salas V, Pastor FJ, Calvo E, Sutton DA, Fothergill AW, Guarro J.

Enviado a la revista Antimicrobial Agents and Chemotherapy.

4.6 *In vitro* and *in vivo* activities of posaconazole and amphotericin B in a murine invasive infection by *Mucor circinelloides*: poor efficacy of posaconazole. 123

Salas V, Pastor FJ, Calvo E, Alvarez E, Sutton DA, Mayayo E, Fothergill AW, Rinaldi MG, Guarro J.

Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2012, 56: 2246-2250.

4.7 Efficacy of posaconazole in a murine model of disseminated infection by *Apophysomyces variabilis*. 131

Salas V, Pastor FJ, Calvo E, Sutton DA, Chander J, Mayayo E, Alvarez E, Guarro J.

Journal Antimicrobial Chemotherapy. 2012, 67: 1712-1715.

4.8 Experimental murine model of disseminated infection by *Saksenaea vasiformis*: successful treatment with posaconazole 137

Salas V, Pastor FJ, Calvo E, Sutton D, García-Hermoso D, Mayayo E, Dromer F, Fothergill A, Alvarez E, Guarro J.

Medical Mycology 2012, DOI: 10.3109/13693786.2012.673137

5. Discusión 145

5.1 Candidiasis invasora 147

5.1.1 *Candida parapsilosis*..... 147

5.2 Aspergilosis invasora..... 150

5.2.1 *Aspergillus fumigatus*..... 151

5.2.2 *Aspergillus terreus*..... 153

5.3 Mucoramicosis invasora..... 155

5.3.1 *Mucor circinelloides*..... 157

5.3.2 *Apophysomyces variabilis* y *Saksenaea vasiformis* 159

6. Conclusiones	163
7. Bibliografía	169

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD IN VITRO Y DE LA EFICACIA EXPERIMENTAL
IN VIVO DE ANTIBIÓTICOS ANTIFÚNGICOS FRENTE A HONGOS
OPORTUNISTAS EMERGENTES
Valentina Lidia Salas Cifuentes
Dipòsit Legal: T. 1294-2012

1. INTRODUCCIÓN

1. Introducción.

1.1. Generalidades

Los hongos constituyen un grupo muy numeroso y complejo de organismos, los cuales presentan una amplia distribución en la naturaleza. Inicialmente, los hongos fueron incluidos dentro del Reino *Plantae* (Pontón *et al.*, 2002) por ser considerados organismos inmóviles presentando estructuras que se asientan firmemente en el sustrato sobre el que crecen y también debido a que poseen pared celular rígida. Actualmente los hongos se agrupan dentro del Reino *Fungi* (Whittaker, 1969), el cual evolutivamente se encuentra más cerca al Reino *Animalia* que al de las plantas (Shenoy *et al.*, 2007). Actualmente el Reino *Fungi* se divide en un subreino, *Dikarya*, el cual agrupa las divisiones *Ascomycota* y *Basidiomycota*, y los llamados “hongos basales” que agrupan al resto de los hongos (Guarro, 2011). Los hongos patógenos para el hombre se hallan incluidos en las divisiones *Ascomycota* y *Basidiomycota* y en el grupo de los zygomycetos (Boekhout, 2009). Sin embargo, hoy en día los niveles taxonómicos de este reino se encuentran en un estado de constante modificación, debido a la incorporación de herramientas moleculares en micología.

Los hongos son organismos eucariotas, heterótrofos, unicelulares o pluricelulares, que se caracterizan por la presencia de quitina y β glucanos en la pared celular (Kirk *et al.*, 2008). Presentan reproducción de tipo sexual y asexual (teleomorfo y anamorfo respectivamente) (Pontón *et al.*, 2002).

Los hongos juegan un papel trascendental dentro del ecosistema debido, entre otras cosas, a su participación activa en los procesos de biodegradación y a su papel clave en el ciclo del carbono y de otros minerales. Los hongos que descomponen materia orgánica se denominan saprobios. Aquellos que son capaces de establecer relaciones simbióticas con las plantas, se denominan mutualistas. Los hongos que producen infecciones en plantas y animales, incluyendo al hombre se consideran parásitos.

Los hongos influyen beneficiosamente en la vida del ser humano en muchos aspectos. Poseen un gran impacto en la industria alimentaria ya que intervienen en la producción de alimentos como pan, cerveza, queso y vino. También tienen gran importancia en la industria farmacéutica, debido a que diferentes especies de hongos producen metabolitos secundarios que poseen propiedades antibacterianas

(cefalosporinas, penicilina, entre otros) y antifúngicas (griseofulvina y caspofungina). Los metabolitos secundarios también son utilizados en la producción de fármacos inmunomoduladores y reductores del colesterol (Kirk *et al.*, 2008). Sin embargo, un pequeño porcentaje de hongos tienen la capacidad de provocar enfermedades graves en los seres humanos y otros animales. De las aproximadamente 500.000 especies descritas actualmente, sólo unas 400 se asocian a infecciones en humanos (de Hoog *et al.*, 2000). Los procesos infecciosos causados por hongos son conocidos con el nombre de micosis. La protección natural de la piel y membranas mucosas son las primeras barreras físicas contra los hongos. En términos generales, la instauración de una infección fúngica depende en parte de la capacidad del microorganismo para crecer en condiciones de pH, temperatura y potencial redox presentes en tejidos del huésped, siendo dichas condiciones, usualmente, poco favorables para el crecimiento y desarrollo de los hongos. La mayoría de hongos, incluso los que son patógenos para el hombre, tienen su reservorio natural en el medio ambiente. Muchos de ellos poseen escaso poder patógeno, aunque existen especies que han logrado adaptarse a las condiciones desfavorables impuestas por el huésped. Sin embargo, la virulencia de un microorganismo depende tanto de las características de éste, como de factores propios del huésped (Casadevall & Pirofski, 2001).

Morfológicamente, los hongos se dividen en levaduras, hongos filamentosos y hongos dimórficos. Las levaduras son hongos unicelulares, se reproducen generalmente por fisión binaria o por gemación y usualmente dan lugar a colonias lisas en cultivos sólidos. Estas colonias están constituidas por agregados de células individuales, de forma oval (Pontón *et al.*, 2002). Géneros como *Candida* spp., *Saccharomyces* spp. o *Cryptococcus* spp. son representantes de hongos levaduriformes.

Los hongos filamentosos producen colonias algodonosas en medios sólidos de cultivo. Presentan estructuras filamentosas constituidas por una sucesión de células intercomunicadas denominadas hifas, que en conjunto constituyen una estructura pluricelular denominado micelio (Guarro, 2012). Las hifas se desarrollan normalmente a partir de esporas o a partir de fragmentos de otras hifas. La mayoría de los hongos filamentosos presentan hifas tabicadas con septos que delimitan las diferentes células. Sin embargo, otros hongos filamentosos poseen hifas que carecen de septos, las cuales son denominadas hifas cenocíticas (Pontón *et al.*, 2002). Entre

los géneros de hongos filamentosos de mayor interés en clínica tenemos: *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp. y géneros pertenecientes al orden Mucorales (Pemán & Salavert, 2012).

Los hongos dimórficos pueden presentar formas levaduriformes o filamentosas dependiendo de las características del ambiente (temperatura, pH, tensión parcial de CO₂, nutrientes, entre otros). Los principales representantes de este grupo de interés médico son: *Coccidioides immitis*, *Blastomyces dermatitidis*, *Histoplasma capsulatum*, *Paracoccidioides brasiliensis* y *Sporothrix schenckii*.

1.2. Micosis causadas por hongos oportunistas.

Se denominan hongos oportunistas a un grupo heterogéneo de hongos que comprende tanto representantes levaduriformes como filamentosos, generalmente cosmopolitas, y que tradicionalmente han sido considerados como no patógenos (Pontón *et al.*, 2002). No obstante, bajo determinadas circunstancias usualmente relacionadas con alteraciones inmunitarias del huésped, pueden ocasionar enfermedad infecciosa. *Candida* spp. y *Aspergillus* spp. son patógenos clásicamente involucrados en este tipo de infecciones. En los últimos años, el espectro de las micosis que afectan a seres humanos ha sufrido cambios importantes, observándose un incremento de las infecciones causadas por los denominados hongos oportunistas emergentes (Guarro 2011). El aumento de la incidencia de las infecciones causadas por hongos oportunistas se ha producido paralelamente al avance de la medicina. Los tratamientos antineoplásicos, los avances en la cirugía de trasplantes, la inmunosupresión iatrogénica, el uso de antibióticos de amplio espectro, el uso de dispositivos intravasculares, y la estancia en unidades de cuidados intensivos, son algunos de los factores que han permitido prolongar la vida de los pacientes a cambio de provocar en muchos casos un estado de inmunosupresión que predispone al establecimiento de este tipo de infecciones (Spellberg & Edwards, 2001; Steinbach & Perfect, 2003). Sin embargo, no puede excluirse la existencia, de procesos infecciosos en individuos inmunocompetentes causados por hongos tradicionalmente considerados como oportunistas (Gomes *et al.*, 2011; Guarro, 2011). Los hongos oportunistas pueden originar un espectro de procesos infecciosos muy diversos que pueden clasificarse de acuerdo a su localización

anatomoclínica. Siguiendo este criterio, las micosis se pueden clasificar en: superficiales, subcutáneas, profundas y sistémicas.

Micosis superficiales.

Las micosis superficiales incluyen en primer lugar a aquellas que afectan la capa córnea de la piel y a la porción suprafolicular del pelo, no generando una respuesta inmunitaria detectable en el huésped. Entre los agentes etiológicos causante de este tipo de infecciones podemos destacar, *Malassezia* spp. (levadura causante de la pitiriasis versicolor), *Hortaea werneckii* (causante de la tiña negra), *Trichosporon* spp. y *Piedraia hortae* (causantes de la piedra blanca y negra, respectivamente) (Torres-Rodríguez & López-Jodra, 2000). En segundo lugar las micosis superficiales incluyen a una variedad de procesos en los que se afectan la piel y sus anejos (pelos y uñas). Son generalmente producidos por los denominados hongos dermatófitos. Estas micosis pueden afectar a capas más profundas de la piel, provocando una respuesta inmune del huésped. La transmisión clásicamente se produce por contacto con elementos fúngicos que se encuentran en el suelo, objetos o animales (Pontón *et al.*, 2002). Los géneros *Trichophyton*, *Epidermophyton* y *Microsporum* son las más frecuentemente implicados en este tipo de infecciones, sin embargo *Acremonium* spp., *Scopulariopsis* spp., y *Fusarium* spp., pueden también producir onicomycosis (de Hoog *et al.*, 2000). Diversas especies de *Candida* también se asocian habitualmente a micosis cutáneas. *Candida albicans* es frecuentemente causante de infecciones de piel y de mucosas (Raz-Pasteur *et al.*, 2011), mientras, *C. parapsilosis* puede aislarse en casos de onicomycosis (Trofa *et al.*, 2008). Las micosis cutáneas pueden evolucionar hasta producir lesiones subcutáneas.

El diagnóstico de las micosis superficiales es relativamente sencillo y la terapia específica suele proporcionar buena respuesta clínica.

Micosis subcutáneas

Afectan a las capas profundas de la dermis y al tejido celular subcutáneo, pudiendo extenderse a músculo y hueso. La infección se produce, generalmente por inoculación traumática de material contaminado (Pontón *et al.*, 2002). Tienden a ser localizadas y rara vez se diseminan vía hematogena. Los hongos causantes de micosis subcutáneas de mayor repercusión en clínica son: *Sporothrix schenckii* (hongo dimórfico causante de esporotricosis); *Cladophialophora carrionii*, *Fonsecaea* spp. (de

Hoog *et al.*, 2000), *Phialophora verrucosa* (Sharma *et al.*, 2002) y *Exophiala dermatitidis* (Clancy *et al.*, 2000) (hongos dematiáceos causantes de cromoblastomycosis) y *Alternaria alternata*, *Bipolaris spicifera*, *Curvularia geniculata*, *Exophiala jeanselmei*, y *Exophiala moniliae* (hongos dematiáceos causante de feohifomicosis).

Micosis sistémicas

En las micosis sistémicas se produce la afectación de dos o más órganos no adyacentes, o de un órgano y la sangre (Rubio *et al.*, 2001). Son las más graves y pueden resultar fatales para los individuos con alteraciones inmunitarias y/o cuando el patógeno es resistente al tratamiento antifúngico. Por su capacidad de provocar infecciones muy graves destacan *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis*, *Paracoccidioides brasiliensis* y *Coccidioides immitis*.

Todos ellos se encuentran limitados geográficamente a regiones áridas de América. Este tipo de infecciones fúngicas son generalmente adquiridas a partir de inhalación o inoculación traumática de esporas. Son más frecuentes en pacientes inmunocomprometidos, pero también se han descrito en pacientes con un sistema inmune aparentemente intacto (Guarro, 2011; Gomes *et al.*, 2011). En la etiología de las micosis sistémicas no endémicas están implicadas especies oportunistas, ubicuas y cosmopolitas, siendo la candidiasis (infecciones causadas por especies de *Candida*), la aspergilosis (infecciones causadas por especies del género *Aspergillus*) y las mucoramicosis (infecciones causadas por especies pertenecientes al orden Mucorales) las tres principales representantes de las infecciones fúngicas invasoras (Torres-Narbona *et al.*, 2007). Como ya hemos mencionado, clásicamente se reconoce a las especies *C. albicans* y *A. fumigatus* como causantes de la mayoría de las infecciones oportunistas invasoras, y, aunque actualmente estos hongos siguen siendo los más frecuentemente aislados, se ha observado un incremento de la incidencia de otras especies oportunistas emergentes menos estudiadas tales como *C. parapsilosis* y *A. terreus*. Por otra parte, *Rhizopus* es el género que causa más frecuentemente mucoramicosis en humanos (Alvarez *et al.*, 2009), y también es el género más estudiado de todos los mucorales. Sin embargo, hoy en día otros géneros como *Mucor*, *Apophysomyces* y *Saksenaea*, considerados hasta ahora como raros o poco comunes, se describen con frecuencia creciente como agentes causantes de mucoramicosis en seres humanos y animales (Gomes *et al.*, 2011;

Guarro, 2011). Al contrario de lo que ocurre con las bien documentadas especies *C. albicans* y *A. fumigatus*, aun se conoce muy poco acerca de la epidemiología, evolución y terapia de las infecciones fúngicas causadas por los hongos oportunistas emergentes mencionados, por lo cual su estudio es de gran interés.

1.3. Micosis causadas por hongos levaduriformes.

1.3.1. Candidiasis

Las especies del género *Candida* constituyen en la actualidad una de las principales causas de micosis diseminada (Pappas *et al.*, 2009). Este género perteneciente al phylum *Ascomycota* incluye un gran número de especies, siendo *C. albicans* la responsable de más de la mitad de los casos de candidiasis diseminada en pacientes inmunodeprimidos (Craver *et al.*, 2010).

Las especies del género *Candida* constituyen, en orden de frecuencia, el tercer grupo de microorganismos aislados por hemocultivo en centros hospitalarios en Estados Unidos (Spellberg *et al.*, 2006) y el primer grupo en cuanto a infecciones fúngicas en humanos a nivel mundial (Craver *et al.*, 2010).

A pesar de que *C. albicans* sigue siendo el agente causal más frecuentemente asociado a infecciones fúngicas, en las últimas décadas se ha observado un aumento en la incidencia de las infecciones causadas por otras especies de *Candida* no-*albicans*, (Miceli *et al.*, 2011), siendo *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* y *C. krusei* las más habituales (Pemán & Salavert, 2012).

Los antifúngicos recomendados para el tratamiento de la candidiasis invasora en pacientes neutropénicos son las formulaciones lipídicas de la anfotericina B, la caspofungina o el voriconazol, mientras que el fluconazol y las equinocandinas se recomiendan para el tratamiento empírico de la candidiasis invasora en pacientes no neutropénicos (Pappas *et al.*, 2009). Sin embargo, diversos estudios han puesto de manifiesto la emergencia de cepas con sensibilidad reducida a los antifúngicos convencionales, por lo que se sugiere la necesidad de desarrollar nuevas estrategias terapéuticas (van Asbeck *et al.*, 2009). En este sentido, las equinocandinas han surgido como una buena opción terapéutica y juegan un papel importante en el tratamiento de las candidiasis.

1.3.1.1. *Candida parapsilosis*

C. parapsilosis es un patógeno oportunista emergente y ampliamente distribuido en la naturaleza. Es un miembro de la microbiota comensal de la piel en seres humanos y otros mamíferos (Trofa *et al.*, 2008). El espectro de infecciones abarca desde infecciones superficiales hasta candidiasis invasora y fungemia, con altas tasas de mortalidad (Trofa *et al.*, 2008; van Asbeck *et al.*, 2009). La incidencia de estos procesos infecciosos generalmente está relacionada con el uso de catéteres y la administración de nutrición parenteral (Bedini *et al.*, 2006). *C. parapsilosis* es uno de los agentes etiológicos más comunes de candidiasis en recién nacidos de riesgo, especialmente en algunas regiones de América Latina (Guarro, 2011).

La variabilidad geográfica de la distribución de las especies causantes de candidiasis es un hecho conocido, siendo actualmente *C. parapsilosis* la segunda especie causal de candidiasis invasora en muchas regiones de Europa y América Latina y la tercera causa después de *C. glabrata* en zonas como América del Norte (Trofa *et al.*, 2008; van Asbeck *et al.*, 2009). Un estudio multicéntrico reciente ha demostrado que *C. parapsilosis* es la segunda especie más frecuentemente aislada en España después de *C. albicans* (Pemán *et al.*, 2012).

Los aislados de *C. parapsilosis* son habitualmente sensibles *in vitro* a los azoles (Trofa *et al.*, 2008). Sin embargo, *C. parapsilosis*, a diferencia de la mayoría de las otras especies de importancia clínica, presenta una menor sensibilidad *in vitro* a las equinocandinas.

1.4. Micosis causadas por hongos filamentosos.

1.4.1. Aspergilosis

Se conoce como aspergilosis a las infecciones causadas por especies pertenecientes al género *Aspergillus*. Este género incluye aproximadamente 250 especies, de las cuales una décima parte se consideran responsables de infecciones en seres humanos (Guarro, 2011). Las especies del género *Aspergillus* se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza pudiéndose aislar de una gran variedad de substratos (Abarca, 2000). Las especies de *Aspergillus* pueden causar un amplio espectro de infecciones en el ser humano, que van desde las micosis superficiales (onicomicosis, otomicosis y queratomicosis) hasta la aspergilosis invasora.

En el caso de la aspergilosis invasora la puerta de entrada es la vía respiratoria, por inhalación de conidios de *Aspergillus* spp. La enfermedad invasora es característica del huésped inmunosuprimido y se origina con la infección pulmonar y posterior diseminación por vía hematológica (Pazos, 2004; Dagenais & Keller, 2009; García-Vidal & Carratalà, 2012). La aspergilosis invasora es una infección grave y frecuentemente fatal (Chandrasekar, 2009), siendo factores de riesgo para sufrir esta infección 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). En este sentido, se ha demostrado que el 90% de las infecciones fúngicas causadas por hongos filamentosos en pacientes con neoplasias hematológicas, fueron causadas por especies del género *Aspergillus* (Pagano *et al.*, 2006). En los últimos años se ha producido un notable aumento de la incidencia de la aspergilosis invasora, la cual se asocia a altas tasas de mortalidad que comprenden valores aproximados del 38% en pacientes con leucemia mieloblástica aguda, del 50-60% en pacientes trasplantados de órganos, y del 70-85% en otros pacientes con inmunodepresión severa (Mayr, 2011).

La elevada mortalidad de la aspergilosis invasora también se asocia al difícil diagnóstico clínico, ya que los signos y síntomas son inespecíficos y de aparición tardía en el curso de la infección (del Palacio *et al.*, 2007), lo cual en muchos casos impide establecer un tratamiento precoz. Sin embargo en este sentido se han realizado importantes avances, como la utilización de la tomografía axial computarizada y la determinación de niveles de antígenos, como el galactomanano, siendo esta técnica útil en el diagnóstico y seguimiento de la infección y como marcador de eficacia de la terapia (Sionov *et al.*, 2006).

Aunque *A. fumigatus* es el agente etiológico más común, otras especies del género como *A. flavus*, *A. terreus* y *A. niger* también son responsables de un gran número de infecciones invasoras (Dagenais *et al.*, 2009).

Actualmente el tratamiento de elección para la aspergilosis invasora es el voriconazol, mientras que las formulaciones liposomales de anfotericina B, la caspofungina, la micafungina, siendo considerados tratamientos alternativos otros azoles como el posaconazol y el itraconazol (Walsh *et al.*, 2008).

1.4.1.1. *Aspergillus fumigatus*

A. fumigatus es un hongo ubicuo y cosmopolita, siendo uno de los principales hongos presentes en el aire (Latgé, 2001). La tasa de mortalidad asociada a aspergilosis invasora causadas por *A. fumigatus* varía entre un 40 y un 90%.

Comparado con otras especies, *A. fumigatus* exhibe características particulares que optimizan su capacidad para provocar infecciones en humanos. Entre estas características destaca que el tamaño de los conidios (2-3 μm) es idóneo para penetrar en los alvéolos pulmonares. Asimismo, *A. fumigatus* es más termotolerante que otras especies del género, pudiendo crecer en temperaturas que oscilan entre 37 a 50 °C, lo que le confiere la capacidad de crecimiento en condiciones medioambientales extremas. En este sentido, se ha postulado que el desarrollo de *A. fumigatus* a altas temperaturas podría inducir la expresión de genes que le otorgarían especial virulencia. Por último, otra particularidad de *A. fumigatus* que le ofrece un mayor potencial de provocar infección, es su gran capacidad de germinación a temperaturas entre 37° y 40° C, la cual es mayor que en otras especies de *Aspergillus* (García-Vidal & Carratalà, 2012).

1.4.1.2. *Aspergillus terreus*

A pesar de que *A. fumigatus* seguida de *A. flavus* son la especies más involucradas en los casos de aspergilosis invasora, en los últimos años la incidencia de micosis causadas por otras especies, tales como *A. terreus* o *A. niger* han aumentado notablemente (Alcazar-Fuoli *et al.*, 2008). *A. terreus* es un hongo oportunista emergente, saprobio común del suelo con una amplia distribución en la naturaleza (Steinbach *et al.*, 2004a). Produce una variedad de metabolitos secundarios, económicamente importantes, como la lovastatina, una droga antihipercolesterolemica. Clínicamente, causa un amplio rango de infecciones que van desde infecciones superficiales, tales como la onicomycosis hasta la aspergilosis invasora en individuos severamente inmunocomprometidos (Balajee, 2009). Varios estudios han demostrado que *A. terreus* se asocia a una mayor incidencia de infección diseminada que otras especies de *Aspergillus*, lo que se relaciona con la alta mortalidad en los pacientes afectados por este hongo (Baddley *et al.*, 2003). Además, aproximadamente el 60% de las cepas de *A. terreus* presentan una resistencia

intrínseca demostrada, tanto *in vitro* como *in vivo* a la anfotericina B (Walsh *et al.*, 2008; Mensa *et al.*, 2009).

1.4.2. Mucoramicosis

Mucoramicosis o zygomycosis son términos que se utilizan indistintamente para referirse a un grupo de infecciones causadas por hongos pertenecientes al orden Mucorales. Actualmente la división Zygomycota se considerada obsoleta, debido a que diversos estudios moleculares han demostrado la naturaleza polifilética de este grupo de hongos (White *et al.*, 2006; Hibbet *et al.*, 2007). Los antiguos miembros de la división Zygomycota se distribuyen en la nueva división (phylum) Glomeromycota, sin importancia desde el punto de vista clínico, y en las nuevas subphylum Kickxellomycotina, Zoopagomycotina, Entomophthoromycotina, y Mucoromycotina agrupándose en estas dos últimas una serie de representantes de importancia clínica, tales como algunos miembros del orden Entomophthorales y el orden Mucorales (Gené & Guarro, 2008).

Dado los cambios taxonómicos recién mencionados, en la presente tesis utilizaremos el término mucoramicosis para referirnos a este grupo de infecciones. Casi todas las especies patógenas para el hombre y los animales se incluyen en el orden Mucorales, que a su vez se divide en seis familias. De estas familias los géneros y especies de la familia Mucoraceae son los principales causantes de mucoramicosis, destacando las especies pertenecientes a los géneros *Rhizopus*, *Mucor*, y *Rhizomucor*. Sin embargo, la incidencia de las infecciones causadas por especies pertenecientes a los géneros *Apophysomyces* y *Saksenaea* ha aumentado en los últimos años (Alvarez *et al.*, 2009). Si bien las infecciones causadas por estos dos últimos géneros son menos frecuentes que las producidas por otros miembros del orden Mucorales, su incidencia real podría estar subestimada ya que requieren técnicas especiales de cultivo para poder inducir la esporulación que facilite su identificación (Guarro, 2011; Guarro *et al.*, 2011)

Aunque hace pocos años la mucoramicosis era considerada una micosis poco frecuente, actualmente se considera como la segunda infección fúngica invasora en importancia tras la aspergilosis, dentro de las micosis sistémicas causadas por hongos filamentosos (Torres- Narbona *et al.*, 2007). En los últimos años se ha descrito un aumento importante en la incidencia de esta enfermedad en centros

hospitalarios europeos y americanos con gran población de pacientes inmunodeprimidos (Spellberg *et al.*, 2005; Gené & Guarro, 2008; Salavert & Pemán, 2009; Saegeman *et al.*, 2010). Los factores de riesgo más frecuentemente asociados al desarrollo de una mucoramicosis son la neutropenia profunda y persistente, los tratamientos prolongados con corticoides, los trasplantes de progenitores hematopoyéticos o de órganos sólidos, la diabetes mellitus mal controlada y la acidosis metabólica, los tratamientos con deferoxamina, las quemaduras extensas y los traumatismos penetrantes, los trastornos oncohematológicos como leucemias y linfomas y otras enfermedades hematológicas malignas (Rodén *et al.*, 2005; Rogers, 2008). Las presentaciones clínicas de la mucoramicosis se clasifican según su localización anatómica, dividiéndose en: rinoorbitocerebral, pulmonar, cutánea, gastrointestinal y diseminada. La diseminación de la infección ha sido observada en aproximadamente el 23% de los casos (Petrikos *et al.*, 2012).

Las mucoramicosis en general, son infecciones oportunistas, progresivas y devastadoras, en las que la adhesión del hongo a las células endoteliales y el daño producido a las mismas permite los fenómenos de angioinvasión y trombosis venosa fúngica con posterior necrosis tisular y diseminación de la infección (Torres-Narbona *et al.*, 2007). La mortalidad global de los pacientes que cursan con esta infección es de aproximadamente el 40%, aunque en pacientes oncohematológicos la mortalidad puede superar el 60% y en pacientes con trasplante de hígado o corazón la tasa de mortalidad es del 100% (Salavert & Pemán, 2009). Una de las causas que ha contribuido durante muchos años al desconocimiento de la etiología y de la epidemiología de la mucoramicosis, es el hecho de que en muchos de los casos clínicos descritos en la literatura, el agente causal no ha sido identificado a nivel de especie y simplemente se ha referenciado como *Mucor* spp. o *Rhizopus* spp. sin confirmar si realmente eran miembros de estos géneros (Gené & Guarro, 2008). Esto ocurría debido a la creencia errónea de que independientemente de la especie causal de la infección el tratamiento era el mismo (Bal, 2006). Actualmente, el tratamiento de la mucoramicosis se basa en cuatro aspectos esenciales: rapidez diagnóstica, eliminación de los factores predisponentes, resección quirúrgica y tratamiento antifúngico (Rogers, 2008). La elección del antifúngico adecuado debe basarse en estudios clínicos prospectivos, en los datos de la actividad antifúngica *in*

Introducción

vitro y en su comportamiento en modelos experimentales animales. A pesar de las controversias existentes con respecto a su uso, la anfotericina B y sus formulaciones lipídicas siguen siendo los antifúngicos de primera elección para el tratamiento de la mucoramicosis, sin embargo en base al conocimiento actual, se sugiere que la correcta identificación del agente etiológico causal de mucoramicosis sería esencial para instaurar la terapia antifúngica (Khan *et al.*, 2009).

1.4.2.1. *Mucor circinelloides*

Mucor es, después de *Rhizopus*, el género con mayor relevancia clínica entre los Mucorales. *Mucor circinelloides* es la especie más frecuentemente implicada en infecciones, seguidas de *M. indicus*, *M. racemosus* y *M. ramosissimus* (Alvarez *et al.*, 2009). *Mucor circinelloides* es un hongo oportunista que puede causar infecciones graves en pacientes inmunosuprimidos. La variedad de presentaciones clínicas asociadas a este hongo son las comunes en la mucoramicosis.

1.4.2.2. *Apophysomyces* spp. y *Saksenaea* spp.

La familia *Saksenaceae* comprende a los géneros *Apophysomyces* y *Saksenaea*. *Apophysomyces* spp. fue descrito en 1979 como un género monotípico que comprendía a la especie *A. elegans* (Misra *et al.*, 1979). Sin embargo, en base a datos fisiológicos, genéticos y morfológicos Alvarez y col. (Alvarez *et al.*, 2010) han demostrado que este género comprende al menos cuatro especies bien definidas: *A. elegans*, *A. variabilis*, *A. ossiformis* y *A. trapeziformis*.

La incidencia real de las especies de *Apophysomyces* como causa de mucoramicosis aun no ha está definida, sin embargo, parece ser que *A. variabilis* es la especie más frecuentemente implicada en infecciones en seres humanos (Guarro, 2011; Guarro *et al.*, 2011). *A. trapeziformis* se ha aislado como agente causal de 13 casos de mucoramicosis en heridos a consecuencia de un tornado en Estados Unidos (Green & Karras, 2012).

Saksenaea vasiformis ha sido considerada tradicionalmente como la única especie perteneciente al género *Saksenaea*, sin embargo un reciente estudio molecular ha demostrado que este género comprende tres especies: *S. vasiformis*, *S. erythrospora* y *S. oblongispora* (Alvarez *et al.*, 2010). Comparable a lo que sucede con las especies de *Apophysomyces*, la relevancia clínica y la incidencia de estas nuevas especies es aun desconocida, debido anteriormente estas infecciones eran atribuidas a *S. vasiformis*,

no obstante, gracias al conocimiento y a las herramientas moleculares de las que se dispone en la actualidad, *S. erythrospora* se ha descrito como agente causal de infecciones en humanos (Hospenthal *et al.*, 2011).

Las mucoramicosis causadas por *Apophysomyces* spp. y *Saksenaea* spp. han adquirido protagonismo en las últimas dos décadas, no sólo por el incremento de su incidencia, sino también porque, a diferencia de otros Mucorales, estos hongos afectan principalmente a huéspedes inmunocompetentes (Ribes *et al.*, 2000; Gomes *et al.*, 2011; Guarro, 2011).

La principal manifestación clínica es la fascitis necrotizante, por inoculación traumática, aunque las formas rinoorbitocerebral y diseminada también han sido descritas (Gomes *et al.*, 2011).

1.5. Antifúngicos

El término antibiótico antifúngico o antimicótico define a los compuestos obtenidos de forma natural, biosintética o química que pueden producir modificaciones en estructuras básicas de la célula fúngica inhibiendo el desarrollo o alterando su viabilidad y produciendo las mínimas alteraciones en las células del huésped (Kerriidge & Vander-Bosshe, 1990). La similitud de los blancos de acción de algunos antifúngicos con estructuras o rutas metabólicas de las células humanas determina el escaso número de estos fármacos en comparación con los antibióticos existentes, así como la mayor posibilidad de aparición de efectos secundarios y/o tóxicos (Graybill *et al.*, 2003; Revankar & Graybill, 2003). Los antifúngicos se clasifican basándose en la estructura química, su origen (natural o de síntesis química), su espectro (amplio o restringido), y su mecanismo de acción (Carrillo-Muñoz *et al.*, 1999).

La membrana celular de los hongos tiene una estructura parecida a la membrana de las células animales, de la que se diferencia por la presencia del ergosterol en lugar del colesterol. El tratamiento de las micosis ha sufrido una evolución que va desde, el uso de antifúngicos considerados de “primera generación” derivados de productos o de la actividad metabólica de determinados microorganismos, hasta los de “segunda generación” en los que predomina la obtención por síntesis química. Los primeros compuestos con actividad antifúngica utilizados fueron el yoduro

Introducción

potásico, metaloides, derivados del azufre y las sulfonamidas; posteriormente se introdujeron los primeros antibióticos antifúngicos: griseofulvina, nistatina y anfotericina B y 5-fluorocitosina. Los antifúngicos azólicos fueron desarrollados en la década de los años 60 y no se emplearon en la práctica clínica hasta 1969, a pesar de que la primera molécula de este tipo, el benzimidazol, fue descrita en 1944. Los primeros representantes del grupo fueron el clotrimazol, el miconazol y el econazol, a los que siguieron otros como el ketoconazol, el fluconazol y el itraconazol. Posteriormente han aparecido el voriconazol, el posaconazol, el albaconazol y el ravuconazol. Los representantes de las alilaminas son la terbinafina y la naftifina. La naftifina se introdujo en la práctica clínica en 1985 y la terbinafina en 1991. Por último, también encontramos las equinocandinas cuyos representantes más importantes son la caspofungina, la micafungina y la anidulafungina.

1.5.1. Polienos

Los polienos son compuestos antibióticos sintetizados por actinomicetos del género *Streptomyces*, y fueron los primeros antifúngicos que se desarrollaron. Se conocen más de 100 compuestos distintos, de los cuales el más importante es la anfotericina B. La anfotericina B se obtuvo a partir de *Streptomyces nodosus* y fue comercializada para su uso clínico en el año 1958. A pesar de ser el compuesto de referencia para el tratamiento de muchas micosis sistémicas, su nefrotoxicidad limita su dosificación y administración (Hsieh *et al.*, 1998). La actividad antifúngica de los polienos se basa en la capacidad para unirse al ergosterol, que es el lípido principal que forma la membrana de los hongos, provocando la formación de pequeños canales que permiten la salida de pequeñas moléculas del interior de la célula fúngica y la entrada de otras sustancias. Su acción requiere sólo algunos minutos para alterar el equilibrio osmótico de la célula fúngica y provocarle la muerte. En la actualidad, se utilizan otras formulaciones que permite administrar dosis más elevadas de anfotericina B y presentan menos problemas de toxicidad. Estas nuevas formulaciones son la anfotericina B liposómica, el complejo lipídico de la anfotericina B y la anfotericina B en dispersión coloidal. Tradicionalmente la nistatina ha sido exclusivamente de uso tópico debido a sus graves efectos tóxicos, aunque en los últimos años se han desarrollado formulaciones liposomales para administración sistémica que parecen

ser más eficaces y menos tóxicas que la formulación convencional (Ng *et al.*, 2003; El-Ridy *et al.*, 2011).

1.5.2. Azoles

Los azoles constituyen una de las familias de antifúngicos más numerosa. Su estructura química se basa en anillos heteropentacíclicos con dos (imidazoles) o tres (triazoles) átomos de nitrógeno unidos por átomos de hidrógeno a otros anillos aromáticos. En la actualidad el uso de los imidazoles se limita al tratamiento de las micosis superficiales, siendo lo más utilizados el ketoconazol, el clotrimazol, el miconazol y el sertaconazol. Los triazoles son moléculas con amplio espectro de acción, siendo de menor toxicidad y más estables metabólicamente que los imidazoles. Están indicados en el tratamiento de las micosis tanto superficiales como sistémicas. Los representantes principales de este grupo son el fluconazol, el itraconazol, el voriconazol, el ravuconazol, el posaconazol y el albaconazol.

El mecanismo de acción fundamental de los azoles se basa en la inhibición de la desmetilación del lanosterol de la membrana fúngica por medio del bloqueo de la enzima C14-alfa-desmetilasa. Esta enzima forma parte del sistema enzimático del citocromo P450, y es la responsable de la transformación del lanosterol en ergosterol, el cual es el principal esteroles presente en la membrana de la célula fúngica. El sistema enzimático del citocromo P450 está presente en un gran número de seres vivos y su función es la síntesis del ergosterol, el cual es el principal esteroles presente en la membrana de la célula fúngica o del colesterol en el caso de los mamíferos. La falta de ergosterol provoca una alteración en la permeabilidad de la membrana celular, que dependiendo de la dosis de fármaco, puede producir la muerte o la inhibición del crecimiento y multiplicación celular.

El **fluconazol** se une a la lanosterol desmetilasa, un enzima del citocromo P450 que actúa en un paso inicial de la síntesis de ergosterol. El fluconazol es soluble en agua y presenta pocos problemas de toxicidad, pudiéndose administrar por vía intravenosa u oral. Su espectro de acción incluye a las levaduras de los géneros de *Candida* y *Cryptococcus* y a hongos dimórficos (Goa y Barradell, 1995). Es inactivo frente a los hongos filamentosos. Su dosis de administración en clínica es de 200-800 mg/día, vía oral o intravenosa (Ruíz-Camps & Cuenca-Estrella, 2009).

El **Itraconazol** es un antifúngico altamente lipofílico con un amplio espectro de acción. Está indicado en las distintas formas de dermatomycosis y candidiasis, destacando su efectividad sobre *Aspergillus* spp. y hongos dimórficos.

El **voriconazol** es un triazol derivado sintético del fluconazol desarrollado con el propósito de ampliar su espectro de acción. Puede atravesar la barrera hematoencefálica. Está indicado en aspergilosis invasora, candidemias en pacientes no neutropénicos, infecciones invasoras graves por *Candida* (incluyendo *C. krusei*) resistentes al fluconazol, infecciones graves por *Scedosporium* spp. y *Fusarium* spp. Aunque ha mostrado eficacia en el tratamiento de las infecciones causadas por *Candida* spp., no se usa como tratamiento de primera línea en las infecciones profundas por *Candida*, ya que no ha mostrado ventajas sobre el fluconazol (Kulberg *et al.*, 2005). Los mucorales presentan resistencia intrínseca a este fármaco. Además una serie de trabajos han evidenciado un aumento en la incidencia de mucormycosis asociadas al uso profiláctico del voriconazol (Roden *et al.*, 2005, Kontoyannis *et al.*, 2011, Kontoyannis *et al.*, 2012). Existe una presentación oral y otra parenteral, y se administra a dosis de 200-400 mg/12 h (4-6 mg/kg) (Walsh *et al.*, 2008).

El **posaconazol** estructuralmente está muy relacionado con el itraconazol. Es el último triazol comercializado hasta la fecha, siendo el azol de espectro más amplio, con actividad frente a levaduras y hongos filamentosos (Ruiz-Camps & Cuenca-Estrella, 2009). Desde la aprobación de su uso en Europa y Estados Unidos en 2005 y 2006, respectivamente, el posaconazol ha desempeñado un importante papel en clínica en la profilaxis y en el tratamiento de infecciones fúngicas invasoras. Este antifúngico ha demostrado una buena actividad frente a hongos patógenos clásicos como *Candida* y *Aspergillus* spp., así como frente a varios hongos endémicos y algunos Mucorales. Actualmente está indicado como profilaxis de infecciones fúngicas invasoras en pacientes inmunocomprometidos y en el tratamiento de candidiasis orofaríngea (Dolton *et al.*, 2012); y ha sido aprobado por la Agencia Europea de Medicamentos para el tratamiento de determinadas infecciones invasoras como aspergilosis, fusariosis, coccidiomycosis y cromoblastomycosis en pacientes que son refractarios o intolerantes a la terapia antifúngica convencional (European Medicines Agency, 2011).

Actualmente sólo se comercializa en solución oral, pero su absorción gástrica es variable, aumentando si se administra junto a ingestas ricas en grasas. Sin embargo, una formulación parenteral y otra como tabletas orales, ambas con biodisponibilidad mejorada, están en fase de desarrollo (Dolton *et al.*, 2012). En clínica se utiliza a dosis de 200 mg/8 h.

1.5.3. Análogos de precursores de ácidos nucleicos

El compuesto más representativo de este pequeño grupo de antifúngicos es la **5-fluorocitosina** o **flucitosina**. Este compuesto es una pirimidina fluorada. La penetración de este fármaco en la célula fúngica se realiza a través de una permeasa y una vez en el citoplasma es alterada enzimáticamente dando como resultado ácido 5-fluorouridílico que se incorpora al RNA interrumpiendo así la síntesis proteica. La 5-fluorocitosina puede también ser convertida en 5-fluorodeoxiuridina monofosfato, un inhibidor de la síntesis de DNA y de la división nuclear. A pesar de haber demostrado eficacia contra *Candida* spp., *Aspergillus* spp. y hongos dematiáceos causantes de cromoblastomicosis (Mauceri *et al.*, 1974), su uso se encuentra limitado a su administración en combinación con anfotericina B en el tratamiento de la meningitis por *Cryptococcus* (Perfect *et al.*, 2010).

1.5.4. Equinocandinas

Las equinocandinas son polipéptidos cíclicos que bloquean la síntesis de glucano, que es un polímero que constituye el principal componente de la pared fúngica manteniendo la morfología de la célula y protegiéndola de los cambios osmóticos. El mecanismo de acción de las equinocandinas es la inhibición de la enzima (1,3)- β -D-glucano sintasa, que es la encargada de formar los polímeros de glucanos de la pared fúngica. Esta enzima no se encuentra en las células de los mamíferos, motivo por el cual, constituye una buena diana de acción. Esta familia de antifúngicos se comenzó a desarrollar en 1974, pero fue año 2001 cuando se aprobó para uso humano la primera equinocandina, la **caspofungina**. Actualmente se dispone de tres equinocandinas con indicaciones clínicas: **caspofungina**, **micalfungina** y **anidulafungina**. La principal innovación de estos antifúngicos es su mecanismo de acción, ya que actúan sobre la pared fúngica. Debido a que actúan sobre una diana diferente al resto de antifúngicos comercializados, no existe resistencia cruzada entre

ellos. Las equinocandinas no se absorben por vía oral, por lo que sólo existe una formulación parenteral. Todas ellas presentan una buena actividad frente a *Candida* spp., *Pneumocystis carinii* y hongos dimórficos (de Wet *et al.*, 2004; Krause *et al.*, 2004). Presentan una actividad limitada frente a hongos como *Blastomyces dermatitidis*, *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis* y *Paracoccidioides brasiliensis*, y son inactivos frente a *Fusarium* spp., *Cryptococcus* spp. y Mucorales ya que estos últimos tienen menos β (1,3) D-glucano en su pared y poseen péptidos con enlaces β -1-4 y β -1-6 (Cortés y Russi, 2011). También son inactivas frente a *Fusarium* spp. y *Scedosporium* spp. (Ruíz-Camps & Cuenca-Estrella, 2009).

1.5.5. Alilaminas

La acción antifúngica de estos fármacos se debe al bloqueo de la ruta biosintética del ergosterol por inhibición de la escualeno epoxidasa, una enzima no dependiente del citocromo P-450. Su efecto fungicida es debido a la reducción del contenido del ergosterol de la membrana celular y a la acumulación de escualeno en el espacio plasmático. La terbinafina es la representante más importante de esta familia.

1.6. Determinación de la sensibilidad a los antifúngicos

Los métodos y técnicas de estudio de la sensibilidad *in vitro* de los hongos a los agentes antifúngicos son similares a las de los antibacterianos, y su diseño sigue las mismas directrices (Espinel-Ingroff & Shadomy 1989; Shadomy & Shadomy, 1991). La técnica más utilizada para el estudio de la sensibilidad *in vitro* de los hongos es la dilución en medio líquido (micrométodo). Mediante esta técnica se puede cuantificar la actividad del antifúngico, expresada como la CMI o mínima concentración de antifúngico capaz de inhibir el crecimiento del hongo. Así se puede evaluar la sensibilidad *in vitro* de un hongo a uno o más antifúngicos, correlacionar estos resultados con la actividad de los fármacos en estudios *in vivo* y predecir el pronóstico terapéutico. Es útil también para detectar el desarrollo de cepas resistentes y determinar el potencial valor terapéutico de un nuevo agente antifúngico (Espinel-Ingroff, 1994). Por desgracia el proceso requerido para la estandarización de las pruebas de estudio de los antifúngicos ha sido lento, debido al gran número de variables que pueden influir en los resultados, como son: el medio de cultivo, el pH del medio, la densidad del inóculo, la temperatura y el tiempo de

incubación (Doern *et al.*, 1986; Espinel-Ingroff & Shadomy, 1989; McGinnis *et al.*, 1991; Shadomy & Shadomy 1991; Pfaller & Rinadi, 1992; Rex *et al.*, 1993; Pujol *et al.*, 1997). Los estudios que han evaluado las correlaciones *in vitro* - *in vivo* son muy escasos, aún así, estas pruebas han jugado un papel importante en el desarrollo de los nuevos antifúngicos, y también en las evaluaciones *in vivo* que preceden a los estudios clínicos. También ha influido el hecho que las infecciones por hongos son menos frecuentes que las infecciones bacterianas, y esto implica que haya un número inferior de datos para establecer posibles correlaciones. Los métodos para determinar la sensibilidad de los hongos *in vitro* no tuvieron relevancia alguna hasta los años 70, cuando se inició el uso de los primeros azoles.

Teniendo en cuenta que el primer antifúngico se descubrió 30 años después del primer antibacteriano, y que pasaron casi 20 años antes de la introducción de la 5-fluorocitosina y de los primeros azoles, las pruebas de sensibilidad a los antifúngicos llevan unos 50 años de retraso respecto a las pruebas de sensibilidad a los antibióticos antibacterianos (Revankar & Graybill, 2003). Es por este motivo que los métodos para evaluar la sensibilidad *in vitro* a los diferentes antifúngicos no fueron estandarizados en el caso de levaduras hasta el año 1997 (NCCLS M27-A) y en el caso de hongos filamentosos hasta el año 2002 (NCCLS M38-A).

1.6.1. Métodos *in vitro*

Existen varios métodos de referencia para realizar estas pruebas con hongos. Los más difundidos son los del Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI), el cual es estadounidense (anteriormente llamado NCCLS), no obstante, otras instituciones y sociedades también han diseñado métodos de referencia, como el European Comité on Antibiotic Susceptibility Testing, EUCAST, perteneciente a la Sociedad Europea de Microbiología Clínica y Enfermedades Infecciosas (ESCMID).

En el año 1982 el NCCLS (National Committee of Clinical Laboratory Standards) actualmente CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) creó un subcomité para estandarizar las pruebas de sensibilidad a los antifúngicos, primero para las levaduras y más tarde para los hongos filamentosos, con el fin de unificar los criterios metodológicos y así establecer correlaciones entre los resultados obtenidos en el laboratorio y en clínica.

1.6.1.1. Las levaduras

La primera iniciativa del comité (1986) fue realizar una encuesta a 350 hospitales de Estados Unidos con la finalidad de conocer el estado de los estudios de sensibilidad *in vitro* de los antifúngicos en ese país (Calhoun *et al.*, 1986). El resultado fue que la mayor parte de los hospitales que realizaban este tipo de estudios, lo hacían con el método de macrodilución en medio líquido, aunque la metodología utilizada era muy diversa. En años posteriores se realizaron 4 estudios en colaboración con diferentes laboratorios. Estos estudios incluyeron la comparación de cuatro métodos de preparación del inóculo y concluyeron que el método espectrofotométrico fue el que mostró mayor correlación en los resultados, tanto intra, como entre los laboratorios participantes. Estos estudios ayudaron a perfilar cuales eran las condiciones con las cuales se obtenía una mayor uniformidad en los resultados, como así también una mayor correlación con los resultados clínicos. Posteriormente, fueron evaluados y comparados parámetros como, temperaturas de incubación y medios de cultivo. Finalmente se estableció el criterio de las CMI para cada uno de los antifúngicos que se había ensayado. Como resultado de todos estos estudios realizados en colaboración entre diferentes laboratorios, en el año 1992 se redactó una propuesta, el documento M27-P. Durante los cuatro años siguientes (1992-1996), se establecieron los rangos de CMI de los antifúngicos disponibles para las cepas control (2 cepas en ese momento). También se establecieron las condiciones que se deberían ser utilizadas para los métodos microdilución y macrodilución. Esta información fue incluida en una versión revisada y publicada en el año 1995 (M27-T). En una versión posterior el subcomité centró su atención en desarrollar puntos de corte significativos para los diferentes antifúngicos, (Rex *et al.*, 1997), los cuales fueron incluidos en el documento M27-A (1997) (NCCLS M27-A). A partir de aquel momento el subcomité estableció rangos de referencia para las CMI leídas a las 24 y 48 horas para todos los antifúngicos, tanto los tradicionales, como los nuevos (Barry *et al.*, 2000). Los resultados de este estudio se recogieron en el documento M-27A-2. Posteriormente, en el año 2008, se publicó un nuevo documento, el M27-A3, actual, en el que se incluyeron valores de la CMI de los nuevos triazoles para las cepas control de calidad.

En un intento de simplificar y agilizar la realización de las pruebas de sensibilidad a los antifúngicos en los laboratorios clínicos, en 2003 el comité estandarizó el método de difusión en disco, (documento M44-P) que fue aprobado definitivamente en 2004 (documento M44-A). Actualmente disponemos del documento M44-A2, aprobado el año 2008, que incluye criterios para caspofungina, fluconazol, posaconazol y voriconazol.

1.6.1.2. Los hongos filamentosos

Tomando como partida las condiciones básicas acordadas en el documento M27-A, el subcomité del CLSI formó un nuevo grupo para recoger datos y poner a punto la metodología para poder realizar estudios de sensibilidad *in vitro* con hongos filamentosos. Espinel-Ingroff y Kerkerling en un estudio publicado el año 1991 evaluaron el método espectrofotométrico para la preparación de las suspensiones de conidios que constituían el inóculo (Espinel-Ingroff y Kerkerling, 1991). Se ensayaron 25 cepas de hongos filamentosos incluyendo *Aspergillus* spp., *Rhizopus* spp., *Mucor* spp., *Pseudallescheria boydii* y *Sporothrix shenckii*. Se establecieron los rangos de transmitancia a los cuales se debían ajustar las suspensiones de conidios de cada género. Los procedimientos utilizados para preparar el inóculo fueron los anteriormente aprobados para las levaduras. Se evaluaron también diferentes medios, pero fue el RPMI el que permitió identificar la posible resistencia de cepas de *Aspergillus* al itraconazol (Denning *et al.*, 1997). Posteriormente el subcomité del CLSI propuso un estudio multicéntrico para evaluar, por un lado, la metodología para preparar las suspensiones de conidios recomendados por Espinel-Ingroff y Kerkerling (1991), y por otro lado, para comparar los métodos de macro y microdilución en la determinación de la actividad *in vitro* de los antifúngicos frente a los hongos filamentosos (Espinel-Ingroff *et al.*, 1995). Participaron seis laboratorios, y se utilizaron 25 cepas pertenecientes a las especies *Aspergillus flavus* y *A. fumigatus*, *Rhizopus oryzae*, *Pseudallescheria boydii* y *Sporothrix shenckii*. La concentración de los inóculos se ajustó con espectrofotómetro a un valor de transmitancia diferente para cada especie estudiada, y que en general oscilaba entre 68 y el 82%. Se utilizó el medio RPMI 1640, la temperatura de incubación fue de 30°C y la concentración del inóculo utilizado en ambos métodos fue de aproximadamente 10⁴ ufc/ml, en lugar de 10³ ufc/ml que es el valor indicado para las levaduras. Los valores de la CMI para

la anfotericina B, el fluconazol, el itraconazol, el miconazol, y el ketoconazol, en ambos métodos, fueron determinados a las 24 horas de incubación, en el caso de *Aspergillus* spp. y *Rhizopus oryzae* y de 72 horas para los demás. La reproducibilidad (± 2 diluciones) de los resultados que se obtuvieron para los métodos de macro y microdilución fue alta tanto intra como entre los laboratorios participantes y para todos los antifúngicos ensayados, con excepción del itraconazol.

En ensayos posteriores se estudió el efecto del inóculo, para saber si habría alguna discordancia entre laboratorios utilizando un inóculo final de concentración elevada (10^4 ufc/ml) o de menor concentración (10^3 ufc/ml).

Como resultado de los dos estudios realizados en colaboración con diversos laboratorios se llegó a acuerdos en cuanto a las condiciones de preparación del inóculos, el tiempo y la temperatura de incubación, la formulación del medio, y los criterios para la lectura de las CMI. Un estudio adicional demostró un cierto grado de correlación entre los resultados de las pruebas *in vitro* y la respuesta a los tratamientos en estudios animales (Espinel-Ingroff *et al.*, 1997; Odds *et al.*, 1998). Con esta información se redactó el documento M38-P, una propuesta del método de referencia que, con ligeras variaciones, dio lugar al documento definitivo M38-A en el año 1998.

El método descrito en el documento M38-A hace referencia a un número limitado de géneros de hongos filamentosos (*Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., *Rhizopus* spp., *Pseudallescheria boydii* y la forma filamentosa del hongo dimórfico *Sporothrix shenckii*), no incluía a los hongos dermatofitos, *Chaetomium* spp., *Paecilomyces* spp., ni a *Scedosporium* spp., entre otros. Posteriormente a la publicación del documento aprobado, se han realizado más estudios colaborativos para encontrar las condiciones más idóneas para determinar la sensibilidad de hongos poco comunes a los antifúngicos clásicos y también a los de reciente introducción (Espinel-Ingroff *et al.*, 2001; Espinel-Ingroff *et al.*, 2002). Actualmente, contamos con el documento M38-A2 (CLSI M38-A2), aprobado en 2008, que contiene material suplementario al documento previamente aprobado el año 2002. En este nuevo documento se han incorporado cepas de control de calidad para asegurar la validez de los resultados y las guías para evaluar la actividad de las equinocandinas, ya que anteriormente no

habían sido descritas. Además también se incluyen métodos para ensayar la actividad de los antifúngicos contra dermatofitos.

Igual que como sucede con los hongos levaduriformes y en un intento por facilitar la realización de las pruebas de sensibilidad a los antifúngicos para hongos filamentosos especialmente en los laboratorios clínicos, los cuales deben realizar estudio de sensibilidad de forma rutinaria, el año 2010 el comité publicó el documento M51-P (CLSI M51-P) que describe la técnica de difusión en agar. Actualmente contamos con el documento M51-A, aprobado también el año 2010.

1.6.2. Modelos *in vivo*. Modelos experimentales

Las pruebas realizadas con animales de experimentación son cruciales para el desarrollo de nuevos fármacos. En las primeras fases de desarrollo de un fármaco (fase preclínica), los estudios *in vitro* son útiles para determinar su eficacia en la inhibición del crecimiento de un microorganismo. Estos estudios determinarán el potencial valor terapéutico del antifúngico. Posteriormente los ensayos en cultivos celulares permitirán evaluar el potencial carcinogénico, así como otros efectos tóxicos. Antes de llevar a cabo los estudios clínicos, es indispensable realizar estudios preclínicos con modelos animales.

Para demostrar la eficacia terapéutica del antifúngico, previamente es necesario desarrollar un modelo animal que emule el proceso de la enfermedad infecciosa observada en clínica humana. La eficacia de la terapia 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. Los modelos animales también sirven para empezar a establecer las propiedades farmacocinéticas del compuesto. El animal más utilizado en el ensayo de nuevos compuestos antifúngicos es el ratón, debido a la facilidad de manejo, adquisición y mantenimiento, y a la similitud en muchos casos, de la evolución de la infección con las observaciones realizadas en humanos (Graybill, 2000).

La rata, el conejo o el cobaya, son los animales de elección en las ocasiones en las que el ratón no se puede utilizar para la experimentación, dada la farmacocinética

del antifúngico, o bien, cuando es necesario contrastar los resultados con los obtenidos en otros animales de experimentación.

Medir la eficacia *in vivo* es el objetivo más importante, y el primero que se debe investigar una vez los antifúngicos han superado las pruebas *in vitro*. La demostración de la eficacia depende mucho de las condiciones experimentales, y está influenciada por la absorción, la distribución, y la eliminación del antifúngico, la concentración y vía de administración del inóculo, el estado inmunológico del huésped y la duración del tratamiento.

1.6.3. Correlación entre los métodos *in vitro* e *in vivo*

Los estudios realizados hasta la fecha no siempre muestran una relación entre los resultados obtenidos *in vitro* y la respuesta terapéutica *in vivo*. Se acepta sin embargo, que el hecho de que una cepa sea sensible *in vitro* no es suficiente para prever el éxito terapéutico, y que un valor elevado de la concentración mínima inhibitoria de un determinado antifúngico puede predecir con mayor exactitud un posible fallo terapéutico. La falta de un establecimiento en los 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, dificulta el poder predecir con éxito el resultado en clínica a partir de estudios experimentales *in vitro*. La aparición en los últimos años de aislados fúngicos con resistencia a los antifúngicos convencionales y la descripción de fracasos terapéuticos relacionados con valores elevados de las CMIs, han suscitado la necesidad del estudio de procedimientos estandarizados para poder detectar de forma temprana el perfil de sensibilidad de las especies (Cuenca-Estrella & Rodríguez-Tudela, 2010). Por estas razones y con el objetivo de dar un enfoque práctico a las pruebas de sensibilidad *in vitro*, en los últimos años, tanto el EUCAST como el CLSI, han estudiado y aprobado recientemente una metodología de análisis para detectar la resistencia de un hongo a un antifúngico en particular. Para llevar a cabo esta metodología, han recopilado los valores de las CMIs de los fármacos para un determinada especie fúngica. Una vez recopilados estos datos clínicos, se realizaron análisis estadísticos, para poder observar como se distribuían las CMIs de la población de aislados de cada una de las especies, para definir posteriormente que cepas pertenecían a la población salvaje (wild type) (Cantón *et al.*, 2007), es decir, aquellos aislados que no

albergan ningún mecanismo de resistencia adquirida a un determinado antifúngico (Rodríguez-Tudela *et al.*; 2008). Los resultados se relacionaron con los parámetros farmacocinéticos y farmacodinámicos de los antifúngicos. Estos datos han permitido establecer los puntos de corte epidemiológicos (PCE), definidos como el valor *in vitro* obtenido a partir del análisis de la distribución de las CMI para un antifúngico en particular frente a una determinada especie fúngica, la moda de esta distribución y la variabilidad y reproducibilidad inherente de las CMI. (Rodríguez-Tudela *et al.*, 2008; Pfaller *et al.*, 2009; Espinel-Ingroff *et al.*, 2010). De esta manera se pretende detectar los organismos que albergan mecanismos de resistencia hacia un antifúngico en particular. Teóricamente aquellos aislados fúngicos exhiban una CMI > PCE poseerían mecanismos de resistencia adquirida a un antifúngico en particular (Pfaller *et al.*, 2009). Los puntos de corte epidemiológicos podrían ser de gran ayuda en la identificación de aislados con sensibilidad *in vitro* disminuida, y servir como marcadores de los cambios en los patrones de sensibilidad de los organismos.

2. INTERÉS Y OBJETIVOS DEL ESTUDIO

2. Interés y objetivos del estudio

En las últimas décadas se ha producido un importante incremento de la incidencia de las micosis invasoras producidas por hongos oportunistas que, a pesar del tratamiento quirúrgico agresivo y de la terapia antifúngica, continúan causando una alta morbilidad y mortalidad, especialmente en pacientes inmunodeficientes. Aunque gran parte de estas infecciones están causadas por las especies *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus* y *Rhizopus oryzae*, se ha observado un aumento importante en la incidencia de otras especies pertenecientes a los géneros *Candida* y *Aspergillus* y al orden *Mucorales*. Las terapias usadas actualmente para el tratamiento de estas infecciones fúngicas están lejos de ser las óptimas, siendo necesario por tanto el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas para su tratamiento. Por ello, **el objetivo principal de esta tesis ha sido contribuir al desarrollo experimental de nuevos tratamientos o a la mejora de las terapias ya existentes frente a infecciones invasoras causadas por hongos oportunistas.**

La aparición en los últimos años de nuevos antifúngicos y el desarrollo de nuevas opciones y estrategias terapéuticas permiten ensayar nuevos tratamientos más seguros y eficaces para las infecciones fúngicas. Dentro de este contexto, en la presente tesis se ha ensayado la actividad *in vitro* e *in vivo* de algunos de estos nuevos antifúngicos tales como el voriconazol, posaconazol o la anidulafungina, frente a especies emergentes y clásicas de *Aspergillus*, *Candida* no *albicans*, y de *Mucorales*.

Las especies del género *Candida* constituyen la principal causa de infecciones nosocomiales oportunistas causadas por hongos, presentando una elevada mortalidad. A pesar de que *Candida albicans* sigue siendo la especie más frecuentemente implicada en este tipo de infecciones, la incidencia de *C. parapsilosis* ha aumentado hasta situarse como la segunda o tercera especie causante de candidiasis invasora. En la actualidad, las formulaciones lipídicas de la anfotericina B, la caspofungina y el voriconazol son los fármacos recomendados para el tratamiento empírico de la candidiasis invasora en pacientes neutropénicos, siendo el fluconazol y el itraconazol considerados como alternativas terapéuticas. El fluconazol y las equinocandinas se recomiendan para el tratamiento empírico de la candidiasis invasora en pacientes no neutropénicos. Sin embargo, diversos estudios han puesto de manifiesto la emergencia de cepas de *Candida* con sensibilidad

Interés y objetivos

reducida a los antifúngicos convencionales por lo que se sugiere la necesidad de desarrollar nuevas estrategias terapéuticas (Trofa *et al*, 2009; van Asbeck *et al*, 2009). Por otra parte, estudios recientes sugieren que el uso de azoles en el tratamiento profiláctico de las infecciones por *Candida* spp. podría contribuir a un aumento de la resistencia de *C. parapsilosis* a estos fármacos. A diferencia de la mayoría de las otras especies de importancia clínica, *C. parapsilosis*, presenta una menor sensibilidad *in vitro* a las equinocandinas, razón por la cual en la actualidad este grupo de antifúngicos no se recomienda en el tratamiento de fungemias causadas por esta especie. Dado que los datos clínicos son limitados, **uno de los objetivos de la presente tesis ha sido determinar la eficacia de la anidulafungina y la caspofungina en modelos experimentales de infección diseminada por *C. parapsilosis* y analizar si existe relación con su actividad *in vitro*.** Concretamente:

- Utilizar los métodos de microdilución, disco difusión y la determinación de la concentración mínima fungicida para evaluar y comparar la actividad de la sensibilidad *in vitro* de *C. parapsilosis* a la anidulafungina y a la caspofungina.
- Evaluar de la eficacia del tratamiento con anidulafungina en un modelo de infección diseminada por *C. parapsilosis* en el ratón neutropénico.
- Evaluar la eficacia del tratamiento con caspofungina en un modelo de infección diseminada por *C. parapsilosis* en el ratón neutropénico.
- Evaluar el valor pronóstico de la actividad *in vitro* de la anidulafungina y la caspofungina frente a *C. parapsilosis*, comparando las CMI obtenidas con 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 los antifúngicos mencionados.

Actualmente el tratamiento empírico de las aspergilosis invasoras se basa en el uso del voriconazol. Sin embargo, a pesar de su uso, las tasas de mortalidad siguen

siendo altas. A su vez, en las últimas décadas se ha observado la emergencia de infecciones causadas por especies de *Aspergillus* no-*fumigatus*, como *A. terreus*, el cual presenta una resistencia intrínseca a antifúngicos convencionales como la anfotericina B. También se ha observado una mayor incidencia de aspergilosis causadas por cepas de *A. fumigatus* y *A. terreus*, resistentes al voriconazol. **Todo esto justifica el estudio de nuevas opciones terapéuticas frente a dichos patógenos, así como la evaluación de si la sensibilidad *in vitro* al voriconazol de dichos hongos tiene un valor predictivo de los resultados *in vivo*.** Los objetivos concretos de estos estudios han sido:

- Determinar la actividad *in vitro* del voriconazol y del posaconazol frente a *Aspergillus fumigatus* y *Aspergillus terreus* utilizando y comparando los métodos de microdilución, disco difusión y, en determinadas ocasiones, la determinación de la concentración mínima fungicida.
- Desarrollar un modelo experimental de infección diseminada para cada una de las citadas especies en el ratón inmunocomprometido que permita evaluar la eficacia del voriconazol y del posaconazol.
- Evaluar el valor pronóstico de la actividad *in vitro* del voriconazol, comparando los valores de CMIs con el grado de la eficacia *in vivo* de dicho antifúngico en el tratamiento de infecciones diseminadas en el ratón neutropénico causadas por cepas de *A. fumigatus* y *A. terreus* con diferentes grados de sensibilidad al voriconazol. Analizar el valor indicativo de eficacia de los correspondientes puntos de corte epidemiológicos para el voriconazol frente *A. fumigatus* y *A. terreus*.

Las mucoromicosis son consideradas en la actualidad como las infecciones causadas por hongos filamentosos más frecuentes después de la aspergilosis. Este tipo de infecciones se caracterizan por su gravedad y difícil tratamiento. Los factores subyacentes más frecuentemente involucrados en el establecimiento de este tipo de infecciones son la neutropenia profunda, la diabetes mellitus mal controlada, las neoplasias hematológicas malignas y los trasplantes de progenitores

Interés y objetivos

hematopoyéticos o de órganos sólidos y a la terapia inmunosupresora asociada al tratamiento de estas patologías, entre otros. Sin embargo, últimamente la frecuencia de estas micosis ha aumentado en pacientes inmunocompetentes. Aunque *Rhizopus oryzae* es el principal agente causal de mucoramicosis invasora, la incidencia de otras especies como *Mucor circinelloides*, *Apophysomyces variabilis* y *Saksenaea vasiformis* ha aumentado en los últimos años. Sin embargo, la incidencia real de las infecciones causadas por especies de *Apophysomyces* y *Saksenaea* podría estar subestimada, debido que para su identificación se requieren técnicas de cultivo especiales para poder inducir su esporulación. El éxito del tratamiento de las mucoramicosis depende de la rapidez en el diagnóstico, de la eliminación, si es posible, de los factores de riesgo, de la resección quirúrgica de las lesiones y un tratamiento antifúngico agresivo. Tradicionalmente la anfotericina B y recientemente sus formulaciones lipídicas han sido considerados los antifúngicos de elección para el tratamiento de la mucoramicosis. En general, los Mucorales poseen resistencia intrínseca a los azoles, con la excepción del posaconazol, el cual ha mostrado una buena actividad *in vitro* frente a la mayoría de estos hongos. La toxicidad de la anfotericina B y el hecho de que la mortalidad asociada a la mucoramicosis continúe siendo elevada, hace indispensable el estudio de nuevas terapias. Por todo ello, **un objetivo de la presente tesis ha sido evaluar experimentalmente la eficacia de nuevos tratamientos antifúngicos frente a *Mucor circinelloides*, *Apophysomyces variabilis* y *Saksenaea vasiformis***. Los aspectos concretos que con este objetivo se pretenden alcanzar son:

- Utilizar los métodos de microdilución, disco difusión y la determinación de la concentración mínima fungicida para evaluar y comparar la actividad de la sensibilidad *in vitro* de *Mucor circinelloides*, *Apophysomyces variabilis* y *Saksenaea vasiformis*, a la anfotericina B y al posaconazol.
- Evaluar la eficacia de la anfotericina B y del posaconazol en el tratamiento de la infección diseminada por *M. circinelloides* en el ratón neutropénico.

- Evaluar la eficacia de la anfotericina B y del posaconazol en el tratamiento de la infección diseminada causada por *A. variabilis* en el ratón inmunocompetente.
- Evaluar la eficacia de la anfotericina B liposomal y del posaconazol en el tratamiento de la infección diseminada causada por *S. vasiformis* en el ratón inmunocompetente.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Estudios *in vitro*

3.1.1. Cepas

Para realizar las pruebas de sensibilidad *in vitro* a los antifúngicos, se ensayaron un total de 156 cepas correspondientes a 6 especies de hongos oportunistas de interés clínico (Tabla1).

Tabla 1. Listado de cepas de hongos ensayadas en los diferentes estudios *in vitro* y su procedencia

Especie	Procedencia	Nº de cepas
<i>Aspergillus terreus</i>	FMR	21
	UTHSC	6
<i>Aspergillus fumigatus</i>	FMR	56
	UTHSC	5
<i>Candida parapsilosis</i>	FMR	31
	UTHSC	5
<i>Mucor circinelloides</i>	UTHSC	17
<i>Apophysomyces variabilis</i>	IMI	2
	UTHSC	2
	CBS	1
	GMCH	2
<i>Saksenaea vasiformis</i>	FMR	2
	UTHSC	3
	CNRMA	1
	NRRL	1
	ATCC	1

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

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

IMI, International Mycological Institute, CABI-Bioscience, Egham, Reino Unido

CBS, Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, Holanda

GMCH, Government Medical College Hospital, Chandigarh, India

CNRMA, Centre National de Référence Mycologie et Antifongiques, Paris, Francia

NRRL, ARS Culture Collection (también nombrado como NRRL), Peoria, IL, EUA

ATCC, American Type Culture Collection, Manassas, VA, EUA

Materiales y métodos

3.1.2. Conservación de las cepas

Las cepas se conservaron a temperatura ambiente en tubos de agar inclinado, en tubos de agar inclinado cubierto de vaselina o como suspensiones de conidios o esporas en agua destilada estéril y también fueron liofilizados.

Para la obtención del inóculo, las cepas se subcultivaron en placas de PDA (agar patata y dextrosa) en el caso de *Aspergillus fumigatus*, *A. terreus* y *M. circinelloides*; SDA (agar Sabouraud dextrosa) en el caso de *Candida parapsilosis*; y en CZA (agar Czapek) en el caso de *Apophysomyces variabilis* y de *Saksenaea vasiformis*. *A. fumigatus* y *A. terreus* se incubaron a 35° C durante 7 días y *Candida parapsilosis* a la misma temperatura durante 48 h. En el caso de *M. circinelloides*, *A. variabilis* y *S. vasiformis* las cepas se incubaron a 25°, 35° y 40° respectivamente durante 72 h o 7 días dependiendo de la especie.

3.1.3. Agentes antifúngicos

Los antifúngicos ensayados en las pruebas *in vitro* fueron:

Antifúngicos	Procedencia	Pureza	Disolvente
Anfotericina B	Sigma Chemical Co. St. Louis, EUA	80% ^b	DMSO
Anidulafungina	Pfizer Inc., Madrid, España	82.4% ^c	DMSO
Caspofungina	Merk & Co., Inc., Rahway, EUA	100% ^b	Agua
Voriconazol	Pfizer Inc., Madrid, España	100% ^a	DMSO
Posaconazol	Schering-Plough Res., Inst., NJ, EUA	98% ^a	DMSO

DMSO, Dimetil sulfóxido

^a Conservación a temperatura ambiente

^b Conservación a 4°C

^c Conservación a -20°C

3.1.4. Metodología

El método empleado para el estudio *in vitro* de la sensibilidad antifúngica ha sido descrito en los protocolos recomendados por el CLSI, en sus documentos M38-A2 (hongos filamentosos) y M27-A3 (levaduras) ambos publicados en el año 2008.

3.1.4.1. Preparación de las microplacas de antifúngicos

Los antifúngicos ensayados con sus respectivos disolventes se describen en la Tabla 2. El método utilizado se basa en el uso de la técnica de microdilución que se detalla a continuación.

Preparación de la solución madre del antifúngico

Se pesó la cantidad suficiente de antifúngico en polvo para obtener una concentración 100 veces superior a la concentración más alta de antifúngico a ensayar, y se disolvió en dimetil sulfóxido (DMSO) o en H₂O destilada estéril en función del compuesto.

Preparación del gradiente de concentraciones

A partir de la solución madre (1600 µg/ml en el ejemplo de la Figura 2) se preparó un banco de diluciones dobles progresivas siguiendo el esquema de la Figura 2. Posteriormente se diluyó el contenido de cada tubo en medio RPMI en la proporción 1:50 y se dispensaron 100 µl de cada dilución en cada uno de los pocillos de una columna empezando por la columna 1 en orden de mayor a menor concentración. Las dos últimas columnas se rellenaron con RPMI + 2% de DMSO. Estas dos columnas se utilizaran como control negativo (control de esterilidad del medio) y como control positivo (control de crecimiento del hongo).

Materiales y métodos

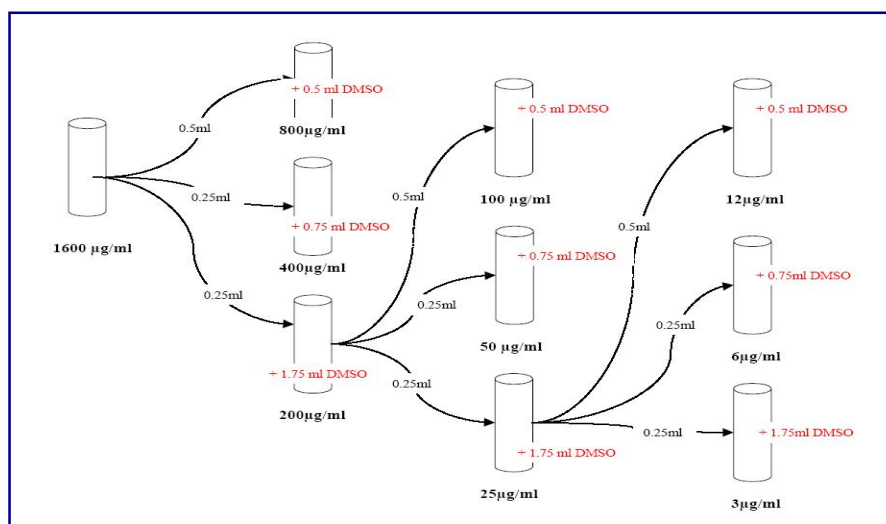


Figura 1. Esquema del banco de diluciones utilizado para realizar los ensayos *in vitro*.

Las concentraciones de antifúngico ensayadas fueron: de 0.03 a 16 µg/ml en el caso de la anfotericina B, el voriconazol, el posaconazol y la caspofungina (Figura 2). En el caso de la anidulafungina el rango de concentraciones fue de 0.06 a 32 µg/ml.

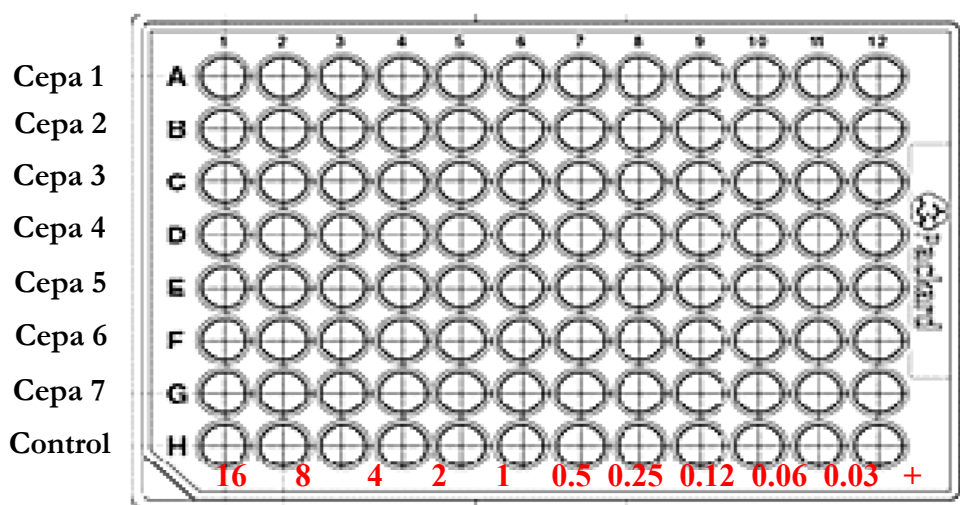


Figura 2. Esquema ejemplo de la distribución de las diferentes concentraciones estudiadas para el rango de 16 a 0.03 µg/ml y de las cepas a estudiar en la microplaca.

Una vez preparadas, las microplacas se cubrieron con una lámina adhesiva para evitar la evaporación del líquido y se guardaron en el congelador a -20° C un máximo de seis meses. El día del ensayo, las microplacas se descongelaron a temperatura ambiente y se dispensaron 100 µl de inóculo en cada pocillo, con

excepción del correspondiente al control de esterilidad del medio. Siguiendo las directrices de los documentos CLSI M38-A2 y M27-A3 las microplacas se incubaron a 35° C durante 24-72 horas dependiendo del género estudiado.

3.1.4.2. Preparación de los inóculos para los estudios *in vitro*

Los aislados a estudiar se sembraron en placas de PDA, SDA o CZA y se incubaron entre 25 y 35°C durante 2-7, según la especie estudiada. En el caso de las levaduras, los inóculos fueron preparados suspendiendo dos o tres colonias a partir del cultivo en placas de Sabouraud en 10 ml de solución salina fisiológica estéril. La suspensión fue ajustada con la cámara de Neubauer a 1×10^6 - 5×10^6 levaduras/ml (tubo 1). La concentración y la viabilidad del inóculo se verificaron sembrando 10 μ l de las diluciones 1:1000 y 1:10000 del mismo en placas de Sabouraud. En cada pocillo de las microplacas conteniendo los antifúngicos se dispensaron 100 μ l de una dilución 1/1000 del inóculo en RPMI.

En el caso de hongos filamentosos, 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 crecimiento. La masa obtenida, que contenía hifas, conidios o esporas 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 o esporas. La suspensión se ajustó por recuento en la cámara de Neubauer a 0.4×10^4 - 5×10^4 UFC/ml, según indica el CLSI en el documento M38-A2. La concentración y la viabilidad del inóculo se verificaron sembrando 100 μ l de las diluciones 1:1000 y 1:10000 del mismo en placas de PDA o CZA. Posteriormente se realizó una dilución 1:50 en medio RPMI. Luego se inocularon las microplacas con 100 μ l de su correspondiente dilución.

Siguiendo las recomendaciones de los documentos M-27-A3 y M38-A2, en cada ensayo se incluyó la cepa control *Candida parapsilosis* ATCC 22019, *Paecilomyces variotii* ATCC 36257 o *Aspergillus fumigatus* ATCC MYA-3626.

Materiales y métodos

3.1.4.3. Estudios de disco difusión

Con la finalidad de simplificar y agilizar la realización de las pruebas de sensibilidad a los antifúngicos en los laboratorios clínicos, el subcomité del CLSI aprobó en el año 2004 el documento M44-A que describe y estandariza el método de disco difusión para hongos levaduriformes. Actualmente disponemos del documento M44-A2, aprobado el año 2008, que incluye criterios para caspofungina, fluconazol, posaconazol y voriconazol. Igualmente el año 2010 el comité publicó el documento M51-P que describe la técnica de difusión en agar para hongos filamentosos. Actualmente contamos con el documento M51-A, aprobado también el año 2010.

Para los estudios de disco difusión, se preparó una solución madre de una concentración determinada de cada antifúngico a partir de la cual se dispensaron 20 μl en discos de papel estériles de 6 mm de diámetro. Siguiendo las indicaciones descritas en los documentos antes mencionados, la carga final de antifúngico en los discos fue de 1 μg para el voriconazol, 5 μg para el posaconazol, caspofungina, anidulafungina y 10 μg para la anfotericina B. Se prepararon los inóculos de las cepas a estudiar a concentraciones entre 4×10^5 UFC/ml y 4×10^6 UFC/ml. A partir de estas suspensiones se inocularon las placas de agar Mueller-Hinton no suplementado en el caso de hongos filamentosos y suplementado con 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de azul de metileno para el estudio de levaduras, por el método de siembra por agotamiento, utilizando un hisopo estéril, tras lo cual la placa se dejó entreabierto durante tres a cinco minutos, para evitar el exceso de humedad. Posteriormente se depositaron los discos impregnados de antifúngico sobre la superficie de la agar y se incubaron las placas a 30° C durante 24-48 horas. Transcurrido este tiempo de efectuó la medición de los diámetros de las zonas de inhibición de crecimiento. En la actualidad no se han establecido puntos de corte para hongos filamentosos utilizando este método; sin embargo, los documentos M51-S1 y M51-A, teniendo en cuenta los puntos de corte epidemiológicos propuestos recientemente para diferentes antifúngicos frente a varios hongos filamentosos de importancia clínica, sugieren los siguientes criterios de interpretación: sensible ≥ 17 mm para el posaconazol, el voriconazol y caspofungina, y ≥ 15 mm para la anfotericina B.

En cuanto al método de disco difusión para levaduras, actualmente ha sido validado sólo para *Candida* spp. frente a varios azoles y a la caspofungina. Los puntos de corte sugeridos por el CLSI (M44-S2) para voriconazol y el posaconazol: sensible ≥ 17 mm; sensibilidad intermedia 14-16 mm; resistente ≤ 13 mm; caspofungina: resistente ≤ 11 mm.

3.1.4.4. Definiciones

CMI (concentración mínima inhibitoria)

Para la anfotericina B, voriconazol y el posaconazol, la CMI se definió como la menor concentración de antifúngico que provocaba un 100% de inhibición del crecimiento fúngico comparado con control después de 24 o 48 horas de incubación, dependiendo del género de hongo filamentoso estudiado. En el caso de las equinocandinas frente a *Candida parapsilosis*, la CMI se definió como la menor concentración que provocaba un 50% de inhibición del crecimiento fúngico comparado con el control, después de 24 o 48 horas de incubación.

CME (concentración mínima efectiva)

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. Este punto de corte se determina en los ensayos realizados con equinocandinas y hongos filamentosos.

PCE (punto de corte epidemiológico)

El punto de corte epidemiológico para cada antifúngico es obtenido después de considerar la distribución de las CMIs de las cepas de tipo salvaje, la moda de dicha distribución y la variabilidad inherente de la prueba estadística. En general el PCE debe incluir al menos al 95% de los aislados de la distribución de las cepas tipo salvaje. Teóricamente, los organismos que han adquirido mecanismos de resistencia son aquellos en los cuales la CMI/CME $>$ PCE. En el caso del método de disco difusión, aquellos organismos que han adquirido resistencia serán los que tengan una zona de inhibición $<$ PCE.

Materiales y métodos

3.2. Estudios *in vivo*

3.2.1. Cepas

Las cepas utilizadas en los estudios *in vivo* se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Relación de las cepas utilizadas en estudios *in vivo*

<i>Aspergillus terreus</i>	
FMR 8752	Espuito, Reus, España
FMR 8806	Líquido céfalo-raquídeo, Reus, España
FMR 8754	Espuito, Reus, España
FMR 8759	Espuito, Reus, España
FMR 8753	Espuito, Reus, España
FMR 10937	Broncoaspirado, Barcelona, España
UTHSC 10-299	Clínica, Texas, EUA
UTHSC 11-320	Clínica, Texas, EUA
UTHSC 10-3389	Clínica, Texas, EUA
UTHSC 11-53	Clínica, Texas, EUA
UTHSC 07-3300	Clínica, Texas, EUA
UTHSC 08-3714	Clínica, Texas, EUA
<i>Aspergillus fumigatus</i>	
FMR 10220	Clínica, Barcelona, España
FMR 10536	Clínica, Barcelona, España
FMR 10513	Clínica, Barcelona, España
FMR 10528	Clínica, Barcelona, España
FMR 10505	Clínica, Barcelona, España
FMR 7738	Clínica, Reus, España
FMR 10512	Ambiental, Nigeria
UTHSC 10-3338	Clínica, Texas, EUA
UTHSC 10-246	Clínica, Texas, EUA
UTHSC 10-448	Clínica, Texas, EUA
<i>Candida parapsilosis</i>	
FMR 11574	Clínica, Barcelona, España
FMR 10296	Clínica, Barcelona, España

FMR 10292	Clínica, Bilbao, España
FMR 9544	Orina, Reus, España
FMR 11562	Clínica, Barcelona, España
FMR 10293	Clínica, Barcelona, España
FMR 11573	Clínica, Bilbao, España
FMR 10301	Clínica, Barcelona, España
FMR 11563	Clínica, Barcelona, España
UTHSC 03-3108	Clínica, Texas, EUA
<i>Mucor circinelloides</i>	
UTHSC 06-3784	Clínica, Texas, EUA
UTHSC R-3316	Clínica, Texas, EUA
UTHSC 01-11	Clínica, Texas, EUA
UTHSC 06-1370	Biopsia nasal. EUA
UTHSC 04-534	Clínica, Texas, EUA
UTHSC 05-1085	Biopsia de piel. EUA
<i>Apophysomyces variabilis</i>	
IMI 338332	Líquido sinovial, articulación talocrural, Australia
CBS 658.93	Osteomielitis, Antillas Holandesas
GMCH 480/07	Mucoramicosis cutánea, India
UTHSC 06-4222	Mucoramicosis en un delfín, Bahamas
GMCH 211/09	Mucoramicosis cutánea, India
UTHSC 03-3644	Mucoramicosis en un delfín, EUA
<i>Saksenaia vasiformis</i>	
NRRL 2443	Ambiental, India
FMR 10131	Clínica. Tarragona
FMR 10972	Paciente con quemaduras de 3º grado. EUA
UTHSC R-2974	Clínica, Texas, EUA

Materiales y métodos

3.2.2. Animales de experimentación

Para el desarrollo de los modelos experimentales de infección diseminada causada por hongos oportunistas y de su tratamiento, se utilizaron ratones machos 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 estabularon en condiciones estándar con acceso libre a la comida y a la bebida.



Los animales se supervisaron diariamente atendiendo especialmente los siguientes aspectos:

Apariencia del animal (pelo liso y brillante o piloerección).

- Peso (la pérdida acentuada de peso corporal es señal de sufrimiento)
- Postura (normal o encorvado).
- Secreciones (nasal, diarrea,...).
- Convulsiones.
- Locomoción (movimientos repentinos y rápidos, ataxia,...)
- Comportamiento no provocado (vocalizaciones, auto-mutilaciones...)
- Comportamiento en 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.

3.2.3. Inmunosupresión

Se utilizó la siguiente pauta de inmunosupresión:

Ciclofosfamida administrada en dosis única de 200 mg/kg intraperitoneal junto con 5-fluorouracilo en dosis única de 150 mg/kg por vía intravenosa el día previo a la infección (día -1).

3.2.4. Infección

En la preparación de los inóculos para los estudios *in vivo* se seguía el mismo procedimiento explicado anteriormente para los estudios *in vitro* en el apartado 3.1.4.3., pero ajustando su concentración al inóculo deseado para cada estudio con ayuda de la cámara de Neubauer. La concentración y la viabilidad del inóculo se verificaban siempre sembrando las diluciones adecuadas en placas de PDA, SDA o CZA. En todos los casos los inóculos se administraron intravenosamente a través de la vena lateral de la cola.

3.2.5. Fármacos

Los antifúngicos empleados en los tratamientos experimentales se muestran en la Tabla 4. Los tratamientos se iniciaron 24 horas después de la infección (día +1) y se administraron diariamente durante 7 o 10 días dependiendo del estudio. En la tabla 5 se muestran las vías de administración y las dosis empleadas para cada uno de los antifúngicos.

Tabla 4. Antifúngicos ensayados *in vivo* en los diferentes estudios

Antifúngicos	Procedencia	Disolvente
Anfotericina B	Anfotericina B desoxicolato, Farmacia Xalabarder, Barcelona, España	solución glucosada al 5%
Anfotericina B liposomal	Ambisome® Gilead Sciences S.L., Madrid, España	solución glucosada al 5%
Posaconazol	Noxafil® Shering-Plough, Madrid, España	solución salina fisiológica
Voriconazol	Vfend® Pfizer, Ltd., Madrid, España	solución salina fisiológica
Anidulafungina	Ecalta®, Pfizer Ltd, Kent, Reino Unido	etanol al 20%
Caspofungina	Cancidas® Merck & Co. Ltd., Herfordshire, Reino Unido	solución salina fisiológica

Materiales y métodos

3.2.6. Tratamientos, dosis y vías de administración

- **Vía intravenosa:** usada para la administración del 5-fluorouracilo en las pautas de inmunosupresión en el ratón, y en la administración de los tratamientos con anfotericina B y anfotericina B liposomal. Se utilizaron agujas del calibre 30 G x ½. La inyección se realizó a través de una de las venas laterales de la cola.
- **Vía intraperitoneal:** usada para la administración de la anidulafungina, la caspofungina y la ciclofosfamida en el ratón. Se utilizaron agujas del calibre 26 G x ½. La punción se realizó en la zona inferior y lateral del abdomen del animal inmovilizado en posición de Trendelenburg.
- **Vía subcutánea:** usada para la administración de la ceftazidima en las pautas de profilaxis. La dosis fue de 5 mg/kg/día, por 7 días. Se usaron agujas del calibre 30 G x ½, inyectando perpendicularmente a través de un pellizco de la piel en la zona de la nuca.
- **Vía oral:** usada para la administración del voriconazol y el posaconazol a través de una cánula esofágica.

Tabla 5. Relación de las vías de administración de fármacos , dosis y volúmenes administrados según el modelo animal desarrollado

Sustancia activa	Dosis. Vía de administración	Volumen
Anfotericina B	0.8 mg/kg/día. Intravenosa	0.1 ml
Anfotericina B liposomal	5 y 10 mg/kg/día. Intravenosa	0.1 ml
Posaconazol	10, 20 y 40 mg/kg/ dos veces al día. Oral	0.2 ml
Voriconazol	25 mg/kg/día. Oral	0.2 ml
Anidulafungina	1, 5 y 10 mg/kg/día. Intraperitoneal	0.1 ml
Caspofungina	5 mg/kg/día. Intraperitoneal	0.1 ml
Ciclofosfamida	200 mg/kg. Intraperitoneal	0.3 ml
5-Fluorouracilo	150 mg/kg. Intravenosa	0.1 ml

3.2.7. Recuperación fúngica a partir de órganos del animal infectado

Para cada estudio se estableció previamente el día adecuado de sacrificio. El método de sacrificio utilizado fue mediante inhalación de CO₂. Una vez sacrificados los animales, se extrajeron los órganos diana utilizando material quirúrgico estéril. Se estudiaron riñón, bazo, hígado, pulmón y cerebro, escogiendo los órganos adecuados para cada estudio. Se dispuso solución salina estéril en tubos estériles de 10 ml de capacidad, a razón de 1 ml por tubo, procediendo al tarado de los mismos. Posteriormente se introdujeron los órganos o porciones de éstos en su tubo correspondiente, se pesaron los tubos y se homogenizaron los órganos con varillas de vidrio estériles. Se realizaron diluciones seriadas 1:10 de los homogenizados y se sembraron en placas de PDA que se incubaron entre 30-35°C dependiendo de la especie de hongo filamentoso estudiado, procediéndose después al recuento de unidades formadoras de colonias (UFC) entre las 48-96 horas de incubación, dependiendo de la especie. La carga fúngica en los órganos se expresó en UFC/g según la siguiente fórmula:

$$\text{UFC/g} = \frac{\text{UFC/ml} \times (\text{peso del órgano} + 1\text{ml utilizado para homogeneizar})^*}{\text{Peso del órgano}}$$

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

3.2.8. Análisis adicionales de la eficacia de los antifúngicos

En los estudios de recuperación fúngica en las mucoramicosis experimentales causadas por *Apophysomyces variabilis* y *Saksenea vasiformis*, debido a la labilidad de las hifas, los tejidos fueron extraídos asépticamente y cortados en cinco fragmentos que fueron sembrados por duplicado en placas de CZA.

3.2.9. Bioensayo

En algunos de los estudios realizados se determinó la concentración de antifúngico en suero y en tejidos mediante bioensayo.

Realización de la recta patrón

El primer paso fue confeccionar una recta patrón para cada antifúngico (en nuestro caso el posaconazol, el voriconazol, la anidulafungina, y la anfotericina B) con un rango de diluciones con concentraciones conocidas de los fármacos. En el caso del posaconazol y de la anfotericina B el rango de diluciones ensayadas fue desde 0.125 hasta 10 µg/ml, mientras que para el voriconazol y la anidulafungina fue desde 0.625 hasta 10 µg/ml. Paralelamente, 24 horas antes del ensayo se sembró el organismo control, *Candida parapsilosis* ATCC 22019 o en el caso de realizar un bioensayos con anidulafungina, *C. albicans* ATCC 90028 en placas de Sabouraud que fueron posteriormente incubadas a 35° C. A partir de estas placas se preparó un inóculo con una concentración final de 2×10^6 células/ml, que se dispensó en tubos Falcon estériles que contenían 20 ml del medio esterilizado y con una temperatura aproximada de 40°C. La composición de dicho medio fue:

- 3.45 g de YNB (Yeast Nitrogen Base)
- 5 g de triptosa peptona
- 2.5 g de dextrosa
- 7.5 g de agar
- 500 ml agua destilada estéril

Después de homogenizar la muestra, ésta se dispensó en placas Petri de 100 x 15 mm. Una vez el medio se solidificó se practicaron en él pocillos de 4 mm de diámetro usando un sacabocados estéril y se dispensaron 20 µl de cada concentración de antifúngico en cada uno de ellos. Todos los ensayos fueron realizados por duplicado. Las placas se incubaron a 35°C durante 24 horas, transcurridas las cuales se efectuaron las mediciones de los diámetros de inhibición de crecimiento del hongo, los cuales fueron utilizados para la construcción de la recta patrón para cada antifúngico.

Determinación de la concentración de antifúngico en suero

Para calcular la concentración de fármaco en el suero de los animales se utilizaron grupos de cinco ratones 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 órganos. Se extrajo suero de los ratones anestesiados con

sevoflurano mediante punción cardíaca y se siguió la misma metodología anteriormente descrita para el cálculo de la recta patrón a partir de los rangos de concentraciones de los antifúngicos. La muestra de suero se obtuvo al cuarto, quinto o séptimo día de tratamiento, según el estudio, siempre 4 horas después de la última administración del antifúngico. Una vez medidos los diámetros, éstos fueron extrapolados en la recta patrón con la finalidad de conocer la concentración del antifúngico en suero.

Determinación de la concentración de antifúngico en órganos

Se extrajeron asépticamente los órganos a analizar (cerebro) de los ratones tratados, se pesaron y se homogeneizaron, mediante el método anteriormente descrito, en 1 ml de etanol. Tras incubar durante toda la noche a temperatura ambiente, el homogeneizado fue centrifugado y se recogió el sobrenadante. Utilizando un termobloque, se evaporó dicho sobrenadante, y el precipitado obtenido fue reconstituido con un volumen de suero de ratones sanos, igual al del sobrenadante previamente evaporado (80 μ l). Las muestras obtenidas fueron procesadas de la misma manera que las de sueros anteriormente mencionados, obteniendo así la concentración de antifúngico por gramo de tejido.

La metodología utilizada para realizar el biensayo se obtuvo mediante la modificación de diferentes métodos ya establecidos por otros autores (Bodet *et al.*, 1985; Kan *et al.*, 1986).

3.2.10. Detección y cuantificación de antígenos en suero

- **Galactomanano**

La determinación de los niveles de galactomanano en suero se utilizó como marcador adicional de eficacia del tratamiento en las infecciones experimentales por *A. terreus* y *A. fumigatus*. Para ello se empleó un método de enzimoimmunoensayo de doble sándwich (Platelia-*Aspergillus*®, Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, Francia) con un anticuerpo monoclonal de rata dirigido contra el galactomanano de *Aspergillus*. El suero se obtuvo a partir de la centrifugación de muestras de sangre extraídas de ratones anestesiados. Siguiendo el procedimiento descrito por el fabricante, se añadieron 100 μ l de EDTA 4% (ácido etilendiaminotetraacético) a 300 μ l de la muestra de suero. Esta mezcla se incubó

Materiales y métodos

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). Las placas se cubrieron con una lámina adhesiva y se incubaron a 37°C durante 90 minutos, transcurridos los cuales 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 paró la reacción agregando 100 µl de una solución de ácido sulfúrico 1,5 N. Finalmente se procedió a la lectura de la densidad óptica de cada pocillo a 450 nm.

- **Manano**

La determinación de manano, antígeno mayoritario e inmunodominante de la pared de *Candida*, fue usada como marcador adicional de eficacia del tratamiento en las infecciones experimentales por *C. parapsilosis*. Para ésto se utilizó un método de enzimoimmunoensayo (Platelia-*Candida* Ag®, Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, Francia) que utiliza un anticuerpo monoclonal EBCA 1, que reconoce los residuos de β-1,5 del manano. Las muestras de suero, fueron obtenidas del mismo modo descrito en el punto anterior. El procedimiento seguido fue el estipulado por el fabricante y sigue directrices similares a las descritas para la detección y cuantificación de galactomanano en suero.

- **(1→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. Para la determinación de este marcador de infección fúngica, se utilizó la prueba comercial Fungitell (Associates of Cape Cod Inc., Estados Unidos). Esta prueba consiste en un ensayo cinético y colorimétrico basado en la detección cualitativa de (1→3)-β-D-glucano, el cual se libera durante la infección y puede detectarse en los líquidos biológicos, principalmente en el suero (Pontón, 2009). El ensayo se basa en una modificación de la ruta de lisado de amebocitos de *Limulus* y se fundamenta en la determinación de la tasa del aumento de la densidad óptica de las muestras. Esta tasa es interpretada en base a una curva estándar, obteniendo así los valores aproximados

de la concentración de (1→3)- β -D-glucano en la muestra estudiada. El procedimiento metodológico se llevó a cabo siguiendo las instrucciones estipuladas por el fabricante, utilizando los materiales y reactivos provistos por el equipo comercial. A modo de resumen, los sueros problemas fueron centrifugados a 1.000 rpm durante 10 minutos, tras los que 5 μ l del sobrenadante de cada muestra fueron pipeteados en cada correspondiente pocillo de la microplaca (cada muestra por triplicado) y tratados con 20 μ l de una solución de 0.6 mol/L KCL y 0.125 mol/L de KOH e incubados a 37°C durante 10 minutos. Transcurrido este tiempo se añadieron 100 μ l del reactivo Fungitell ya reconstituido a cada pocillo (controles negativos, controles estándares y muestras problemas) mediante el uso de una pipeta de repetición o multicanal. Finalmente, la placa fue insertada en el lector de microplacas, calibrado a 37°C, donde fue agitada durante 5 a 10 segundos. Se procedió a la lectura de placa sin tapa a 405/490 nm durante 40 minutos a una temperatura constante (37°C). Los resultados obtenidos fueron analizados siguiendo las indicaciones del fabricante.

3.2.11. Histopatología

En uno de los estudios realizados, una porción de los órganos, tanto de los animales controles como de los animales tratados, fue fijada en formol al 10% para su posterior estudio histopatológico una vez realizada una primera observación macroscópica.

Deshidratación de las muestras

La deshidratación de las muestras se realizaba sumergiendo las piezas en concentraciones crecientes de alcohol etílico. Primero en alcohol 70% durante cuatro horas y a continuación en alcohol de 96% durante dos horas y de 100% durante tres horas. Una vez deshidratadas, las muestras se sumergían en xilol durante 2 – 3 horas con el fin de eliminar el alcohol residual de las mismas.

Parafinado

Una vez eliminado el alcohol de los tejidos, se procedía a la inclusión de las muestras en una mezcla de parafina blanda y xilol a partes iguales durante una hora y posteriormente en xilol saturado de parafina. Para obtener un parafinado

Materiales y métodos

óptimo, las muestras se dejaban 8 horas en parafina blanda (a 50 – 55 °C). Luego se introducían las piezas en parafina de punto de fusión de 56 – 58 °C durante 4 horas a 60°C hasta conseguir la total impregnación de los tejidos. El colado de los bloques de parafina se realizaba en cubetas de plástico.

Realización de cortes histológicos

Se realizaban cortes seriados de las piezas parafinadas de 3 µm de grosor utilizando un microtomo.

Desparafinado y rehidratación de las muestras

Antes de teñir, las muestras debían ser desparafinadas y rehidratadas para obtener preparaciones histológicas de calidad. Las muestras se cubrían con xilol durante 10 minutos. Luego se introducían en concentraciones decrecientes de alcohol isopropílico, primero en alcohol puro y después en alcohol 80%, por un espacio de tiempo de 5 minutos en ambos casos.

Tinción de las muestras.

Las técnicas de tinción empleadas fueron:

- Hematoxilina-eosina (H-E). En las muestras teñidas con dicha tinción, el citoplasma celular, las sustancias hialinas, amiloides y el colágeno presentaban color rosado. Las estructuras fúngicas, los núcleos celulares y sustancias mucoides se tiñeron de color morado oscuro.
- Ácido periódico de Schiff (PAS). Los núcleos celulares se teñeron 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 y las células fúngicas se tiñeron de color negro.

3.2.12. Análisis estadístico

Para la realización de los diferentes estudios estadísticos se utilizó el paquete de programas estadísticos SPSS para Windows en las versiones 14.0 y 15.0 y Graph Pad Prism versión 4.0 para Windows.

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 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. **Test de Kruskal-Wallis** es un test no paramétrico equivalente al anterior para múltiples grupos.

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, manano, betaglucano y bioensayo poseen una distribución normal. Una vez verificada la normalidad de la distribución mediante este test, los datos pueden analizarse mediante un **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. Anidulafungina en el tratamiento experimental de infecciones diseminadas por *Candida parapsilosis*: actividad *in vitro*, niveles séricos de (1→3)-β-D-glucano y manano, hallazgos histopatológicos y eficacia *in vivo*.

Anidulafungin in treatment of experimental invasive infection by *Candida parapsilosis*: *in vitro* activity, (1→3)-β-D-glucan and mannan serum levels, histopathological findings, and *in vivo* efficacy.

Salas V, Pastor FJ, Calvo E, Mayayo E, Quindós G, Carrillo AJ, Guarro J.

Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2011, 55: 4985-4989

Anidulafungin in Treatment of Experimental Invasive Infection by *Candida parapsilosis*: *In Vitro* Activity, (1→3)-β-D-Glucan and Mannan Serum Levels, Histopathological Findings, and *In Vivo* Efficacy[▽]

Valentina Salas,¹ F. Javier Pastor,¹ Enrique Calvo,¹ Emilio Mayayo,² Guillermo Quindós,³ Alfonso J. Carrillo,⁴ and Josep Guarro^{1*}

Unitat de Microbiologia,¹ and Unitat de Anatomia Patològica,² Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, IISPV, Universitat Rovira i Virgili, Reus, Spain; Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina y Odontología, Universidad del País Vasco, Bilbao, Spain³; and Departamento de Microbiología, Asesoría Científica y de Investigación Aplicada, Barcelona, Spain⁴

Received 13 April 2011/Returned for modification 25 June 2011/Accepted 8 August 2011

We have evaluated the *in vitro* activity of anidulafungin (AFG) against 31 strains of *Candida parapsilosis* sensu stricto by using broth microdilution, disk diffusion, and minimal fungicidal concentration (MFC) determination procedures. The two first methods showed a high level of activity of the drug, while MFCs were 1 to 5 dilutions higher than their corresponding MICs. To assess if MICs were predictive of *in vivo* outcomes, six strains representing different AFG MICs (0.12 to 2 μg/ml) were tested in a murine model of disseminated infection treated with different doses of the drug (1, 5, or 10 mg/kg of body weight). AFG was able to prolong the survival of mice infected with all the strains tested but was able to reduce the tissue burden of those mice infected only with the strains that showed the lowest MIC (0.12 μg/ml).

Candida parapsilosis is one of the most common causes of invasive candidiasis worldwide (14, 20, 21). Lipid formulations of amphotericin B, caspofungin (CSP), or voriconazole (VRC) have been recommended as first-line empirical treatment of invasive candidiasis in neutropenic patients, with fluconazole and itraconazole being considered alternatives (11). However, recent studies suggested that the use of azoles in the treatment of *Candida* infections may contribute to an increase in the clinical resistance of *C. parapsilosis* to these antifungal drugs (17). Since *C. parapsilosis* isolates are susceptible to the echinocandins (17), these drugs have been suggested to be a good therapeutic choice for *C. parapsilosis* infections, preventing an increase in azole resistance (17). Echinocandin MICs for *C. parapsilosis* are generally higher than those for other *Candida* species (2, 4, 8, 10, 11, 12, 13, 16), but the clinical significance of the *in vitro* data is unknown (16, 20). Anidulafungin (AFG), the most recently approved echinocandin, has shown high-level *in vitro* and *in vivo* activities against *Candida* spp. and is recommended for the treatment of esophageal candidiasis, candidemia, and other invasive *Candida* infections (15). Recently, clinical breakpoints for AFG have been established against several *Candida* spp., which can be very useful for the detection of possible emerging resistance, although in the case of *C. parapsilosis*, they are based on a small number of clinical cases ($n = 17$) (15). Animal studies can play an important role in obtaining a better understanding of the *in vitro-in vivo* corre-

lation, allowing a significant increase in the number of strains tested under controlled *in vivo* conditions. In our study, we have evaluated the *in vitro* activity of AFG and its *in vivo* efficacy in the treatment of invasive murine infection by *C. parapsilosis*, testing clinical isolates with different MICs.

MATERIALS AND METHODS

The *in vitro* antifungal susceptibilities of 31 clinical strains of *C. parapsilosis* sensu stricto to AFG were identified by comparing their internal transcribed spacer (ITS) sequences with those of reference strains. All isolates were of clinical origin and from patients who, according our files, had not previously been treated with any echinocandin. Their susceptibility to AFG was evaluated in duplicate by determinations of the MICs (in μg/ml), their inhibition zone diameters (IZDs) (in mm), and the minimum fungicidal concentrations (MFCs) (in μg/ml). MICs were determined by a broth microdilution method according to Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) guidelines for yeasts (5). IZDs were determined according to CLSI guidelines for disk diffusion testing of yeasts (6). *C. parapsilosis* strain ATCC 22019 was used as a quality control (QC). The MFC was determined by subculturing 20 μl of each well that showed complete inhibition (100% inhibition or an optically clear well) relative to the last positive well and the growth control onto Sabouraud dextrose agar (SDA) plates. The plates were incubated at 35°C until growth was seen in the control subculture. The MFC was considered the lowest drug concentration at which approximately 99.9% of the original inoculum was killed (7).

For murine studies, we chose six of those strains tested *in vitro*. There were two strains, FMR 11574 and FMR 10296, with MICs of 0.12 μg/ml; two strains, FMR 10292 and FMR 9544, with MICs of 1 μg/ml; and two strains, FMR 11562 and FMR 10293, with MICs of 2 μg/ml. The fungi were stored at -80°C, and they were subcultured on SDA at 35°C prior to testing. For animal inoculation, cultures on SDA were suspended in sterile saline. The resulting suspensions were adjusted to the desired inoculum based on hemocytometer counts and by serial plating onto SDA to confirm viability.

Male OF1 mice weighing 30 g (Charles River, Criffa S.A., Barcelona, Spain) were used in this study. Animals were housed under standard conditions, and the care procedures were supervised and approved by the Universitat Rovira i Virgili Animal Welfare and Ethics Committee. Mice were immunosuppressed 1 day prior to infection by the administration of a single dose of 200 mg of cyclophos-

* Corresponding author. Mailing address: Unitat de Microbiologia, Facultat de Medicina, Universitat Rovira i Virgili, Carrer Sant Llorenç 21, 43201 Reus, Spain. Phone: 977-759359. Fax: 977-759322. E-mail: josep.guarro@urv.cat.

[▽] Published ahead of print on 15 August 2011.

phamide per kg of body weight intraperitoneally (i.p.) plus a single dose of 150 mg of 5-fluorouracil per kg intravenously (i.v.) (9). Two different inocula were used in this study. For survival studies, the mice were challenged with 4×10^7 CFU in 0.2 ml of sterile saline injected into the lateral tail vein. Preliminary experiments testing several strains demonstrated that with this inoculum, the mortality rates were approximately 90% within 10 days after infection, allowing the animals to receive at least 5 days of treatment (data not shown). In tissue burden studies, the mice were inoculated with 4×10^6 CFU in 0.2 ml of sterile saline injected into the lateral tail vein. This inoculum was chosen in order to obtain a significant fungal load in organs but not cause the animals to die. In that way, animals could receive the entire treatment regimen and be compared with controls.

We tested AFG (Ecalta; Pfizer Ltd., Sandwich, Kent, United Kingdom) administered at 1, 5, or 10 mg/kg of body weight i.p. once a day (QD). To prevent bacterial infection, all animals received ceftazidime at 5 mg/kg day subcutaneously. All treatments began 24 h after challenge and lasted for 7 days. The efficacy of AFG was evaluated by prolongation of survival, tissue burden reduction, histopathological studies, and determination of mannan antigenemia and (1 \rightarrow 3)- β -D-glucan serum levels.

For the survival studies, groups of 10 mice were randomly established for each strain and treatment and checked daily for 30 days after challenge. Controls received no treatment. For the tissue burden studies, groups of 10 mice were also established, and the animals were sacrificed on day 7 postinfection in order to compare the results with those of untreated controls. Kidneys, liver, and spleen were aseptically removed, and approximately half of each organ was weighed and homogenized in 1 ml of sterile saline. Serial 10-fold dilutions of the homogenates were plated onto SDA and incubated for 24 h at 35°C, and the CFU/g of tissue was calculated. For the histopathology study, half of each organ was fixed with 10% buffered formalin. Samples were dehydrated, paraffin embedded, and sliced into 2- μ m sections, which were then stained with hematoxylin-eosin (H-E), periodic acid-Schiff (PAS) stain, or Grocott methenamine silver (GMS) and examined in a blinded fashion by light microscopy. Additionally, an average of 1.0 ml of blood from each mouse infected with *C. parapsilosis* strain FMR 11574 and treated with AFG at 1, 5, or 10 mg/kg was collected on day 7 postinfection for determinations of the drug levels in serum by bioassay 4 h after drug administration (3), and the mannan and (1 \rightarrow 3)- β -D-glucan serum levels were determined by using Platelia *Candida* antigen (Ag) (Bio-Rad, Marnes la Coquette, France) and a Fungitell kit (Associates of Cape Cod, East Falmouth, MA), respectively. Likewise, the remaining kidney was also aseptically removed to determine drug concentrations in this organ by a bioassay.

The mean survival times were estimated by the Kaplan-Meier method and compared among groups by using the log rank test. Colony counts from tissue burden studies were analyzed by using the Mann-Whitney U test. The Kolmogorov-Smirnov test was carried out to determine the normal distribution of (1 \rightarrow 3)- β -D-glucan, mannan serum levels, and bioassay data so that they could be analyzed by using the *t* test.

RESULTS

The *in vitro* susceptibility results showed MICs of ≤ 2 μ g/ml and IZDs of ≥ 10 mm for AFG against all strains of *C. parapsilosis*. The IZD range was 10 to 23 mm. For 84% of the strains tested, the difference between MFC and MIC values were within 3 dilutions, and the other strains (16%) were 4 to 5 dilutions higher than the corresponding MICs (Table 1). The results for the reference quality control strain (*C. parapsilosis* ATCC 22019) were within the range established by the CLSI (5).

The results of survival studies are shown in Fig. 1. AFG at 5 or 10 mg/kg for all strains and AFG at 1 mg/kg for two strains (one showing an MIC of 1 μ g/ml and another one showing an MIC of 2 μ g/ml) significantly prolonged survival in comparison with the control group. For the two strains with the lowest MICs (0.12 μ g/ml), AFG at 5 or 10 mg/kg reduced the fungal load in the three organs tested, while for the other strains, those dosages reduced the fungal load only in liver, in almost all cases (strains FMR 10292, FMR 9544, FMR 11562, and FMR 11293), and in spleen only occasionally (FMR 11562). AFG at 1 mg/kg reduced the fungal load only in spleen and in

TABLE 1. *In vitro* activities of AFG against 31 isolates of *C. parapsilosis*

Strain	MIC (μ g/ml)	IZD (mm)	MFC (μ g/ml)
FMR 9544	1	12	4
FMR 9613	1	13	8
FMR 9609	0.5	15	8
FMR 9612	1	15	4
FMR 9611	0.5	15	4
FMR 9608	1	13	4
FMR 9614	0.5	15	4
FMR 9615	1	13	4
FMR 9610	0.25	20	4
FMR 9601	2	10	8
FMR 10291	1	14	4
FMR 10292	1	17	4
FMR 11566	0.5	15	4
FMR 11573	0.5	11	4
FMR 11571	2	14	4
FMR 10288	1	16	4
FMR 10289	1	15	8
FMR 10296	0.12	22	4
FMR 11563	0.25	20	4
FMR 11769	0.25	17	2
FMR 10304	0.5	22	4
FMR 11572	0.5	15	2
FMR 10301	0.5	18	4
FMR 10293	2	12	8
FMR 10297	0.5	14	4
FMR 10290	0.5	13	4
FMR 11565	2	11	4
FMR 11574	0.12	23	4
FMR 11562	2	16	4
FMR 11564	2	11	4
FMR 10302	1	16	4
ATCC 22019	1	15	2

liver for strain FMR 11574 (MIC = 0.12 μ g/ml). However, for the other strain with an AFG MIC of 0.12 μ g/ml (FMR 10296), AFG at 1 mg/kg was not able to significantly reduce CFU in spleen and liver. For strain FMR 10296, the fungal burden in the kidneys of untreated mice was 1 log lower than that of the other strain (FMR 11574), despite it having the same MIC, suggesting a lower virulence of this strain. The comparison of the kidney CFU counts also showed a similar pattern between strains with the same susceptibility to AFG (Fig. 2).

Table 2 shows the AFG levels in serum and kidney. At day 7 of treatment, for all doses administered, antifungal levels in serum and kidneys were above the corresponding MIC values for the strains tested and increased with dose escalation.

No dose of AFG at the end of the therapy was able to reduce the mannan serum concentrations in comparison with the untreated group (Fig. 3). At day 7 of treatment, in all the cases, the (1 \rightarrow 3)- β -D-glucan serum levels were positive (>80 pg/ml) (18), although those levels were significantly lower in animals treated with AFG at 5 or 10 mg/kg than in control animals and in those treated with AFG at 1 mg/kg (Fig. 4).

The histological study showed abundant fungal cells and signs of necrosis and an inflammatory response in the kidneys of untreated controls and of mice treated with any dose of AFG. Livers of controls and of mice of all treatment groups

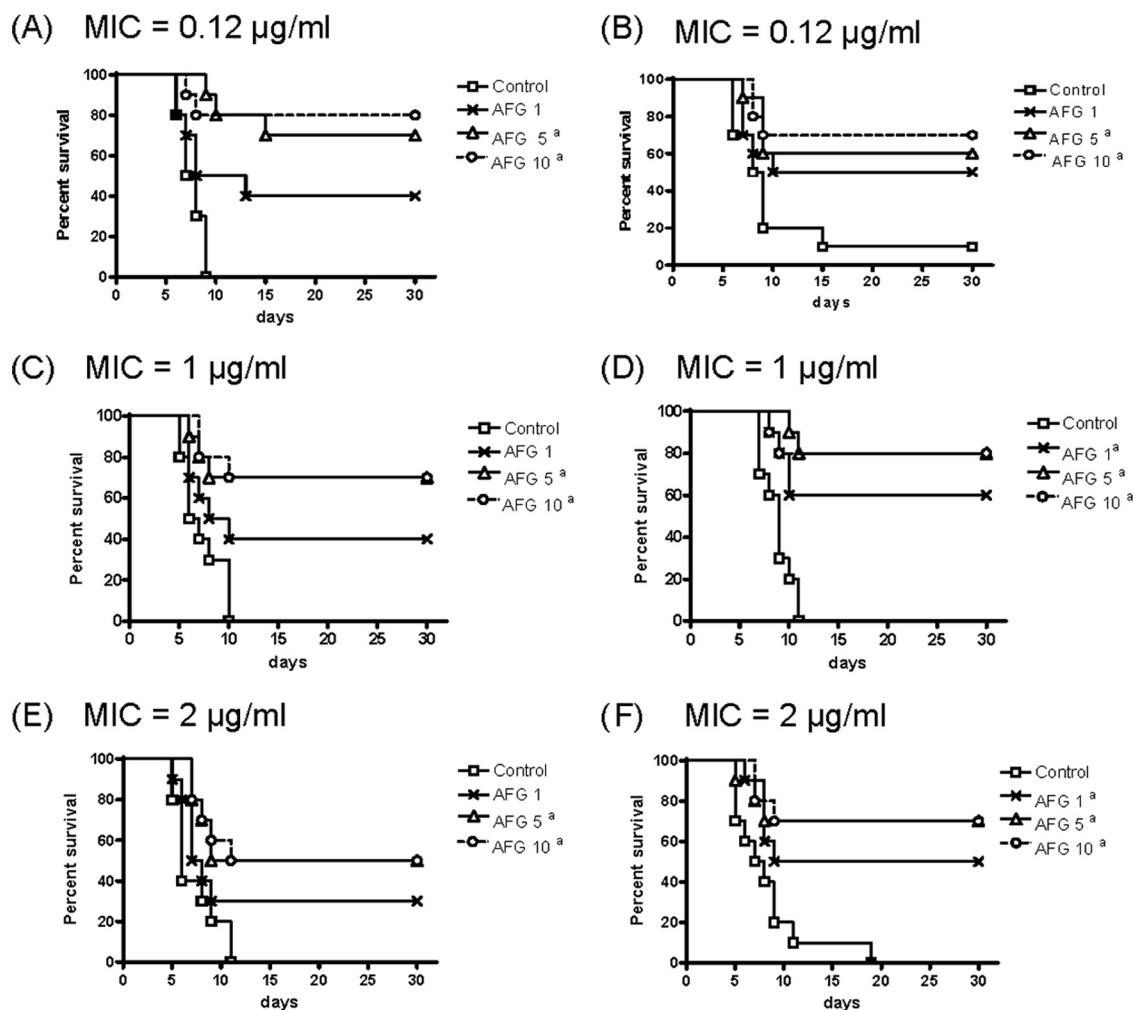


FIG. 1. Cumulative mortality of mice infected with *C. parapsilosis* FMR 11574 (A), FMR 10296 (B), FMR 10292 (C), FMR 9544 (D), FMR 11562 (E), and FMR 10293 (F). AFG 1, anidulafungin at 1 mg/kg QD; AFG 5, anidulafungin at 5 mg/kg QD; AFG 10, anidulafungin at 10 mg/kg QD. a, $P < 0.05$ versus the control.

showed fungal invasion, but there were no signs of necrosis or an inflammatory response. There were neither tissue lesions nor fungal invasion in spleens of controls or mice treated with AFG.

DISCUSSION

Although some clinical trials have demonstrated the therapeutic efficacy of echinocandins in invasive candidiasis, including that caused by *C. parapsilosis* (16, 19), some controversy exists about the usefulness of echinocandins in the treatment of disseminated infections caused by that fungus. Currently, echinocandins are not recommended for the treatment of *C. parapsilosis* fungemia because of the high MICs that these drugs show for such species in comparison to other species of *Candida* (11).

On the basis of the IZD-suggested breakpoints for CSP, i.e., susceptible at ≥ 13 mm, intermediate at 11 to 12 mm, and resistant at ≤ 10 mm (15), in general, our study showed a good correlation between the results obtained with the microdilution method and those obtained with the disk diffusion

method. However, we did not find any correlation with the IZD breakpoints suggested for micafungin (MFG), which are ≥ 16 mm, 14 to 15 mm, and ≤ 13 mm, respectively (15). Since there are no IZD susceptibility breakpoints for AFG against *C. parapsilosis*, a more accurate comparison between MICs and IZDs for that antifungal and that species was not possible.

Contrary to the results obtained in another experimental study on the efficacy of echinocandins in disseminated infections by *C. parapsilosis* (2), we have obtained a correlation between the MICs and the *in vivo* outcome that agrees with the results of the clinical trials, which showed 100% success in the treatment of infections by *C. parapsilosis* strains with AFG MIC values of 0.25 µg/ml, in comparison with success rates of 87.5 to 90% for infections caused by strains with MICs of ≥ 0.5 µg/ml (15). In a study reported previously by Barchiesi et al. (2), using a murine model similar to ours, CSP at 1 and 5 mg/kg was effective in reducing the kidney fungal load in mice infected with a *C. parapsilosis* strain with a CSP MIC of 4 µg/ml, whereas only the 5-mg/kg dosage was effective in mice infected with those strains with CSP MICs of 0.5 or 1.0 µg/ml (2). In our

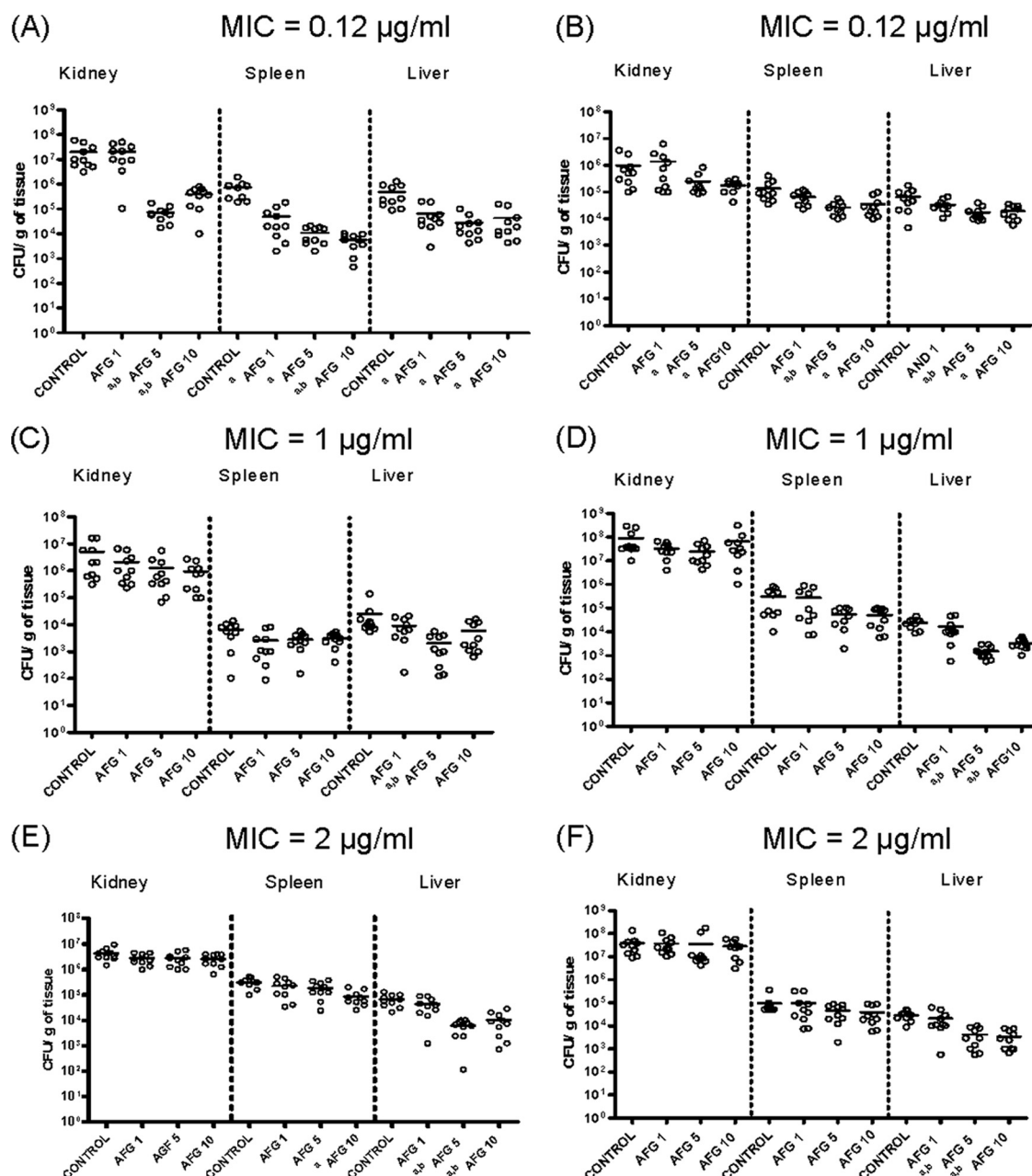


FIG. 2. Effects of AFG on colony counts of *C. parapsilosis* FMR 11574 (A), FMR 10296 (B), FMR 10292 (C), FMR 9544 (D), FMR 11562 (E), and FMR 10293 (F) in kidneys, liver, and spleen of neutropenic mice. AFG 1, anidulafungin at 1 mg/kg QD; AFG 5, anidulafungin at 5 mg/kg QD; AFG 10, anidulafungin at 10 mg/kg QD. a, $P < 0.05$ versus control group; b, $P < 0.05$ versus AFG at 1 mg/kg.

TABLE 2. Drug levels in serum and kidneys measured by bioassay on day 7 of therapy and 4 h after last dose

Dose of AFG (mg/kg)	Mean drug concn \pm SD	
	Serum ($\mu\text{g/ml}$)	Kidney ($\mu\text{g/g}$)
1	2.92 ± 1.23	2.06 ± 1.06
5	10.85 ± 1.6^a	8.5 ± 2.34^a
10	$13.66 \pm 1.15^{a,b}$	$13.84 \pm 1.46^{a,b}$

^a $P < 0.05$ versus AFG at 1 mg/kg QD.

^b $P < 0.05$ versus AFG at 5 mg/kg QD.

study, the efficacy of AFG was poor in reducing the fungal burden in organs of mice infected with the strains with high MICs, although the drug improved the survival of mice against all the strains tested. AFG was more effective in reducing the fungal load in the organs of animals challenged with *C. parapsilosis* strains with low AFG MICs ($0.12 \mu\text{g/ml}$).

In agreement with pharmacodynamic studies of echinocandins (1), our results on tissue burden, histopathology, and mannan and (1 \rightarrow 3)- β -D-glucan serum levels showed that for the treatment of infection with strains that have MICs of 1 or $2 \mu\text{g/ml}$, higher doses of AFG were required for improving survival.

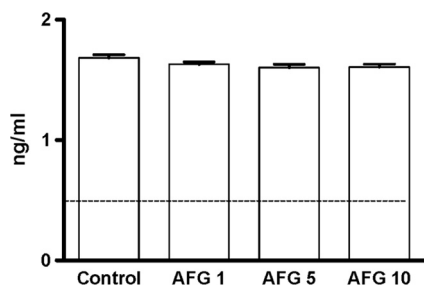


FIG. 3. Mannan antigen serum levels in mice infected with *C. parapsilosis* measured at day 7 (final treatment) ($n = 5$ animals per group). AFG 1, anidulafungin at 1 mg/kg; AFG 5, anidulafungin at 5 mg/kg; AFG 10, anidulafungin at 10 mg/kg. The horizontal line indicates the cutoff for positivity (0.5 ng/ml).

Although AFG in general worked well against all the strains of *C. parapsilosis* tested, this study demonstrated that the response to treatment is largely strain dependent and clearly related to *in vitro* activity. It was noted previously that more than 90% of clinical isolates of *C. parapsilosis* are encompassed by a breakpoint of $\leq 2 \mu\text{g/ml}$ (15). It should also be noted that we did not test the efficacy of other antifungal drugs as active controls, which would have allowed a better assessment of the activity of AFG.

On the other hand, we have demonstrated that, at least in experimental studies, there are still some important differences among those strains with MICs of $\leq 2 \mu\text{g/ml}$, and it would be interesting to explore them in future studies. In our study, MICs of 0.12 $\mu\text{g/ml}$ were clearly the most predictive of *in vivo* success, while we did not find any differences between MICs of 1 and 2 $\mu\text{g/ml}$. It would also be interesting in future studies to refine these results, carrying out further animal studies with strains with other AFG MICs, e.g., intermediate between 0.12

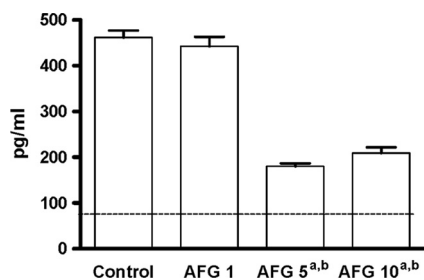


FIG. 4. (1->3)- β -D-Glucan serum concentrations in mice infected with *C. parapsilosis* measured at day 7 (final treatment) ($n = 5$ animals per group). AFG 1, anidulafungin at 1 mg/kg; AFG 5, anidulafungin at 5 mg/kg; AFG 10, anidulafungin at 10 mg/kg QD. a, $P < 0.05$ versus control; b, $P < 0.05$ versus AFG at 1 mg/kg. The horizontal line indicates the cutoff for positivity (80 pg/ml).

and 1 $\mu\text{g/ml}$ and $\geq 2 \mu\text{g/ml}$, in order to assess more accurately which MICs can predict a risk of clinical failure.

ACKNOWLEDGMENT

The current work has been funded in part by project GIC07 123-IT-222 (Departamento de Educación, Universidades e Investigación, Gobierno Vasco).

REFERENCES

- Andes, D., et al. 2010. *In vivo* comparison of the pharmacodynamic targets for echinocandin drugs against *Candida* species. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**:2497–2506.
- Barchiesi, F., et al. 2006. Effects of caspofungin against *Candida guilliermondii* and *Candida parapsilosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**:2719–2727.
- Calvo, E., F. J. Pastor, E. Mayayo, V. Salas, and J. Guarro. 2010. *In vitro* activity and *in vivo* efficacy of anidulafungin in murine infections by *Aspergillus flavus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **55**:1290–1292.
- Cantón, E., A. Espinel-Ingroff, J. Pemán, and L. del Castillo. 2010. *In vitro* fungicidal activities of echinocandins against *Candida metapsilosis*, *C. orthopsilosis*, and *C. parapsilosis* evaluated by time-kill studies. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**:2194–2197.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. 2008. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard, 3rd ed. Document M27-A3. CLSI, Wayne, PA.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. 2008. Method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of yeasts; approved guideline. Document M44-A2. CLSI, Wayne, PA.
- Espinel-Ingroff. 1998. Comparison of *in vitro* activities of the new triazole SCH 56592 and the echinocandins MK-0991 (L-743,872) and LY303366 against opportunistic filamentous and dimorphic fungi and yeasts. *J. Clin. Microbiol.* **36**:2950–2956.
- Ghannoum, M. A., et al. 2009. Differential *in vitro* activity of anidulafungin, caspofungin and micafungin against *Candida parapsilosis* isolates recovered from a burn unit. *Clin. Microbiol. Infect.* **15**:274–279.
- Graybill, J. R., R. Bocanegra, L. K. Najvar, D. Loebenberg, and M. F. Luther. 1998. Granulocyte colony-stimulating factor and azole antifungal therapy in murine aspergillosis: role of immune suppression. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**:2467–2473.
- Kuti, E. L., and J. L. Kuti. 2010. Pharmacokinetics, antifungal activity and clinical efficacy of anidulafungin in the treatment of fungal infections. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* **6**:1287–1300.
- Pappas, P. G., et al. 2009. Clinical practice guidelines for the management of candidiasis: 2009 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin. Infect. Dis.* **48**:503–535.
- Pfaller, M. A., et al. 2008. *In vitro* susceptibility of invasive isolates of *Candida* spp. to anidulafungin, caspofungin, and micafungin: six years of global surveillance. *J. Clin. Microbiol.* **46**:150–156.
- Pfaller, M. A., et al. 2005. *In vitro* activities of anidulafungin against more than 2,500 clinical isolates of *Candida* spp., including 315 isolates resistant to fluconazole. *J. Clin. Microbiol.* **43**:5425–5427.
- Pfaller, M. A., and D. J. Diekema. 2007. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin. Microbiol. Rev.* **20**:133–166.
- Pfaller, M. A., et al. 2011. Clinical breakpoints for the echinocandins and *Candida* revisited: integration of molecular, clinical, and microbiological data to arrive at species-specific interpretative criteria. *Drug Resist. Updat.* **14**:164–176.
- Pfaller, M. A., et al. 2005. Effectiveness of anidulafungin in eradicating *Candida* species in invasive candidiasis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**:4795–4797.
- Pfaller, M. A., G. J. Moet, S. A. Messer, R. N. Jones, and M. Castanheira. 2011. *Candida* bloodstream infections: comparison of species distributions and antifungal resistance patterns in community-onset and nosocomial isolates in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 2008–2009. *Antimicrob. Agents Chemother.* **55**:561–566.
- Pickering, J. W., H. W. Sant, C. A. P. Bowles, W. L. Roberts, and G. L. Woods. 2005. Evaluation of a (1->3)- β -D-glucan assay for diagnosis of invasive fungal infections. *J. Clin. Microbiol.* **43**:5957–5962.
- Reboli, A. C., et al. 2007. Anidulafungin versus fluconazole for invasive candidiasis. *N. Engl. J. Med.* **356**:2472–2482.
- Trofa, D., A. Gácsér, and J. D. Nosanchuk. 2008. *Candida parapsilosis*, an emerging fungal pathogen. *Clin. Microbiol. Rev.* **21**:606–625.
- van Asbeck, E. C., K. V. Clemons, and D. A. Stevens. 2009. *Candida parapsilosis*: a review of its epidemiology, pathogenesis, clinical aspects, typing and antimicrobial susceptibility. *Crit. Rev. Microbiol.* **35**:283–309.

4.2. Eficacia de la caspofungina en un modelo murino de infección diseminada causada por *Candida parapsilosis*.

Efficacy of caspofungin in a murine model of disseminated infection by *Candida parapsilosis*.

Salas V, Pastor FJ, Calvo E, Sutton DA, Mayayo E, Fothergill AW, Rinaldi MG, Guarro J.

En preparación

1 **Efficacy of caspofungin in a murine model of disseminated infection by**
2 ***Candida parapsilosis***

3
4
5
6
7

8 Valentina Salas¹, F. Javier Pastor¹, Enrique Calvo¹, Deanna A. Sutton³, Emilio
9 Mayayo², Anette W. Fothergill³, Michael G. Rinaldi³, and Josep Guarro^{1*}

10
11
12
13
14
15
16
17

18 Unitat de Microbiologia¹ and Unitat de Anatomia Patològica², Facultat de Medicina i
19 Ciències de la Salut, IISPV, Universitat Rovira i Virgili, Reus, Spain

20 Fungus Testing Laboratory University of Texas Health Science Center, San Antonio,
21 Texas. ³

22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40

41
42
43

44 **Abstract**

45 We have tested the *in vitro* activity of caspofungin against 36 strains of *Candida*
46 *parapsilosis sensu stricto* by using broth microdilution and disk diffusion methods,
47 and the minimal fungicidal concentration (MFC) determination. The two first methods
48 indicated a good *in vitro* activity of caspofungin, but the MFCs were, in all the cases \geq
49 2 dilutions above than their corresponding MICs. We have also evaluated the
50 efficacy of caspofungin in a murine model by using eight strains of *Candida*
51 *parapsilosis* representing different degrees of *in vitro* susceptibility (0.12 - 1 $\mu\text{g/ml}$).
52 Caspofungin at 5 mg/kg reduced the tissue burden of mice infected with isolates with
53 MICs \leq 0.5 $\mu\text{g/ml}$, being less effective against isolates with caspofungin MICs of 1
54 $\mu\text{g/ml}$.

55

56

57

58

59

60

61

62

63

64

65

66

67

68

69

70

71

72

73

74

75

76

77

78

79

80

81

82

83

84

85 Introduction

86 Invasive candidiasis remains the most frequent opportunistic mycosis worldwide,
87 which mostly affects immunocompromised patients. Even though the majority of
88 infections are caused by *Candida albicans*, other species such as *Candida*
89 *parapsilosis* has also become an important pathogen (Troffa *et al* 2008; van Asbeck
90 *et al* 2009). Although current recommendations for invasive candidiasis in
91 neutropenic patients include the use of caspofungin as first line therapy, fluconazole
92 or lipid formulations of amphotericin B are preferred drugs for the treatment in these
93 infections caused by *C. parapsilosis* due to this species exhibited higher
94 echinocandin MICs than other species of *Candida* (Pappas *et al* 2009). However,
95 recent studies have demonstrated that approximately a 6% of *C. parapsilosis* isolates
96 are fluconazole resistant, suggesting the possibility that this percentage could
97 increase with the use of azoles as treatment of *Candida* infections (Pfaller *et al*
98 2011a). Data on *in vitro* studies demonstrated the susceptibility of *C. parapsilosis* to
99 echinocandins, suggesting that these antifungals could be a good therapeutic choice
100 for *C. parapsilosis* infections preventing the increase in azole resistance (Pfaller *et al*
101 2011a). Although *C. parapsilosis* isolates exhibited higher echinocandins MICs than
102 other species of *Candida*, the clinical significance of these *in vitro* data is not yet
103 clear (Troffa *et al* 2008, Pfaller *et al* 2011b). Currently, based on several studies, the
104 recommended clinical breakpoints for *C. parapsilosis* are susceptible ≤ 2 $\mu\text{g/ml}$,
105 intermediate resistance = 4 $\mu\text{g/ml}$ and resistant ≥ 8 $\mu\text{g/ml}$ (Pfaller & Diekema 2012).
106 On the other hand, epidemiological cut-off values (ECV) for echinocandins have
107 been recently established against several *Candida* spp. The ECV of caspofungin for
108 *C. parapsilosis* is 1 $\mu\text{g/ml}$ (Pfaller *et al* 2010). In theory these ECV should be useful to
109 identify those isolates with an acquired resistance mechanism to that antifungal
110 agent (Pfaller *et al* 2010).
111 Animal studies have demonstrated to be useful predictors of *in vivo* efficacy in
112 humans (Guarro 2011). In this study we have evaluated the *in vivo* efficacy of

113 caspofungin in the treatment of invasive murine model infection by *C. parapsilosis*,
114 testing strains with different degrees of susceptibility to such antifungal drug.

115 **Material and methods**

116 Thirty six clinical isolates of *C. parapsilosis* sensu stricto (identified by comparing
117 their ITS sequences with those of the reference strains) were used in the *in vitro*
118 studies. Their susceptibility to caspofungin was evaluated by duplicate by using three
119 different methods. Broth microdilution and disk-diffusion methods were used to
120 determinate the minimum inhibitory concentrations (MICs, in $\mu\text{g/ml}$) and the inhibition
121 zone diameters (IZDs, in mm), according the respective CLSI guidelines for yeasts
122 (M 27-A3, M 44-A2).

123 The suggested MIC breakpoints for caspofungin against *C. parapsilosis* were
124 determined according current criteria, i.e. Susceptible (S), $\leq 1 \mu\text{g/ml}$; Intermediate (I),
125 $4 \mu\text{g/ml}$; and Resistant (R), $\geq 8 \mu\text{g/ml}$ (Pfaller & Diekema 2012). The IZD values were
126 indicative of susceptibility and resistance for caspofungin when they were $\geq 11 \text{ mm}$
127 and $\leq 10 \text{ mm}$, respectively (Pfaller *et al.* 2011a).

128 The strain *C. parapsilosis* ATCC 22019 was used as quality control. The minimal
129 fungicidal concentration (MFC) was determined by subculturing in Sabouraud
130 dextrose agar potato (SDA) plates 20 μl of each well that showed complete inhibition
131 or an optically clear well relative to the last positive well and the growth control. The
132 plates were incubated at 35°C until growth was seen in the control subculture. The
133 MFC was considered as the lowest drug concentration at which approximately 99.9%
134 of the original inoculum was killed (Espinel-Ingroff, 1998).

135 Eight of these strains representing the spectrum of MICs showed in the *in vitro* study
136 were chosen for *in vivo* studies. They were 1 strain with MIC = $0.12 \mu\text{g/ml}$; 2 strains
137 with MICs = $0.25 \mu\text{g/ml}$; 2 strains with MICs = $0.5 \mu\text{g/ml}$; and 3 strains with MIC = 1
138 $\mu\text{g/ml}$.

139 Male OF1 mice (Charles River, Criffa S.A., Barcelona, Spain) weighing 30 g were
140 used in this study. Animals were housed under standard conditions. All animal care

141 procedures were supervised and approved by the Universitat Rovira i Virgili Animal
142 Welfare and Ethics Committee. Animals were immunosuppressed 1 day prior to
143 infection by administering a single intraperitoneal (i.p.) injection of 200 mg/kg of
144 cyclophosphamide (Genoxal; Laboratories Funk S.A., Barcelona, Spain), plus a
145 single intravenous (i.v.) injection of 150 mg/kg of body weight of 5-fluorouracil
146 (Fluorouracilo; Ferrer Farma S.A., Barcelona, Spain). This immunosuppressive
147 regimen provokes severe neutropenia with peripheral blood polymorphonuclear
148 leukocyte (PMN) counts $< 100/\mu\text{l}$ from day 3 to 9 or later (Ortoneda *et al* 2004). Mice
149 were challenged with 4×10^6 CFU in 0.2 ml of sterile saline injected into the lateral
150 tail vein. In a previous study we demonstrated that this inoculum provoked a
151 significant fungal load in organs but not cause to die. Thus, the animals could receive
152 the entire treatment regimen and be compared with controls.

153 We tested caspofungin (Cancidas, Merck and Co., Inc., Whitehouse Station, N.J,
154 USA) administered at 5 mg/kg of body weight i.p. once a day. Previous
155 pharmacokinetic studies in mice demonstrated that this dose regimen provided drug
156 plasma concentration similar or higher than those obtained at the human therapeutic
157 dose (Stone *et al* 2004, Andes *et al* 2010, Wiederhold *et al* 2012).

158 To prevent bacterial infection, all animals received ceftazidime at 5 mg/kg day
159 subcutaneously. All treatments began 24 h after challenge and lasted for 7 days. The
160 efficacy of the caspofungin was evaluated through tissue burden reduction, and by
161 the determination of mannan antigenemia and $(1 \rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-D-glucan}$ serum levels. For
162 the tissue burden studies, groups of 10 mice were established. Four hours after last
163 dose the animals were sacrificed on day 7 post-infection in order to compare the
164 results with untreated controls. Kidneys, liver and spleen were aseptically removed
165 and homogenized in 1 ml of sterile saline. Serial 10-fold dilutions of the homogenates
166 were plated on SDA and incubated for 24 h at 35°C, the CFUs/g of tissue being
167 calculated. For antigenemia determinations, before being sacrificed (on day 7 post-
168 infection [Salas *et al* 2011]) approximately 1 ml of blood from each mouse belonging
169 to the tissue burden groups was extracted by cardiac puncture. Pooled serum

170 samples from mice of each treatment group were used to determine the mannan and
171 (1→3)-β-D-glucan levels by using Platelia *Candida* Ag (Bio Rad, Marnes, la
172 Coquette, France) and Fungitell kit (Associates of Cape Cod, E. Falmouth, MA),
173 respectively.

174 Colony counts from tissue burden studies were analysed using the Mann-Whitney U
175 test. The Kolmogorov-Smirnov test was carried out to determine the normal
176 distribution of (1→3)-β-D-glucan and mannan serum levels, data so that they could
177 be analyzed using the T-test.

178 **Results**

179 The caspofungin MICs range of the 36 isolates of *C. parapsilosis* tested was 0.12 - 1
180 µg/ml with a modal MIC of 0.5 µg/ml (MIC50 and MIC90 values of 0.5 and 1µg/ml,
181 respectively). The IZD range was from 11 to 23 mm (geometric mean = 15.80 mm,
182 standard deviation = 3.3 mm). All the strains tested showed caspofungin MIC and
183 IZD values included in the suggested current ranges of susceptibility. A good
184 correlation between the microdilution and the disk diffusion methods results was
185 obtained. The MFCs were in most of the cases ≥ 2 dilutions above than their
186 corresponding MICs (Table 1).

187 Caspofungin was able to reduce the fungal load with respect to results for the
188 controls in the three organs tested only for all the strains with MICs ≤ 0.5 µg/ml. For
189 the three isolates that showed MIC = 1 µg/ml, caspofungin only reduced the fungal
190 burden in one or two of the organs assayed. For the strains FMR 11754 and FMR
191 11962 (MIC 0.12 and 0.5 µg/ml respectively), the fungal burden in the kidneys of
192 untreated mice was 1 to 4 log higher than that of the other isolates, which could
193 suggests a high virulence of these isolates.

194 The drug was also able to reduce the (1→3)-β-D-glucan serum concentrations in
195 comparison with the untreated group, but in all the cases these levels were above the
196 cut-off for positivity (> 80 pg/ml) (Fig. 3). In general, caspofungin was not able to
197 reduce the mannan serum levels in comparison with the untreated group (Fig. 4).

198

199 Discussion

200 Up to now, there is not sufficient clinical evidence on the role of the echinocandins in
201 the treatment invasive candidiasis infection caused by *C. parapsilosis*. Currently,
202 caspofungin is considered as a treatment of choice in patients with invasive *Candida*
203 infections; however, in the case of infections caused by *C. parapsilosis* its use is
204 controversial (Mougdal *et al* 2005, Cheung *et al* 2006, Pappas *et al* 2009, Gutiérrez-
205 Urbón *et al* 2010).

206 All of caspofungin MIC values obtained in the present study were within the range of
207 susceptibility, therefore, isolates of such species for which caspofungin MICs were
208 above the corresponding clinical breakpoint were not available here. Likewise, in a
209 previous study, carried out with a large number of clinical isolates of *C. parapsilosis*,
210 only for the 1 % of them, the caspofungin MICs were > 1 µg/ml (Pfaller *et al* 2010). In
211 general, our study showed a good correlation between the results obtained with
212 microdilution and disk diffusion methods (Pfaller *et al* 2011b). But, in the majority of
213 the cases there was a lack of correlation between MICs and MFCs of caspofungin,
214 the MFC values being significantly higher than their corresponding MICs. However,
215 these facts agree with previous studies that have suggested a fungistatic activity of
216 caspofungin against *C. parapsilosis* (Cantón *et al* 2010, Földi *et al* 2012, Spreghini *et*
217 *al* 2012).

218 The efficacy of caspofungin for the treatment of *C. parapsilosis* infections has been
219 evaluated in three studies (Barchiesi *et al* 2006, Földi *et al* 2012, Spreghini *et al*
220 2012), using a murine model similar to ours where caspofungin showed also efficacy.
221 In the present study, caspofungin at 5 mg/kg was effective at reducing the fungal
222 load in the kidneys of mice infected with those isolates that showed MICs ≤ 0.5
223 µg/ml, which is in agreement with data of the studies of Barchiesi *et al* (2006) and
224 Spreghini *et al* (2012). Although other authors have previously reported the *in vivo*
225 efficacy of caspofungin at 5 mg/kg against isolates that showed MICs ≥ 1 µg/ml
226 (Barchiesi *et al* 2006, Földi *et al* 2012), here, such dose only was able to reduce the
227 fungal burden in liver and produce variable results in reducing the fungal load in

228 kidneys and spleen in those animals challenged with the three isolates with MIC = 1
229 µg/ml. In the present study, using a large panel of *C. parapsilosis* clinical isolates,
230 suggest a relationship between *in vitro* and *in vivo* results for strains with CSP MICs
231 ≤ 1 µg/ml. In this sense, data on pharmacodynamics of echinocandins indicated a
232 direct relationship between the increase in MICs of this group of antifungal agents
233 and the decrease in the *in vivo* efficacy against infections caused by *C. parapsilosis*
234 in mice (Andes *et al* 2010). However, in the study of Barchiesi *et al.* (2006) no
235 relationship between *in vitro* and *in vivo* results was observed, CSP at 1 and 5 mg/kg
236 being effective in reducing the kidneys fungal burden in mice challenged with a *C.*
237 *parapsilosis* isolate having a caspofungin MIC of 4 µg/ml, while only the 5 mg/kg
238 dosage was effective in those mice infected with strains that showed caspofungin
239 MICs of 0.5 or 1.0 µg/ml.

240 On the other hand, clinical data on the efficacy of caspofungin in the treatment of *C.*
241 *parapsilosis* infections reported a favourable outcome in approximately 75% of the
242 patients treated with this antifungal drug without a clear relationship between
243 caspofungin MICs and clinical outcome (Mora-Duarte *et al* 2002, Kartsonis *et al*
244 2005, Pfaller *et al* 2011b). However these studies are not conclusive, because few
245 isolates with MICs > 1 µg/ml were included.

246 In our study, although caspofungin shows a good *in vitro* activity against all *C.*
247 *parapsilosis* strains tested, the best *in vivo* efficacy was observed among the animals
248 challenged with those isolates that showed MICs ≤ 0.5 µg/ml. While in those mice
249 infected with strains with MICs = 1 µg/ml (currently ECV) the results were variable.
250 Our study highlights the importance of carrying out *in vivo* studies testing different
251 isolates of a given species; because as we have demonstrated here, differences in
252 the *in vivo* response, at least in animal model, seems to be strain dependent in those
253 mice infected with the isolates with MICs > 0.5 µg/ml. However, further studies
254 testing strains with caspofungin MICs > 1 µg/ml are required to more accurately
255 define which MICs correlate better with the *in vivo* efficacy.

256

257 **References**

- 258 Andes D, Diekema D J, Pfaller M A, Bohrmuller J, Marchillo K, Lepak A. *In vivo*
259 comparison of the pharmacodynamic targets for echinocandins drug against *Candida*
260 species. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; **54**: 2497-2506
261
- 262 Barchiesi F, Spreghini E, Tomassetti S, Della Vittoria A, Arzeni D, Manso E, Scalise
263 G. Effects of caspofungin against *Candida guilliermondii* and *Candida parapsilosis*.
264 *Antimicrob Agents Chemother* 2006; **50**: 2719-2727
265
- 266 Cantón E, Espinel-Ingroff A, Pemán J, del Castillo L. *In vitro* fungicidal activities of
267 echinocandins against *Candida metapsilosis*, *C. orthopsilosis*, and *C. parapsilosis*
268 evaluated by time-kill studies. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; **54**: 2194-2197
269
- 270 Cheung C, Guo Y, Gialanella P, Feldmesser M. Development of candidemia on
271 caspofungin therapy: a case report. *Infection* 2006; **34**:345-348
272
- 273 Espinel-Ingroff A. Comparison of *in vitro* activities of the new triazole SCH 56592 and
274 the echinocandins MK- 0991(L-743,872) and LY303366 against opportunistic
275 filamentous and dimorphic fungi and yeasts. *J Clin Microbiol* 1998; **36**: 2950-2956
276
- 277 Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution
278 antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard-third edition. Document
279 M27-A3. CLSI, 2008; Wayne, Pa.
280
- 281 Clinical and Laboratory Standards Institute. Method for antifungal disk diffusion
282 susceptibility testing of yeasts; approved guideline. Document M44-A2. CLSI, 2008;
283 Wayne, Pa.
284
- 285 Espinel-Ingroff A, Cantón E, Peláez T, Pemán J. Comparison of micafungin MICs as
286 determined by the Clinical and Laboratory Standards Institute broth microdilution
287 method (M 27-A3) and E-test for *Candida* spp. isolates. *Diagn Microbiol Infect Dis*
288 2011; **70**: 54:59
289
- 290 Földi R, Kovács R, Gesztelyi R, Kardos G, Berényi R, Juhász B, Szilágyi J, Mózes J,
291 Majoros L. Comparison of *in vitro* and *in vivo* efficacy of caspofungin against *Candida*
292 *parapsilosis*, *C. orthopsilosis*, *C. metapsilosis* and *C. albicans*. *Mycopathologia* 2012;
293 DOI 10.1007/s11046-012-9554-7

- 294 Guarro J. Lessons from animal studies for the treatment of invasive human infections
295 due to uncommon fungi. *J Antimicrob Chemother* 2011; **66**: 1447:1466
296
- 297 Gutiérrez Urbón JM, Galeiras Vázquez R, Velasco Fernández D, Alvarez Rocha L.
298 Development of *Candida parapsilosis* candidemia during caspofungin therapy. *Farm*
299 *Hosp* 2011; **35**: 282-285
300
- 301 Kale-Pradhan PB, Morgan G, Wilhelm SM, Johnson LB. Comparative efficacy of
302 echinocandins for the treatment of *Candida parapsilosis* infection: a meta-analysis.
303 *Pharmacotherapy* 2010; **30**:1207:1213
304
- 305 Kartsonis N, Killar J, Mixson L, Hoe CM, Sable C, Bartizal K, Motyl M. Caspofungin
306 susceptibility testing of isolates from patients with esophageal candidiasis or invasive
307 candidiasis: relationship of MIC to treatment outcome. *Antimicrob Agents Chemother*
308 2005; **49**: 3616-3623
309
- 310 Mora-Duarte J, Betts R, Rotstein C, Colombo AL, Thompson-Moya L, Smietana
311 J, Lupinacci R, Sable C, Kartsonis N, Perfect J. Caspofungin Invasive
312 Candidiasis Study Group. Comparison of caspofungin and amphotericin B for
313 invasive candidiasis. *N Engl J Med* 2002; **19**: 2020-2029
314
- 315 Moudgal V, Little T, Boikov D, Vazquez JA. Multiechinocandins and multiazole-
316 resistant *Candida parapsilosis* isolates serially obtained during therapy for prosthetic
317 valve endocarditis. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; **49**: 767-769
318
- 319 Ortoneda M, Capilla J, Pastor FJ, Serena C, Guarro J. Interaction of granulocyte
320 colony-stimulating factor and high doses of liposomal amphotericin B in the treatment
321 of systemic murine scedosporiosis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2004; **50**: 247-251.
322
- 323 Pappas, P. G., C. A. Kauffman, D. Andes, D. K. Benjamin Jr., T. F. Calandra, J. E.
324 Edwards Jr., S. G. Filler, J. F. Fisher, B. Kullberg, L. Ostrosky-Zeichner, A. C. Reboli,
325 J. H. Rex, T. J. Walsh, J. D. Sobel. Clinical practice guidelines for the management
326 of candidiasis: 2009 update by the infections diseases society of America. *Clin Infect.*
327 *Dis* 2009; **48**: 503-535
328
- 329 Pfaller M A, Boyken L, Hollis R J, Kroeger J, Messer S A, Tendolkar S, Diekema D J.
330 *In vitro* susceptibility of invasive isolates of *Candida* spp, to anidulafungin,

- 331 caspogungin, and micafungin: six years of global surveillance. *J Clin Microbiol* 2008;
332 **46**: 150-156
333
334 Pfaller MA, Boyken L, Hollis RJ, Kroeger J, Messer SA, Tendolkar S, Jones
335 RN, Turnidge J, Diekema DJ. Wild type MIC distribution and epidemiological cutoff
336 values for the echinocandins and *Candida* spp. *J Clin Microbiol* 2010; **48**: 52-56
337
338 Pfaller M A & Diekema D J. Progress in antifungal susceptibility testing of *Candida*
339 spp. using Clinical and Laboratory Standards Institute broth microdilution methods,
340 2010-2012. *J Clin Microbiol* 2012; doi:10.1128/JCM.00937-12
341
342 Pfaller M A, Diekema D J, Andes D, Arendrup M C, Brown S D, Lockhart S R, Motyl
343 M, Perlin D S, and The CLSI Subcommittee for Antifungal Testing. Clinical
344 breakpoints for the echinocandins and *Candida* revisited: integration of molecular,
345 clinical, and microbiological data to arrive at species-specific interpretative criteria.
346 *Drug Resist Updat* 2011b; 14: 164-176
347
348 Pfaller M A, Moet G J, Messer S A, Jones R N, Castanheira M. *Candida* bloodstream
349 infections: comparison of species distributions and antifungal resistance patterns in
350 community-onset and nosocomial isolates in the SENTRY Antimicrobial Surveillance
351 Program, 2008-2009. *Antimicrob Agents Chemother* 2011a; **55**: 561-566
352
353 Salas V, Pastor F J, Calvo E, Mayayo E, Quindós G, Carrillo A J, Guarro J.
354 Anidulafungin in the treatment of experimental invasive infection by *Candida*
355 *parapsilosis*: *in vitro* activity, (1→3)-β-D-glucan and mannan serum levels,
356 histopathological findings, and *in vivo* efficacy. *Antimicrob Agents Chemother* 2011;
357 **55**: 561-566
358
359 Spreghini E, Orlando F, Tavanti A, Senesi S, Giannini D, Manso E, Barchiesi F. *In*
360 *vitro* and *in vivo* effects of echinocandins against *Candida parapsilosis* sensu stricto,
361 *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis*. *J Antimicrob Chemother* 2012;
362 doi:10.1093/jac/dks180
363
364 Trofa D, Gácsér A, Nosanchuk J D. *Candida parapsilosis*, an emerging fungal
365 pathogen. *Clin Microbiol Rev* 2008; **21**: 606-625
366 van Asbeck E C, Clemons K V, Stevens D A. *Candida parapsilosis*: a review of its
367 epidemiology, pathogenesis, clinical aspects, typing and antimicrobial susceptibility.
368 *Crit Rev Microbiol* 2009; **35**: 283-309

369 TABLE1: *In vitro* activity of caspofungin against 36 isolates of *C. parapsilosis*.

Strains	MIC (µg/ml)	IZD (mm)	MFC (µg/ml)
FMR 9544	0.5	15	>16
FMR 9613	0.25	16	4
FMR 9609	0.25	11	>16
FMR 9612	0.5	11	>16
FMR 9611	0.25	19	>16
FMR 9608	0.5	19	>16
FMR 9614	0.5	16	>16
FMR 9615	0.5	14	2
FMR 9610	0.5	15	2
FMR 9601	0.25	18	>16
FMR 10291	0.5	16	4
FMR 10292	0.5	21	2
FMR 11566	0.25	15	2
FMR 11573	0.5	14	>16
FMR 11571	1	17	4
FMR 10288	1	11	8
FMR 10289	1	11	>16
FMR 10296	0.25	20	4
FMR 11563	1	15	8
FMR 11769	0.5	16	2
FMR 10304	0.25	23	>16
FMR 11572	0.12	15	>16
FMR 10301	0.25	19	4
FMR 10293	0.5	13	0.5
FMR 10297	0.5	11	>16
FMR 10290	0.5	16	8
FMR 11565	0.5	19	4
FMR 11554	0.12	16	2
FMR 11562	1	11	4
FMR 11564	1	18	>16
FMR 10302	0.5	16	> 16
UTHSC 03-3108	1	17	8
UTHSC 07-3845	1	19	16
UTHSC 06-3476	1	15	4
UTHSC 07-2985	0.25	23	4
UTHSC 09-13	0.5	20	8
<i>C. parapsilosis</i> (ATCC 22019)	1	15	2

370
 371
 372
 373
 374
 375
 376
 377

378
 379
 380
 381
 382
 383
 384
 385
 386
 387
 388
 389
 390
 391
 392
 393
 394
 395
 396
 397
 398
 399
 400
 401
 402
 403
 404
 405
 406
 407
 408
 409
 410
 411
 412
 413
 414
 415
 416
 417
 418
 419
 420
 421
 422
 423
 424
 425
 426
 427
 428
 429
 430
 431
 432
 433
 434
 435

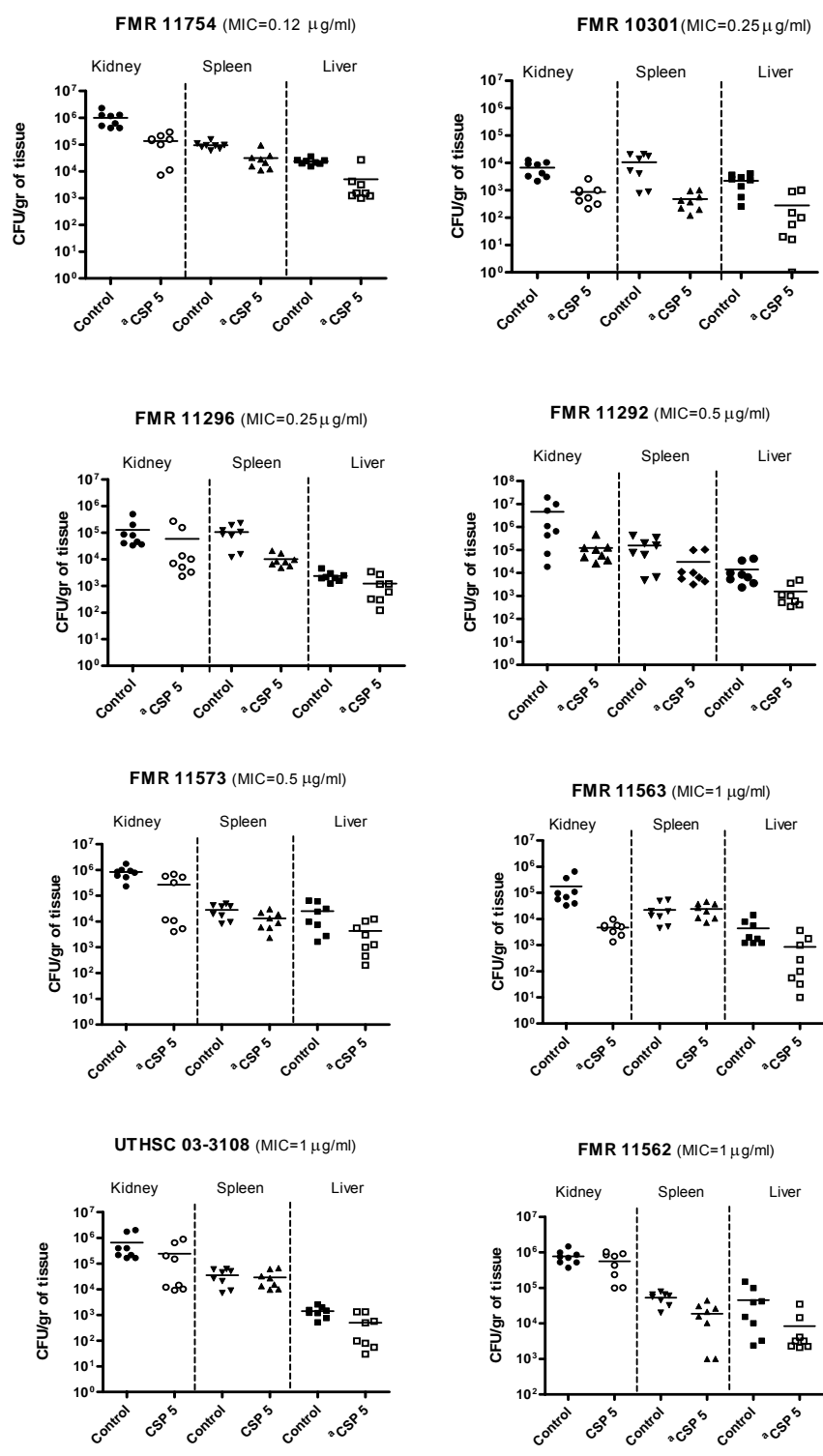


Figure 2: Effects of the caspofungin on the fungal load of kidneys, liver and spleen of neutropenic mice infected with several strains of *C. parapsilosis* CSP 5, caspofungin at 5 mg/kg Q.D $^aP < 0.05$ versus control group.

436
437
438
439
440
441
442
443
444
445
446
447
448
449
450
451
452
453
454
455
456

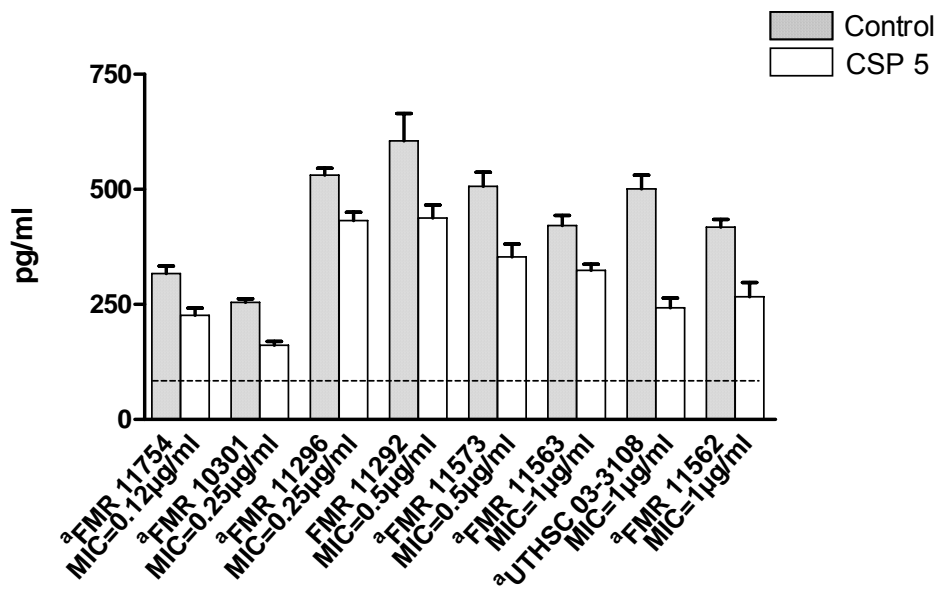


Figure 3: (1→3)-β-D-glucan serum concentrations in mice infected with *C. parapsilosis* measured at day 7 (final treatment). Horizontal line indicates the cut-off for positivity (80 pg/ml).

460
461
462
463
464
465
466
467
468
469
470
471
472
473
474
475
476
477
478
479
480
481

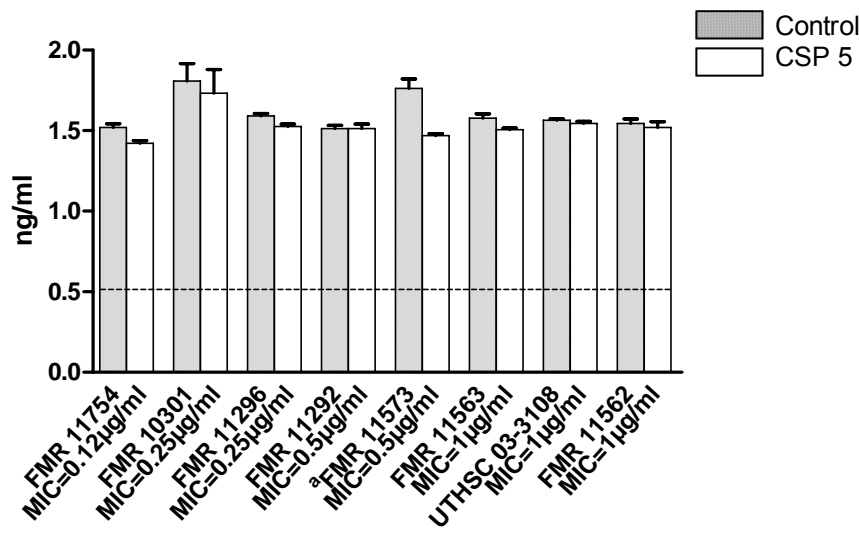


Figure 4: Mannan antigen serum levels in mice infected with *C. parapsilosis* measured at day 7 (final treatment). Horizontal line indicates the cut-off for positivity (0.5 ng/ml).

482
483
484
485
486
487
488

4.3. Actividad *in vitro* y eficacia *in vivo* del posaconazol en un modelo murino de infección diseminada causadas por aislados pertenecientes al complejo *Aspergillus terreus*.

***In vitro* activity and *in vivo* efficacy of posaconazole in treatment of murine infections by different isolates of the *Aspergillus terreus* complex.**

Salas V, Pastor FJ, Rodríguez MM, Calvo E, Mayayo E, Guarro J.

Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2011, 55: 676-679

In Vitro Activity and *In Vivo* Efficacy of Posaconazole in Treatment of Murine Infections by Different Isolates of the *Aspergillus terreus* Complex[∇]

Valentina Salas, F. Javier Pastor, M. M. Rodríguez, Enrique Calvo, Emilio Mayayo, and Josep Guarro*

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

Received 1 June 2010/Returned for modification 29 August 2010/Accepted 19 November 2010

Posaconazole (PSC) is an antifungal drug recommended as an alternative for the treatment of invasive aspergillosis in patients who are refractory or intolerant to primary antifungal therapy. We have evaluated the *in vitro* activity of PSC against 21 strains of the *Aspergillus terreus* complex using both broth microdilution and disk diffusion (Neo Sensitabs) methods. PSC showed the same high level of activity against all the strains with the two *in vitro* methods used. We developed a murine model of disseminated infection to evaluate the efficacy of PSC at 5, 10, or 20 mg/kg of body weight twice a day by using 6 different strains chosen randomly. PSC showed good efficacy, especially at 20 mg/kg, as measured by prolonged survival, tissue burden reduction, histopathology, and lowered galactomannan levels. The PSC levels in serum on the fourth day of treatment were higher than the MICs for the strains tested.

Invasive aspergillosis remains a major cause of morbidity and mortality in immunocompromised hosts and has become more common over the last few decades (2). The most common species causing invasive infections are *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus flavus*. However, *Aspergillus terreus* has also become an increasingly significant pathogen in recent years (1). Despite its toxicity, amphotericin B (AMB) has been the first choice for the treatment of invasive aspergillosis for many years. However, the intrinsic resistance of *A. terreus* to polyenes has been reported (7, 8, 15), and different data from previous *in vitro* and animal studies and clinical practice suggest that AMB is not an effective option for invasive *A. terreus* infections (7, 15, 16, 19). New treatment strategies, such as the use of expanded-spectrum triazoles like voriconazole (VRC) as a first-line treatment and posaconazole (PSC) as prophylaxis and salvage therapy, are recommended in clinical practice guidelines for invasive aspergillosis (18). There are a few reports of experiments on the efficacy of PSC in disseminated infections caused by *A. terreus* (7, 19). However, in such studies only one strain was tested, and as it is well known that the antifungal susceptibility of a given species can be strain dependent, the results of such studies cannot be considered conclusive. In this study we have tested a significant number of strains in order to determine if the putative susceptibility of *A. terreus* complex isolates to PSC can be generalized to most of the strains of this group. We have tested the *in vitro* activity of PSC using both broth microdilution and disk diffusion methods against a set of strains of the *A. terreus* complex, and we have evaluated the efficacy of such a drug against six randomly chosen strains in a neutropenic murine model of disseminated

infection in order to evaluate if the *in vitro* data are useful for predicting clinical outcomes.

MATERIALS AND METHODS

Twenty-one clinical strains of the *Aspergillus terreus* complex were used in the *in vitro* study (Table 1). Their susceptibilities to PSC were evaluated by using two methods: a broth microdilution method, performed according to CLSI guidelines for filamentous fungi (3), and a disk diffusion method, using nonsupplemented Mueller-Hinton agar and tablets (Neo Sensitabs; Rosco Diagnostica, Taastrup, Denmark) containing 5 µg of PSC (4). The MIC (µg/ml) and inhibition zone diameters (IZDs) (mm) were read at 24 and 48 h, respectively (3, 6). The suggested breakpoints for PSC against molds are as follows: susceptible, ≤1 µg/ml and ≥17 mm; intermediate, 2 µg/ml and 14 to 16 mm; and resistant, ≥4 µg/ml and ≤13 mm for MICs and IZDs, respectively (3, 5).

For *in vivo* studies, six randomly chosen strains of the *A. terreus* complex previously tested *in vitro* were used. They were FMR 8806, FMR 8754, FMR 8753, FMR 8759, FMR 8752, and FMR 10937.

The isolates were stored at –80°C, and prior to testing they were subcultured on potato dextrose agar (PDA) at 35°C. On the day of infection, cultures on PDA were suspended in sterile saline and filtered through sterile gauze to remove clumps of spores or hyphae. The resulting suspensions were adjusted to the desired inoculum based on hemocytometer counts and by serial plating onto PDA to confirm viability.

Male OF1 mice (Charles River, Criffa S.A., Barcelona, Spain) weighing 30 g were used in this study. Animals were housed under standard conditions. All animal care procedures were supervised and approved by the Universitat Rovira i Virgili Animal Welfare and Ethics Committee. Animals were immunosuppressed 1 day prior to infection by a single intraperitoneal (i.p.) injection of 200 mg/kg of body weight of cyclophosphamide (Genoxal; Laboratories Funk S.A., Barcelona, Spain), plus a single intravenous (i.v.) injection of 150 mg/kg of body weight of 5-fluorouracil (Fluorouracilo; Ferrer Farma S.A., Barcelona, Spain). This immunosuppression has demonstrated peripheral blood polymorphonuclear leukocyte (PMN) counts of <100 PMNs/ml from days 3 to 9 or later. Mice were challenged with 2×10^5 CFU in 0.2 ml of sterile saline, injected via the lateral tail vein. Preliminary experiments testing several strains demonstrated that this inoculum was appropriate for producing an acute infection, with 100% of the animals dying within 10 days (data not shown).

The drug assayed was PSC (Noxafil; Schering-Plough Ltd., Hertfordshire, United Kingdom), administered at 5, 10, or 20 mg/kg of body weight/dose twice a day (BID) by gavage. The efficacy of PSC was evaluated as prolonging survival in comparison to controls, by tissue burden reduction, by histopathological studies, and by determinations of galactomannan serum levels by an enzyme immunoassay. Treatments began 1 day after infection and lasted for 7 days. For survival studies, groups of 10 mice were randomly established for each strain and

* Corresponding author. Mailing address: Unitat de Microbiologia, Facultat de Medicina, Universitat Rovira i Virgili, Carrer Sant Llorenç 21, 43201 Reus, Spain. Phone: 977-759359. Fax: 977-759322. E-mail: josep.guarro@urv.cat.

[∇] Published ahead of print on 29 November 2010.

TABLE 1. *In vitro* activities of PSC against 21 isolates of the *Aspergillus terreus* complex

Strain	MIC ($\mu\text{g/ml}$)	IZD (mm)
FMR 8751	0.25	34.2
FMR 8752	0.25	29.3
FMR 8759	0.12	33.6
FMR 8805	0.25	33.6
FMR 8806	0.25	32.3
FMR 8300	0.25	32.7
FMR 8301	0.25	30
FMR 6581	0.25	29.3
FMR 8195	0.25	26
FMR 8380	0.25	27
FMR 8387	0.25	30.5
FMR 8753	0.12	28.7
FMR 8754	0.12	30.7
FMR 8755	0.25	30.2
FMR 8758	0.25	29
FMR 8761	0.25	28
FMR 8762	0.12	27
FMR 11214	0.12	26
FMR 10937	0.25	24
FMR 11215	0.25	29
FMR 11216	0.12	29.5
<i>Paecilomyces variotti</i> (ATCC 36257)	0.25	39

each treatment and checked daily for 30 days after challenge. Controls received no treatment. For tissue burden studies, groups of 10 mice were also established, and the animals were sacrificed on day 4 postinfection in order to compare the results with those for the controls. Lungs, kidneys, and brain were aseptically removed, and approximately half of each organ was weighed and homogenized in 1 ml of sterile saline. Serial 10-fold dilutions of the homogenates were plated onto PDA and incubated for 48 h at 35°C. The numbers of CFU/g of tissue were calculated. For the histopathology study, half of each organ 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, or Grocott methamine silver and examined in blinded fashion by light microscopy.

Groups of 5 immunosuppressed mice were challenged with strain FMR 8752 to determine the galactomannan serum levels (Platelia *Aspergillus*; Bio-Rad, Marnes la Coquette, France) on the seventh day of treatment. Galactomannan values were expressed as a galactomannan index (GMI), defined as the optical density of a sample divided by the optical density of a threshold serum provided in the test kit (14). Additionally, groups of 5 immunosuppressed mice were challenged with the same strain and treated with PSC at 5, 10, or 20 mg/kg BID to determine levels of this drug in serum by bioassay 4 h after drug administration on day 4 of therapy (13).

The mean survival time was estimated by the Kaplan-Meier method and compared among groups by using the log rank test. Colony counts from tissue burden studies were analyzed by using the Mann-Whitney U test.

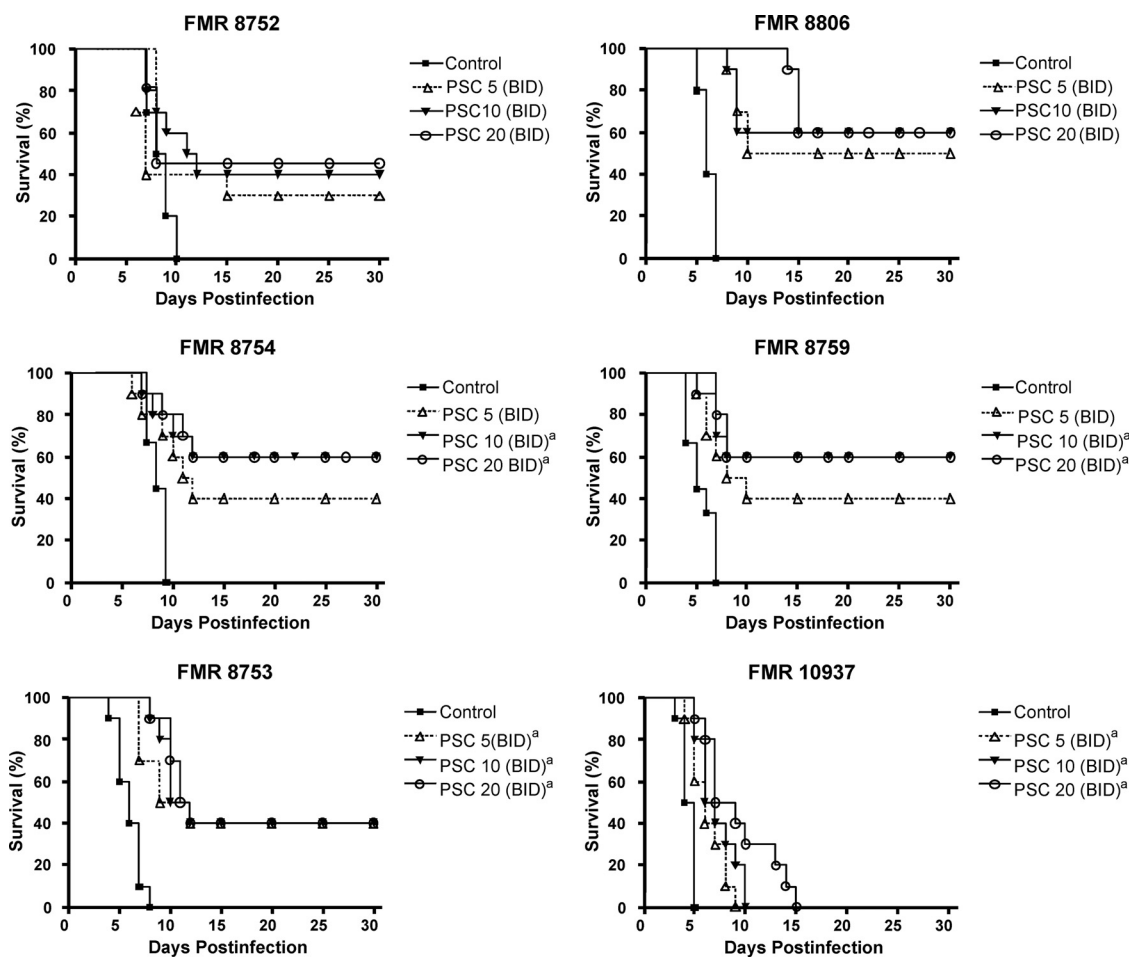


FIG. 1. Cumulative mortality of mice infected with 2×10^5 CFU of *A. terreus* complex isolates ($n = 10$ animals per group). (Top left) FMR 8752; (top right) FMR 8806; (middle left) FMR 8754; (middle right) FMR 8759; (bottom left) FMR 8753; (bottom right) FMR 10937. PSC 5, posaconazole at 5 mg/kg BID; PSC 10, posaconazole at 10 mg/kg BID; PSC 20, posaconazole at 20 mg/kg BID. ^a, $P < 0.05$ versus the control.

TABLE 2. Effects of PSC on colony counts of *A. terreus* in kidney, brain, and lung of mice^a

Strain and treatment	Mean log ₁₀ CFU/g of tissue (95% CI)		
	Kidney	Brain	Lung
FMR 8752			
None	4.49 (4.18–4.81)	3.48 (3.29–3.65)	3.39 (2.93–3.84)
PSC 5	2.63 (2.55–2.70) ^b	2.88 (2.33–3.43)	2.90 (2.45–3.35)
PSC 10	2.38 (2.17–2.60) ^b	2.53 (2.29–2.78) ^b	2.76 (2.60–2.92)
PSC 20	2.11 (1.99–2.23) ^{b,c}	1.82 (1.32–2.33) ^{b,c}	2.61 (2.35–2.87) ^b
FMR 8806			
None	2.62 (2.45–2.80)	2.58 (1.53–3.63)	2.88 (1.78–3.98)
PSC 5	2.32 (2.14–2.50) ^b	2.45 (1.49–3.40)	2.65 (1.98–3.32)
PSC 10	2.31 (2.10–2.52) ^b	1.58 (0.74–2.42)	2.22 (1.51–2.93)
PSC 20	1.89 (1.62–2.16) ^{b,c,d}	1.27 (0.47–2.06) ^{b,c}	1.74 (1.22–2.26) ^b
FMR 8754			
None	4.13 (3.91–4.35)	3.63 (3.14–4.12)	2.42 (1.70–3.15)
PSC 5	2.73 (2.15–3.31) ^b	2.65 (2.07–3.23) ^b	1.33 (0.78–1.89) ^b
PSC 10	1.76 (1.22–2.30) ^b	0.61 (0.11–1.11) ^{b,c}	0.83 (0.24–1.42) ^b
PSC 20	1.29 (0.71–1.88) ^{b,c}	0.40 (0.30–0.76) ^{b,c}	0.38 (0.07–0.68) ^{b,c}
FMR 8759			
None	4.21 (4.02–4.40)	3.98 (3.53–4.43)	3.23 (2.43–4.03)
PSC 5	3.16 (2.16–3.71)	3.18 (2.60–3.75) ^b	2.39 (1.70–3.08)
PSC 10	1.90 (1.10–2.71) ^b	1.01 (0.33–1.69) ^{b,c}	1.25 (0.34–2.16) ^{b,c}
PSC 20	1.97 (1.37–2.56) ^{b,c}	0.40 (0.30–0.76) ^{b,c}	1.11 (0.32–1.89) ^{b,c}
FMR 8753			
None	2.99 (1.77–4.20)	3.98 (3.72–4.23)	3.21 (2.25–4.16)
PSC 5	2.27 (1.83–2.71)	3.07 (2.29–3.86)	2.48 (1.68–3.29)
PSC 10	1.76 (1.20–2.32)	0.80 (0.06–1.54) ^{b,c}	1.18 (0.51–1.85) ^{b,c}
PSC 20	1.63 (1.14–2.12)	0.62 (0.02–1.22) ^{b,c}	1.23 (0.53–1.94) ^{b,c}
FMR 10937			
None	3.39 (2.93–3.85)	4.08 (3.99–4.17)	3.41 (2.92–3.90)
PSC 5	2.88 (2.45–3.31)	4.00 (3.87–4.13)	2.82 (2.48–3.17)
PSC 10	2.56 (2.31–2.86) ^b	3.24 (2.82–3.67) ^{b,c}	1.11 (0.53–1.65) ^{b,c}
PSC 20	2.23 (1.65–2.80) ^{b,c}	2.57 (1.90–3.24) ^{b,c,d}	0.81 (0.28–1.35) ^{b,c}

^a *n* = 10 animals per group. PSC 5, posaconazole at 5 mg/kg BID; PSC 10, posaconazole at 10 mg/kg BID; PSC 20, posaconazole at 20 mg/kg BID; CI, confidence interval.

^b *P* < 0.05 versus control.

^c *P* < 0.05 versus PSC at 5 mg/kg BID.

^d *P* < 0.05 versus PSC at 10 mg/kg BID.

RESULTS

The results for antifungal *in vitro* susceptibility are shown in Table 1. PSC showed a high level of activity against all strains of the *A. terreus* complex tested, with both MIC and IZD values being included in the suggested ranges of susceptibility, i.e., all the strains showed MICs of ≤1 µg/ml and IZDs of ≥17 mm.

Figure 1 shows the efficacy of PSC in prolonging the survival of mice. For all strains, PSC at 10 or 20 mg/kg significantly prolonged survival with respect to the control group. Moreover, PSC at 5 mg/kg also significantly prolonged survival with respect to the untreated group for two of the strains assayed. For all the strains the rate of survival ranged between 40% and 60% at the end of assay, with the exception of strain FMR 10937, which produced 100% mortality.

In general, PSC at either 10 or 20 mg/kg BID was able to significantly reduce the fungal load in all organs tested (Table 2). For all strains, PSC at 20 mg/kg was the most effective treatment in reducing the fungal load in kidneys, lungs, and brain with respect to the control group, and in some cases, with respect to the other PSC regimens, PSC at 5 mg/kg BID was clearly less effective.

Galactomannan serum levels were significantly lower in

mice treated with any regimen of PSC than in controls animals (Fig. 2). The galactomannan concentration in serum at day 7 of the experiment was significantly lower in animals treated with 20 mg/kg PSC BID than in those treated with 5 mg/kg PSC BID.

PSC serum levels were as follows: the drug concentration in serum for treatment with 5 mg/kg PSC BID was 2.56 ± 0.93 µg/ml, that for treatment with 10 mg/kg PSC BID was 5.65 ± 0.62 µg/ml (*P* < 0.05 versus PSC at 5 mg/kg BID), and that for treatment with 20 mg/kg PSC BID was 6.45 ± 0.28 µg/ml (*P* < 0.05 versus PSC at 5 mg/kg BID; *n* = 5 animals per group). All serum concentrations were higher than the PSC MIC for the strain tested. No statistically significant differences were found between the serum levels obtained with PSC at 10 mg/kg and those obtained with PSC at 20 mg/kg, with these levels being significantly higher than those obtained with PSC at 5 mg/kg.

In untreated controls and in mice treated with PSC at 5 mg/kg BID, the histological study showed kidney, lung, and brain fungal invasion, with signs of necrosis in kidney and brain and the presence of interstitial edema in lung tissue. Neither tissue lesions nor fungal invasion was observed for sections of organs from mice treated with PSC at 10 or 20 mg/kg BID (Fig. 3).

DISCUSSION

At present, PSC is considered an alternative for the treatment of patients with invasive aspergillosis that is refractory or intolerant to primary antifungal therapy (18). We have evaluated the effectiveness of PSC against a relative large number of strains of the *A. terreus* complex, which is unusual in this type of study, where only a single strain is generally tested.

In previous studies, a good *in vitro* activity of PSC against *A. terreus* was demonstrated (9, 12). In this study, excellent correlation was found between the *in vitro* results obtained with microdilution and disk diffusion methods, suggesting that the disk diffusion method could be a good alternative for determining the susceptibility of PSC, due to its simplicity, low cost, and high reproducibility.

So far, the efficacy of PSC for the treatment of experimental infections by *A. terreus* has been evaluated by only two studies (7, 19). Using a rabbit model, Walsh et al. (19) demonstrated

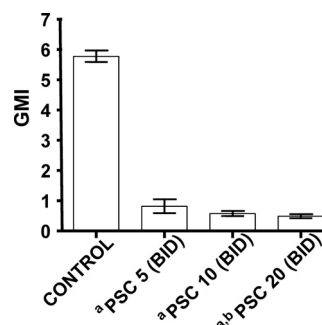


FIG. 2. Galactomannan serum levels in *A. terreus*-infected mice measured on day 7 (final treatment) (*n* = 5 animals per group). PSC 5, posaconazole at 5 mg/kg BID; PSC 10, posaconazole at 10 mg/kg BID; PSC 20, posaconazole at 20 mg/kg BID. ^a, *P* < 0.05 versus control; ^b, *P* < 0.05 versus PSC 5. GMI, galactomannan index.

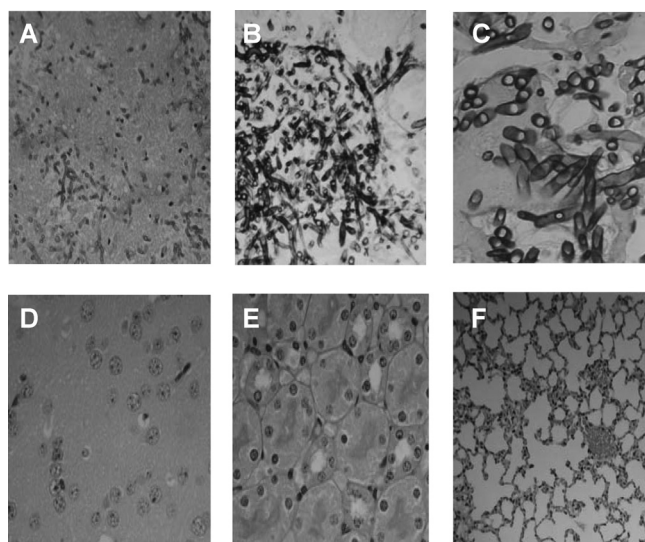


FIG. 3. Histopathology of brain, lungs, and kidneys of neutropenic mice infected by *A. terreus* and treated with PSC. (A to C) Brain (PAS stain) (magnification, $\times 300$) (A), kidney (Grocott stain) (magnification, $\times 300$) (B), and lung (Grocott stain) (magnification, $\times 450$) (C) sections from untreated mice or mice treated with 5 mg/kg BID showing tissue invasion by hyphae. (D to F) Brain (PAS stain) (magnification, $\times 300$) (D), kidney (PAS stain) (magnification, $\times 300$) (E), and lung (PAS stain) (magnification, $\times 300$) (F) of mice treated with 20 mg/kg BID showing the absence of fungal elements and the absence of an inflammatory response.

the efficacy of PSC at 20 mg/kg. Graybill et al. (7), using a murine model similar to the one used in the current study, demonstrated the efficacy of PSC at 40 mg/kg in prolonging survival and reducing the fungal load in spleen and lungs. However, those authors tested only one strain and did not evaluate other PSC dosages. We have demonstrated the efficacy of PSC at 10 and 20 mg/kg BID in prolonging mouse survival and in reducing fungal burden in brain, kidneys, and lungs against infections by six strains, which indicated a generally good response of the members of the *A. terreus* complex to PSC. An interesting finding of the present study was the relationship between the *in vivo* results, the PSC serum levels, and the dose-related reduction of serum galactomannan levels obtained. The latter test is a useful criterion of aspergillosis morbidity and a marker of clinical antifungal efficacy and prognosis (10, 11, 14). We have confirmed that this test is a good marker of fungal tissue burden in experimental invasive aspergillosis infections (17).

In summary, our study has shown the high level of *in vitro* activity and good efficacy of PSC against experimental invasive infections by different isolates of the *A. terreus* complex. Further studies are warranted to assess the potential use of PSC as

a primary option for the treatment of human *A. terreus* infections.

REFERENCES

- Blum, G., et al. 2008. A 1-year *Aspergillus terreus* surveillance study at the University Hospital of Innsbruck: molecular typing of environmental and clinical isolates. *Clin. Microbiol. Infect.* **12**:1146–1151.
- Chandrasekar, P. 2009. Invasive mold infections: recent advances in management approaches. *Leuk. Lymphoma* **50**:703–715.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. 2008. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. Approved standard, 2nd ed. Document M38-A2. CLSI, Wayne, PA.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. 2009. Method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of filamentous fungi; proposed guideline. Document M51-P. CLSI, Wayne, PA.
- Espinel-Ingroff, A., et al. 2007. Multicenter evaluation of a new disk agar diffusion method for susceptibility testing of filamentous fungi with voriconazole, posaconazole, itraconazole, amphotericin B, and caspofungin. *J. Clin. Microbiol.* **45**:1811–1820.
- Espinel-Ingroff, A., and E. Canton. 2008. Comparison of Neo-Sensitabs tablet diffusion assay with CLSI broth microdilution M38-A and disk diffusion methods for testing susceptibility of filamentous fungi with amphotericin B, caspofungin, itraconazole, posaconazole, and voriconazole. *J. Clin. Microbiol.* **46**:1793–1803.
- Graybill, J. R., S. Hernandez, R. Bocanegra, and L. K. Najvar. 2004. Antifungal therapy of murine *Aspergillus terreus* infection. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**:3715–3719.
- Hachem, R. Y., et al. 2004. *Aspergillus terreus*: an emerging amphotericin B-resistant opportunistic mold in patients with hematologic malignancies. *Cancer* **101**:1594–1600.
- Lass-Flörl, C., A. Alastruey-Izquierdo, M. Cuenca-Estrella, S. Perkhofor, and J. L. Rodríguez-Tudela. 2009. *In vitro* activities of various antifungal drugs against *Aspergillus terreus*: global assessment using the methodology of the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**:794–795.
- Marr, K. A., et al. 2004. Detection of galactomannan antigenemia by enzyme immunoassay for the diagnosis of invasive aspergillosis: variables that affect performance. *J. Infect. Dis.* **190**:641–649.
- Petraitiene, R., et al. 2001. Antifungal activity and pharmacokinetics of posaconazole (SCH 56592) in treatment and prevention of experimental invasive pulmonary aspergillosis: correlation with galactomannan antigenemia. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**:857–869.
- Pfaller, M. A., et al. 2008. *In vitro* survey of triazole cross-resistance among more than 700 clinical isolates of *Aspergillus* species. *J. Clin. Microbiol.* **46**:2568–2572.
- Rodríguez, M. M., et al. 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.
- Sionov, E., S. Mendlovic, and E. Segal. 2006. Efficacy of amphotericin B-intralipid in combination with caspofungin against experimental aspergillosis. *J. Infect.* **53**:131–139.
- Steinbach, W. J., et al. 2004. Infections due to *Aspergillus terreus*: a multicenter retrospective analysis of 83 cases. *Clin. Infect. Dis.* **39**:192–198.
- Steinbach, W. J., J. R. Perfect, W. A. Schell, T. J. Walsh, and D. K. Benjamin, Jr. 2004. *In vitro* analyses, animal models, and 60 clinical cases of invasive *Aspergillus terreus* infection. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**:3217–3225.
- Vallor, A. C., et al. 2008. Assessment of *Aspergillus fumigatus* burden in pulmonary tissue of guinea pigs by quantitative PCR, galactomannan enzyme immunoassay, and quantitative culture. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**:2593–2598.
- Walsh, T. J., et al. 2008. Treatment of aspergillosis: clinical practice guidelines of the Infectious Diseases Society of America. *Clin. Infect. Dis.* **46**:327–360.
- Walsh, T. J., et al. 2003. Experimental pulmonary aspergillosis due to *Aspergillus terreus*: pathogenesis and treatment of an emerging fungal pathogen resistant to amphotericin B. *J. Infect. Dis.* **188**:305–331.

4.4. Los valores de las concentraciones mínimas inhibitorias del voriconazol son predictivas de los resultados *in vivo* en el tratamiento experimental de infecciones causadas por especies del complejo *Aspergillus terreus* en el ratón.

Minimal concentration inhibitory values of voriconazole are predictive of treatment results in murine infections by *Aspergillus terreus* species complex.

Salas V, Pastor FJ, Sutton DA, Calvo E, Mayayo E, Fothergill AW, Rinaldi MG, Guarro J.

Enviado a la revista Antimicrobial Agents and Chemotherapy

1 **Minimal Inhibitory Concentration values of voriconazole are predictive of**
2 **treatment results in murine infections by *Aspergillus terreus* species**
3 **complex**

4
5
6
7 Valentina Salas¹, F. Javier Pastor¹, Deanna A. Sutton², Enrique Calvo¹, Emilio
8 Mayayo³, Anette W. Fothergill², Michael G. Rinaldi², and Josep Guarro^{1*}

9
10
11

12 1) Unitat de Microbiologia, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, IISPV,
13 Universitat Rovira i Virgili, Reus, Spain, 2) Fungus Testing Laboratory University of
14 Texas Health Science Center, San Antonio, Texas, 3) Unitat de Anatomia Patològica,
15 Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, IISPV, Universitat Rovira i Virgili, Reus,
16 Spain.³

17
18

19 Abstract: 153 words

20 Text: 1604 words

21

22 Keywords: Antifungal, voriconazole, animal models, fungal infections, *Aspergillus*
23 *terreus*

24 Running title: voriconazole against *A. terreus*

25

26

27 *Corresponding author. Mailing address: Unitat de Microbiologia, Facultat de
28 Medicina, Universitat Rovira i Virgili. Carrer Sant Llorenç, 21. 43201 Reus, Spain.

29 Phone 977-759359. Fax: 977-759322. E-mail: josep.guarro@urv.cat

30

31

32

33 **ABSTRACT**

34 To assess if *in vitro* data can be predictive of *in vivo* outcome, we have evaluated the
35 *in vivo* activity of voriconazole against a set of clinical isolates of the *Aspergillus*
36 *terreus* species complex with different degrees of susceptibility to this drug. The
37 efficacy of voriconazole at 25 mg/kg day was tested against nine strains of *A. terreus*
38 species complex with different MICs (0.12 - 4 µg/ml), using a neutropenic murine
39 model of disseminated infection. Markers of efficacy were: prolonging the survival of
40 the mice, reducing tissue burden, reducing the levels of galactomannan antigenemia
41 and the concentration of drug serum. In general, voriconazole was effective against all
42 the isolates tested, especially in prolonging survival and reducing the fungal load in
43 infections by strains that showed MICs ≤ epidemiological cut-off value (ECV) (1
44 µg/ml). The results suggest that the voriconazole *in vitro* data might be useful for
45 predicting the outcome of *A. terreus* infections.

46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
66

67 **Introduction**

68 Invasive aspergillosis is a serious, frequently fatal fungal infection that mainly affects
69 immunocompromised patients (1). Although *Aspergillus fumigatus* and *A. flavus* are
70 the most common species associated with invasive infections, other species, such as
71 some of the *A. terreus* complex, have become increasingly important in recent years
72 (8). Voriconazole is the recommended drug for invasive aspergillosis treatment (24)
73 but, despite its use, clinical failures are frequent (19). Although still uncommon,
74 several studies have reported the emergence of isolates of *Aspergillus* that are
75 resistant to voriconazole (23), and whose association with clinical failure has been
76 demonstrated at least for *A. fumigatus* infections (6). The development of clinical
77 breakpoints for moulds would be useful for predicting outcomes of fungal infections
78 but only tentative cut-offs based on *in vitro* data currently exist. Epidemiological cut-off
79 values (ECV) were proposed recently for several *Aspergillus* spp., including *A.*
80 *terreus*, and those isolates showing MICs higher than ECV may have, theoretically,
81 acquired mechanisms of resistance (3, 15). The ECV reported for voriconazole
82 against isolates of *A. terreus* is 1 µg/ml (3).

83 We have evaluated the *in vivo* efficacy of voriconazole in the treatment of invasive
84 murine infection by *A. terreus* species complex, testing clinical isolates with different
85 MICs, including strains with MICs \geq ECV, in order to assess if the *in vitro* data
86 correlates with the antifungal drug efficacy.

87 **Materials and methods**

88 We tested nine isolates belonging to the *A. terreus* species complex with voriconazole
89 MICs ranging from 0.12 to 4 µg/ml, previously evaluated using a broth microdilution
90 method carried out according to the CLSI guidelines for filamentous fungi (2). They
91 were: two strains with MICs = 0.12 µg/ml; two strains with MICs = 0.25 µg/ml; two
92 strains with MICs = 0.5 µg/ml; one strain with MIC = 1 µg/ml; one strain with MIC = 2
93 µg/ml; and one strain with MIC = 4 µg/ml. Male OF1 mice (Charles River, Criffa S.A.,

94 Barcelona, Spain) each weighing 30 g were used in this study. Animals were housed
95 under standard conditions. All animal care procedures were supervised and approved
96 by the Universitat Rovira i Virgili Animal Welfare and Ethics Committee. Animals were
97 immunosuppressed 1 day prior to infection by a single intraperitoneal (i.p.) injection of
98 200 mg/kg of cyclophosphamide (Genoxal; Laboratories Funk S.A., Barcelona,
99 Spain), plus a single intravenous (i.v.) injection of 150 mg/kg of body weight of 5-
100 fluorouracil (Fluorouracilo; Ferrer Farma S.A., Barcelona, Spain). Mice were challenged
101 with 2×10^5 CFU in 0.2 ml of sterile saline, injected via the lateral tail vein. Preliminary
102 experiments demonstrated that this inoculum was appropriate for producing an acute
103 infection, with 100% of the animals dying within 13 days (data not shown).

104 Voriconazole (Vfend; Pfizer S.A., Madrid, Spain) was administered at 25 mg/kg of
105 body weight/dose once a day orally by gavage (25). From 3 days before infection, the
106 mice that received voriconazole were given grapefruit juice instead of water (20). To
107 prevent bacterial infection, all animals received ceftazidime at 5 mg/kg
108 subcutaneously once daily. The efficacy of voriconazole was evaluated as prolonging
109 survival of mice in comparison to controls, tissue burden reduction, and by reduction
110 of galactomannan serum levels by enzyme immunoassay. Treatments began one day
111 after infection, and lasted for 7 days. For survival studies, groups of 8 mice were
112 randomly established for each strain and each treatment and checked daily for 30
113 days after challenge. Controls received no treatment. For tissue burden studies,
114 groups of 8 mice were also established and the animals were sacrificed on day 5 post-
115 infection in order to compare the results with controls. Kidneys and brains were
116 aseptically removed and homogenized in 1 ml of sterile saline. Serial 10-fold dilutions
117 of the homogenates were plated on PDA and incubated for 48 h at 35°C. The
118 numbers of CFU/g of tissue were calculated.

119 Additionally, before being sacrificed, approximately 1 ml of blood from each mouse
120 belonging to the tissue burden groups was extracted by cardiac puncture. Pooled
121 serum samples from mice of each treatment group infected by each strain were used

122 to determine the drug concentration in serum by bioassay 4 h after drug administration
123 (10,16) and the galactomannan levels by enzyme immunoassay (Platelia *Aspergillus*[®],
124 Bio Rad, Marmes, la Coquette, France) as a marker of the treatment response.
125 Values were expressed as a galactomannan index (GMI) defined as the optical
126 density of a sample divided by the optical density of a threshold serum provided in the
127 test kit.

128 The Kaplan-Meier method and log rank test were used for survival studies.
129 Differences were considered statistically significant at $p < 0.05$. When multiple
130 comparisons were carried out, the Bonferroni correction was used to avoid an
131 increase in type I error. The tissue burden studies were analyzed using the Mann-
132 Whitney U test. The Kolmogorov-Smirnov test was carried out to determine the normal
133 distribution of the galactomannan serum levels and bioassay data so that they could
134 be analysed using the T-test.

135 **Results**

136 Figure 1 shows the results of survival studies. For all strains, voriconazole significantly
137 prolonged survival with respect to the control group. For the two strains with the
138 lowest voriconazole MICs (0.12 $\mu\text{g/ml}$) survival was 100%. For the other strains with
139 MICs $\leq 1 \mu\text{g/ml}$ the survival rate of animals treated ranged from 50 to 60%. The
140 survival of mice infected with the strain with MICs = 2 $\mu\text{g/ml}$ was 25%, and 0% in
141 those infected with the strain with highest MIC (4 $\mu\text{g/ml}$). In general, voriconazole was
142 significantly better in prolonging survival in the groups of mice infected with strains
143 with lower MICs ($\leq 1 \mu\text{g/ml}$) than those groups infected with isolates that showed
144 MICs $\geq 2 \mu\text{g/ml}$ ($p < 0.05$) (Figure 1).

145 Voriconazole was able to reduce the fungal load significantly in both organs tested of
146 the animals challenged with isolates with MICs $\leq 1 \mu\text{g/ml}$ when compared to untreated
147 groups and, in general, with respect to the groups infected with strains with MICs ≥ 2
148 $\mu\text{g/ml}$. For the strain with MIC = 2 $\mu\text{g/ml}$ voriconazole only reduced the fungal load in

149 kidneys, and for the strain with MIC = 4 µg/ml there were no significant differences
150 with respect to the control group in any of the organs studied (Figures 2,3).

151 The serum concentration of voriconazole at day 5 of the experiment was 7.01 ± 2.82
152 µg/ml. All serum concentrations were higher than the corresponding MICs for the
153 strains tested (data not shown). Galactomannan serum levels were significantly lower
154 in mice treated with voriconazole than in controls, but in all cases, the galactomannan
155 serum levels were above the cut-off for positivity (GMI > 1,5) (18) (Figure 4).

156 **Discussion**

157 Little is known about the antifungal drug resistance of *Aspergillus* spp. and its
158 association with treatment failure because good correlation has not yet been
159 established between MICs and clinical outcome (12, 9). In the absence of clinical
160 data, establishing ECV for several *Aspergillus* species (3) together with the results of
161 animal studies might contribute to the development of clinical breakpoints for
162 *Aspergillus* spp. and azoles. To our knowledge, this is the first study to explore the
163 possible relationship between the MIC values for voriconazole and the outcomes of
164 murine experimental infections by isolates of *A. terreus* species complex. We used an
165 immunosuppressed model of disseminated infection by such fungi. With the
166 immunosuppressive regimen used here, previous studies demonstrated that the
167 peripheral blood polymorphonuclear leukocyte counts were < 100/ml from day 3 to
168 day 9 or later (4, 13). Several experimental studies with *A. fumigatus* (7, 22) have
169 shown efficacy of voriconazole, but this drug against *A. terreus* has not been tested so
170 far in animal models (5). This study demonstrates that although voriconazole is able to
171 significantly improve the survival of animals infected with all strains tested, better
172 survival rates (100%) were obtained in those mice infected with the strains having the
173 lowest MICs (0.12 µg/ml). Likewise the efficacy of voriconazole was poor in reducing
174 the fungal load in brain of mice infected with the strains with MICs > 1 µg/ml.

175 Our data on galactomannan serum levels show that, in general, voriconazole worked
176 well against all the strains of *A. terreus* tested, although in most cases the GMI was
177 still above the threshold considered positive for invasive aspergillosis in mice (18).
178 This could be due to the fact that voriconazole shows time-dependent fungicidal
179 activity against some species of *Aspergillus* (11, 21) and a longer period of treatment
180 might be required to better estimate the usefulness of this marker as indicative of drug
181 efficacy. In a previous study, we demonstrated that galactomannan levels of mice
182 infected with *A. terreus* and treated with posaconazole were negative at day 7 of the
183 experiment (17). In the present study we only tested one dose of voriconazole. We
184 chose the dose of 25 mg/kg based on a previous pharmacokinetic study that
185 demonstrated that this dose produced high plasma levels in mice and were higher
186 than those found in human plasma after therapeutic doses (25). We did not evaluate
187 other doses of voriconazole because the serum concentration of voriconazole with
188 that dose was $\geq 4.8 \mu\text{g/ml}$ in all the cases.

189 We demonstrated that there are important differences in the *in vivo* response of the
190 isolates of *A. terreus* depending on the *in vitro* activity, MICs \leq ECV usually being
191 more predictive of *in vivo* success. Although there are only approximately a 3% of the
192 clinical isolates with voriconazole MICs $>$ ECV (14), this parameter might be important
193 in predicting drug failure in clinical practice. In order to determine with most accuracy
194 which MICs correlate better with clinical efficacy, it would be interesting in future
195 studies to refine these results by testing more strains that represent the broadest
196 possible range of MICs.

197 **Transparency declarations**

198 The authors declare no conflicts of interest

199

200

201

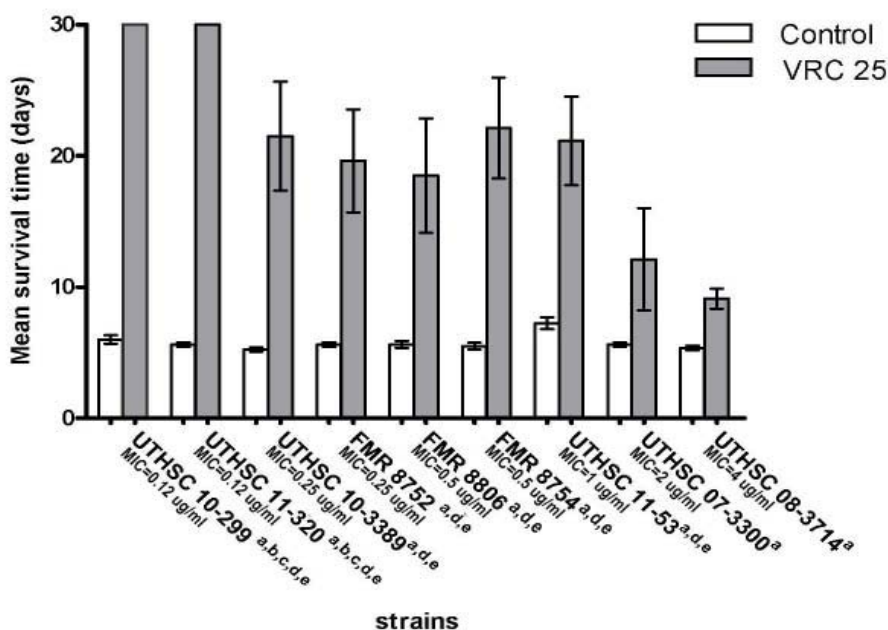
202 **References**

- 203 **1. Chandrasekar, P. H., J. Cutright, E. Manuvathu.** 2000. Efficacy of voriconazole
204 against invasive pulmonary aspergillosis in a guinea-pig model. *J. Antimicrob.*
205 *Chemother.* **45**: 673-676.
206
- 207 **2. Clinical and Laboratory Standards Institute.** 2008. Reference method for broth
208 dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. Approved standard-second
209 edition. Document M38-A2. CLSI, Wayne, Pa.
210
- 211 **3. Espinel-Ingroff, A., D. J. Diekema, A. Fothergill, E. Johnson, T. Pelaez, M. A.**
212 **Pfaller, M. G. Rinaldi, E. Cantón, J. Turnidge.** 2010. Wild-type MIC distributions and
213 epidemiological cutoff values for the triazoles and six *Aspergillus* spp. for the CLSI
214 broth microdilution method (M38-A2 document). *J. Clin. Microbiol.* **48**: 3251-3257.
215
- 216 **4. Graybill, J. R., R. Bocanegra, L. K. Najvar, D. Loenbenberg, M. F. Luther.**
217 1998. Granulocyte colony-stimulating factor and azole antifungal therapy in murine
218 aspergillosis: role of immune suppression. *Antimicro. Agents Chemother.* **42**: 2467-
219 2473.
220
- 221 **5. Guarro, J.** 2011. Lessons from animal studies for the treatment of invasive human
222 infections due to uncommon fungi. *J. Antimicrob. Chemother.* **66**: 1447:1466.
223
- 224 **6. Howard, S. J., D. Cerar, J. Anderson, A. Albarrag, M. C. Fisher, A. C.**
225 **Pasqualotto, M. Laverdiere, M. C. Arendrup, D. S. Perlin, D. W. Denning.** 2009.
226 Frequency and evolution of azole resistance in *Aspergillus fumigatus* associated with
227 treatment failure. *Emerg. Infect. Dis.* **15**: 1068-1676.
228
- 229 **7. Kirkpatrick, W. R., R. K. Mc Atee, A. W. Fothergill, M. G. Rinaldi, T. F.**
230 **Patterson.** 2000. Efficacy of voriconazole in a guinea pig model of disseminated
231 invasive aspergillosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**: 2865-2868.
232
- 233 **8. Lass-Flörl, C., K. Griff, A. Mayr, A. Petzer, G. Gastl, H. Bonatti, M. Freund, G.**
234 **Kropshofer, M. P. Dierich, D. Nachbaur.** 2005. Epidemiology and outcome of
235 infections due to *Aspergillus terreus*: 10-year single centre experience. *Br. J.*
236 *Haematol.* **131**: 201-207.

- 237 **9. Lass-Flörl, C., S. Perkhofe**r. 2008. *In vitro* susceptibility-testing in *Aspergillus*
238 species. *Mycoses* **51**: 437-446.
239
- 240 **10. Majithiya, J., A. Sharp, A. Parmar, D. W. Denning, P. A. Warn.** 2009. Efficacy
241 of isavuconazole, voriconazole and fluconazole in temporally neutropenic murine
242 model of disseminated *Candida tropicalis* and *Candida krusei*. *J. Antimicrob.*
243 *Chemother.* **63**: 161-166.
244
- 245 **11. Manavathu, E. K., J. L. Cutright, P. H. Chandrasekar.** 1998. Organism-
246 dependent fungicidal activities. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**: 3018-3021.
- 247 **12. Nucci, M., J. R. Perfect.** 2008. When primary antifungal therapy fails. *Clin. Infect.*
248 *Dis.* **46**: 1426-1433.
249
- 250 **13. Ortoneda, M., J. Capilla, F. J. Pastor, C. Serena, J Guarro.** 2004. Interaction of
251 granulocyte colony-stimulating factor and high doses of liposomal amphotericin B in
252 the treatment of systemic murine scedosporiosis. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **50**:
253 247–251.
254
- 255 **14. Pfaller, M. A., R. Boyken, J. Hollis, J. Kroeger, S. Messer, S. Tendolkar, D.**
256 **Diekema.** 2011. Use of epidemiological cutoff values to examine 9 year trends in
257 susceptibility of *Aspergillus* species to triazoles. *J. Clin. Microbiol.* **49**: 586-590.
258
- 259 **15. Pfaller, M. A., D. J. Diekema, M. A., Ghannoum, J. H. Rex, B. D. Alexander, D.**
260 **Andes, S. D. Brown, V. Chaturvedi, A. Espinell-Ingroff, C. L. Fowler, E.M.**
261 **Johnson, C. C. Knapp, M. R. Motyl, L. Ostroski-Zeichner, D. J. Sheehan, T. J.**
262 **Walsh, Clinical and Laboratory Standards Institute Antifungal Testing**
263 **Subcommittee.** 2009. Wild type distribution and epidemiological cutoff values for
264 *Aspergillus fumigatus* and three triazoles as determined by the Clinical and Laboratory
265 Standard Institute broth microdilution methods. *J. Clin. Microbiol.* **47**: 3142-3146.
266
- 267 **16. Rodríguez. M. M., E. Calvo, C. Serena, M. Mariné, F. J. Pastor, J. Guarro.**
268 2009. Effects of double and triple combinations of antifungal drugs in a murine model
269 of disseminated infection by *Scedosporium prolificans*. *Antimicrob. Agents*
270 *Chemother.* **53**: 2153-2155.
271
- 272 **17. Salas, V., F. J. Pastor, M. M. Rodríguez, E. Calvo, E. Mayayo, J. Guarro.**
273 2011. *In vitro* activity and *in vivo* efficacy of posaconazole in the treatment of murine

- 274 infections by different isolates of the *Aspergillus terreus* complex.
275 Antimicrob. Agents Chemother. **55**: 676-679.
276
- 277 **18. Sionov, E., S. Mendlovic, E. Segal.** 2005. Experimental systemic murine
278 aspergillosis: treatment with polyene and caspofungin combination and G-CSF. J.
279 Antimicrob. Chemother. **56**: 594-597.
280
- 281 **19. Smith. J., D. Andes.** 2008. Therapeutic drug monitoring of antifungal:
282 pharmacokinetic and pharmacodynamic consideration. Ther. Drug. Monit. **30**: 167-
283 172.
284
- 285 **20. Sugar, A. M., X. P. Liu.** 2000. Effect of grapefruit juice on serum voriconazole
286 concentration in the mouse. Med. Mycol. **38**: 209-212.
287
- 288 **21. Theuretzbacher, U., F. Ihle, H. Derendorf.** 2006.
289 Pharmacokinetic/pharmacodynamic profile of voriconazole. Clin. Pharmacokinet. **45**:
290 649-663.
291
- 292 **22. van de Sande, W. W., R. A. Mathot, M. T. ten Kate, W. van Vianen, M. Tavakol,**
293 **B. J. Rijnders, I. A. Bakker- Woudenberg.** 2009. Combination therapy of advanced
294 invasive pulmonary aspergillosis in transiently neutropenic rats using human
295 pharmacokinetic equivalent doses of voriconazole and anidulafungin. Antimicrob.
296 Agents Chemother. **53**: 2005-2013.
297
- 298 **23. Verweij, P. E., S. J. Howard, W. J. Melchers, D. W. Denning.** 2009 Azole-
299 resistance in *Aspergillus*: proposed nomenclature and breakpoints. Drug Resist.
300 Updat. **12**: 141-147.
301
- 302 **24. Walsh, T. J., E. Anaissie, D. W. Denning, R. Herbrecht, D. Kontoyiannis, K. A.**
303 **Marr, V. A. Morrison, B. H. Segal, W. J. Steinbach, D. A. Stevens, J.A van Burik,**
304 **J. R. Wingard, T. F. Patterson.** 2008. Treatment of aspergillosis: clinical practice
305 guidelines of the infectious diseases society of America. Clin. Infect. Dis. **46**: 327-360.
306
- 307 **25. Warn, P. A., A. Sharp, J. Mosquera, J. Spickermann, A. Schmitt-Hoffmann, M.**
308 **Heep, D. W. Denning.** 2006. Comparative *in vivo* activity of BAL 4815, the active
309 component of the prodrug BAL8557, in a neutropenic murine model of disseminated
310 *Aspergillus flavus*. J. Antimicrob. Chemother. **58**: 1198-1207

311
 312
 313
 314
 315
 316
 317
 318
 319
 320

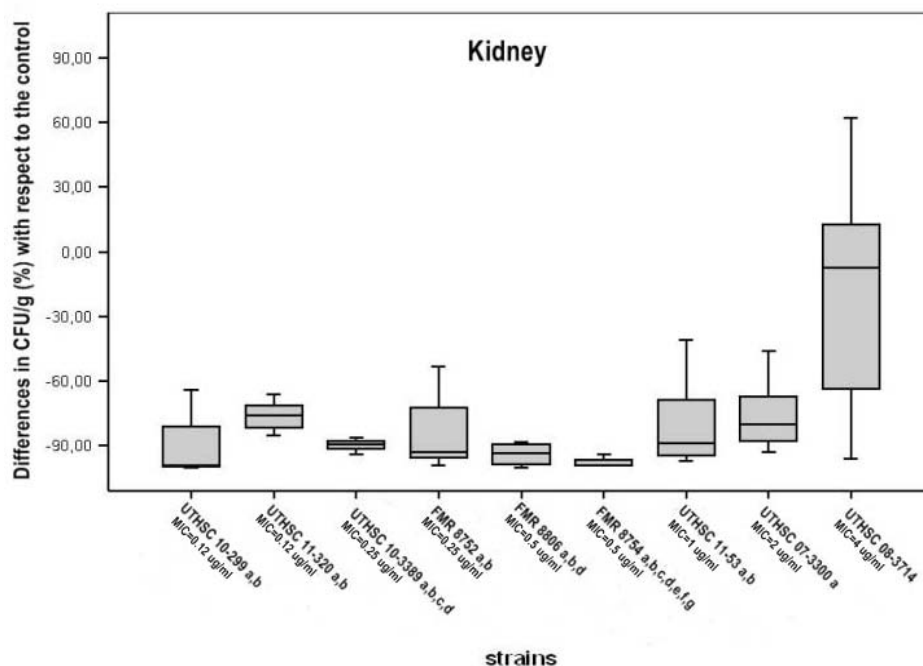


321
 322
 323
 324
 325
 326
 327
 328
 329

Figure 1: Mean survival time of mice infected with *A. terreus*. VRC 25, voriconazole administered at 25 mg/kg orally once a day. Mice (n=8 per group).

- ^a $P < 0.05$ versus control;
- ^b $P < 0.05$ versus FMR 8752;
- ^c $P < 0.05$ versus FMR 8806;
- ^d $P < 0.05$ versus UTHSC 07-3300;
- ^e $P < 0.05$ versus UTHSC 08-3714.

330
 331
 332
 333
 334
 335
 336
 337
 338
 339
 340
 341
 342
 343
 344
 345
 346
 347
 348
 349



350
 351
 352
 353
 354
 355
 356
 357
 358
 359

Figure 2. Box-plot of changes in fungal load of mice infected with 2×10^5 CFU of *A. terreus* with respect to the respective control in kidneys of mice treated with voriconazole at 25 mg/kg orally once a day. Mice (n=8 per group).

- ^a $P < 0.05$ versus control;
- ^b $P < 0.05$ versus UTHSC 08-3714;
- ^c $P < 0.05$ versus UTHSC 11-320;
- ^d $P < 0.05$ versus UTHSC 07-3300;
- ^e $P < 0.05$ versus UTHSC 10-3389;
- ^f $P < 0.05$ versus FMR 8752;
- ^g $P < 0.05$ versus UTHSC 11-53.

360
361
362
363
364
365
366
367
368
369
370
371
372
373
374
375
376
377
378
379
380

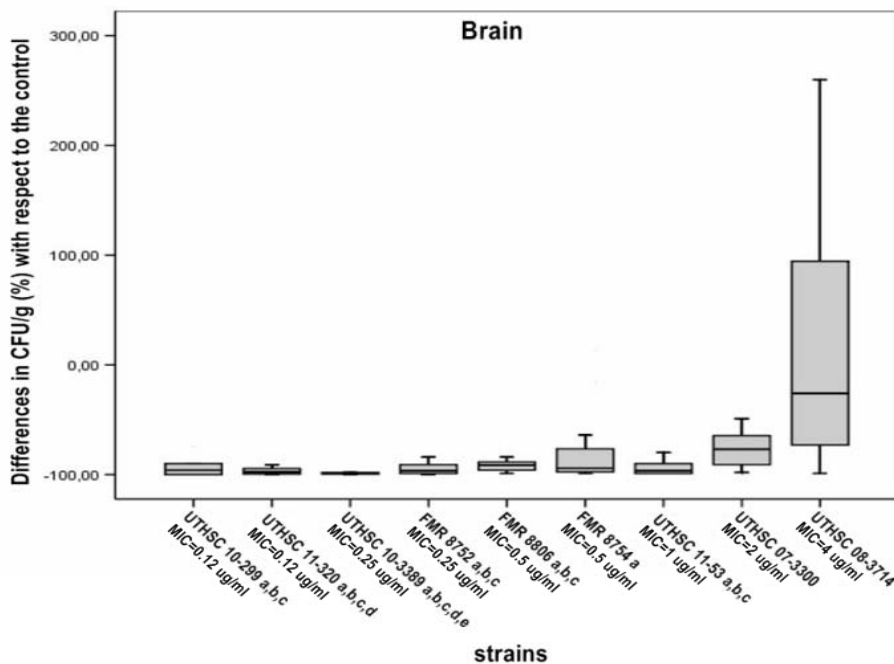


Figure 3. Box-plot of changes in fungal load of mice infected with 2×10^5 CFU of *A. terreus* with respect to the respective control in brain of mice treated with voriconazole at 25 mg/kg orally once a day. Mice (n=8 per group).

- a $P < 0.05$ versus control;
- b $P < 0.05$ versus UTHSC 07-3300;
- c $P < 0.05$ versus UTHSC 08-3714;
- d $P < 0.05$ versus FMR 8806;
- e $P < 0.05$ versus FMR 8854.

381
382
383
384
385
386
387
388
389
390
391
392
393
394
395
396
397
398
399
400
401
402
403
404
405
406
407
408
409

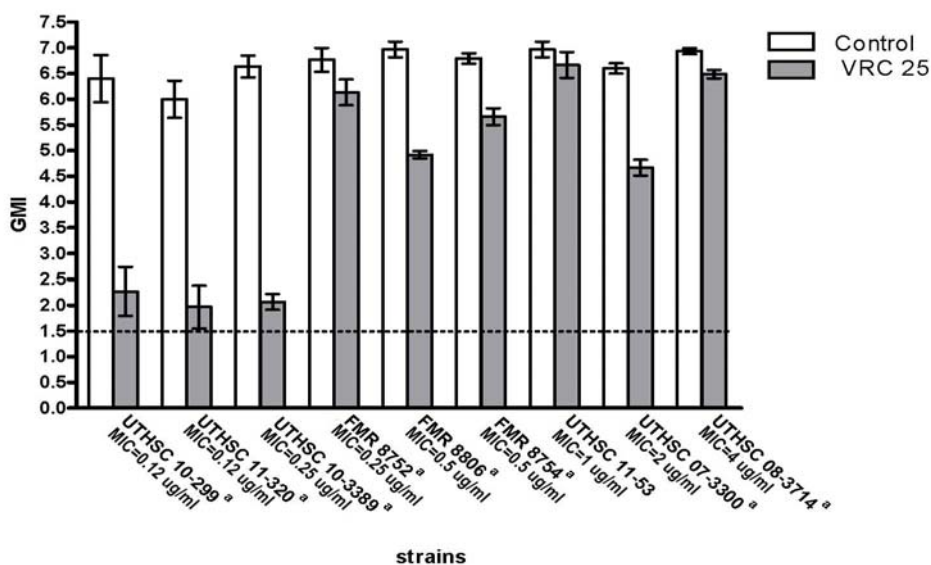


Figure 4. Galactomannan serum levels in mice infected with *A. terreus* measured on day 5 of treatment. VRC 25, voriconazole administered at 25 mg/kg orally once a day. The horizontal line indicates the cut-off for positivity (GMI > 1,5). ^a $P < 0.05$ versus control.

4.5. Evaluación de la actividad *in vitro* del voriconazol como predictiva de los resultados *in vivo* en un modelo murino de infección diseminada causada por *Aspergillus fumigatus*.

Evaluation of *in vitro* activity of voriconazole as predictive of *in vivo* outcome in a murine *Aspergillus fumigatus* infection model.

Salas V, Pastor FJ, Calvo E, Sutton DA, Fothergill AW, Guarro J.

Enviado a la revista Antimicrobial Agents and Chemotherapy

41 **ABSTRACT**

42

43 We have evaluated the *in vitro* activity of voriconazole against 61 strains of
44 *Aspergillus fumigatus* by using broth microdilution, disk diffusion, and minimal
45 fungicidal concentration procedures. We observed an excellent correlation between
46 the results obtained with the three methods. Five percent of the strains showed MICs
47 \geq epidemiological cut-off value (ECV = 1 $\mu\text{g/ml}$). To assess if MICs were predictive of
48 *in vivo* outcome, we tested the efficacy of voriconazole at 25 mg/kg daily in an
49 immunosuppressed murine model of disseminated infection using ten strains
50 representing various susceptibility patterns to the drug as determined by the *in vitro*
51 study. There was no significant association between increasing voriconazole MICs
52 and mouse mortality ($R^2 = 0.21$; $P = 0.175$). Voriconazole prolonged survival and
53 reduced fungal load in the kidneys and brain in those mice infected with strains with
54 MICs $\leq 0.25 \mu\text{g/ml}$. In those with MICs $\geq 0.5 - 2 \mu\text{g/ml}$, the efficacy was variable and
55 strain dependent, and in the only strain tested with an MIC = 4 $\mu\text{g/ml}$ no efficacy was
56 shown. Voriconazole reduced galactomannan antigenemia against practically all
57 strains with an MIC < 4 $\mu\text{g/ml}$.

58

59

60

61

62

63

64

65

66

67

68

69

70

71

72

73

74

75

76

77

78

79

80 **Introduction**

81

82 Invasive aspergillosis is an important cause of morbidity and mortality in the
83 immunocompromised host, *Aspergillus fumigatus* being the leading cause of invasive
84 aspergillosis worldwide (25). At present, voriconazole is the first choice in the
85 treatment of such infections (29) and although *A. fumigatus* is generally susceptible
86 to voriconazole, several studies have demonstrated an increasing number of azole-
87 resistant isolates (12, 19, 28). This represents an important problem in the clinical
88 management of invasive aspergillosis because therapeutic options are limited.

89 The development of clinical breakpoints of the most usual antifungal drugs might be
90 useful for predicting the outcomes of fungal infections. However, the available
91 antifungal susceptibility data are only based on *in vitro* and animal studies (11). A
92 recent important step has been the proposal of epidemiological cut-off values (ECV)
93 for voriconazole against several *Aspergillus* spp., including *A. fumigatus* (ECV = 1
94 µg/ml), and theoretically those isolates showing MICs higher than ECV will show
95 resistance (8, 20).

96 We have evaluated the efficacy of voriconazole at 25 mg/kg (30) in a murine model
97 of disseminated infection by *A. fumigatus* testing isolates with different MICs, in order
98 to ascertain the role of the *in vitro* data as a predictor of infection outcome.

99 **Materials and methods**

100

101 Sixty one clinical strains of *Aspergillus fumigatus* were tested in the *in vitro* studies.

102 Their susceptibility to voriconazole was evaluated using a broth microdilution method,
103 carried out according to the CLSI guidelines for filamentous fungi (6) and a disk
104 diffusion method that uses non-supplemented Mueller-Hinton agar and 6 mm
105 diameter paper disks containing 1 µg of voriconazole (7). The strain *A. fumigatus*
106 ATCC MYA-3626 was used as quality control. The MICs (µg/ml) and IZDs (mm) were
107 read at 48 and 24 h, respectively. Suggested ECVs of voriconazole for *A. fumigatus*
108 are 1 µg/ml and ≥ 17 mm for microdilution and disk diffusion methods, respectively

109 (7,8). The minimal fungicidal concentration (MFC) was determined by subculturing 20
110 μ l of each well that showed complete inhibition or an optically clear well relative to the
111 last positive well and the growth control onto potato dextrose agar (PDA) plates. The
112 plates were incubated at 35°C until growth was observed in the control subculture.
113 The MFC was the lowest drug concentration at which approximately 99.9% of the
114 original inoculum was killed.

115 For *in vivo* studies, ten isolates with different *in vitro* susceptibilities were chosen (Table
116 1). Male OF1 mice (Charles River, Criffa S.A., Barcelona, Spain) weighing 30 g were
117 used. Animals were housed under standard conditions. All animal care procedures
118 were supervised and approved by the Universitat Rovira i Virgili Animal Welfare and
119 Ethics Committee. Animals were immunosuppressed 1 day prior to infection by
120 administering a single intraperitoneal (i.p.) injection of 200 mg/kg of
121 cyclophosphamide (Genoxal; Laboratories Funk S.A., Barcelona, Spain), plus a
122 single intravenous (i.v.) injection of 150 mg/kg of body weight of 5-fluorouracil
123 (Fluorouracilo; Ferrer Farma S.A., Barcelona, Spain). With this immunosuppression the
124 peripheral blood polymorphonuclear leukocyte (PMN) counts were $< 100/\mu$ l from day
125 3 to 9 or later (18). Mice were challenged with 2×10^3 CFU in 0.2 ml of sterile saline,
126 injected via the lateral tail vein. Preliminary experiments demonstrated that this
127 inoculum was appropriate for producing an acute infection, with 100% of the animals
128 dying within 11 days (data not shown).

129 Voriconazole (Vfend; Pfizer S.A., Madrid, Spain) was administered at 25 mg/kg of
130 body weight/dose once a day (QD) orally by gavage. That dosage was based on a
131 previous pharmacokinetic study that demonstrated that this dose resulted in a drug
132 exposure in mice higher than those considered effective in humans (30).

133 From 3 days before infection, the mice that received voriconazole were given
134 grapefruit juice instead of water (10, 26). To prevent bacterial infection, all animals
135 received ceftazidime at 5 mg/kg subcutaneously once daily. The efficacy of

136 voriconazole was evaluated as prolonging survival of mice in comparison to controls,
137 tissue burden reduction, and by determination of galactomannan serum levels by
138 enzyme immunoassay. Treatments began one day after infection, and lasted for 7
139 days. For survival studies, groups of 8 mice were randomly established for each
140 strain and each treatment and checked daily for 30 days after challenge. Controls
141 received no treatment. For tissue burden studies, groups of 8 mice were also
142 established and the animals were sacrificed on day 5 post-infection in order to
143 compare the results with controls. Kidneys and brain were aseptically removed and
144 approximately half of each organ was weighed and homogenized in 1 ml of sterile
145 saline. In previous murine studies these were the main target organs (5, 15). Serial
146 10-fold dilutions of the homogenates were plated on PDA and incubated 48 h at
147 35°C. The numbers of CFU/g of tissue were calculated. Additionally, before being
148 sacrificed, approximately 1 ml of blood from each mouse belonging to the tissue
149 burden groups was extracted by cardiac puncture. Pooled serum samples from mice
150 of each treatment group were used to determine the drug concentration in serum by
151 bioassay 4 h after drug administration (17, 22) and the galactomannan levels by
152 enzyme immunoassay (Platelia *Aspergillus*[®], Bio Rad, Marmes, la Coquette, France)
153 as a marker of the treatment response (24). Values were expressed as a
154 galactomannan index (GMI) defined as the optical density of a sample divided by the
155 optical density of a threshold serum provided in the test kit.

156 For survival studies, the Kaplan-Meier method and log rank test were used.
157 Differences were considered statically significant at $p < 0.05$. When multiple
158 comparisons were carried out, the Bonferroni correction was used to avoid an
159 increase in type I error. The tissue burden studies were analyzed using the Mann-
160 Whitney U test. The Kolmogorov-Smirnov test was carried out to determine the
161 normal distribution of galactomannan serum levels, and bioassay data, so that they
162 could be analyzed using the T-test. Chi-square and linear regression modelling were

163 used for statistical analysis of the association between the *in vitro* susceptibility and
164 *in vivo* outcome.

165 **Results**

166
167 The voriconazole MICs of the 61 *A. fumigatus* strains tested were in the range from
168 0.12 to 4 µg/ml with a modal MIC of 0.5 µg/ml and MIC50 and MIC90 values of ≤ 0.5
169 and 1µg/ml, respectively (data not shown). The IZD range was 0 – 34 mm (geometric
170 mean = 26.85 mm, standard deviation ± 4.1 mm). The MFC ranged from 0.25 to 4
171 µg/ml (geometric mean = 0.74 µg/ml). Following the suggested ECV against
172 *Aspergillus fumigatus* (7, 8), most of the strains tested showed voriconazole MICs ≤
173 and ≥ IZDs ECV, i.e. 95 and 93 %, respectively. In general, a high correlation
174 between the results obtained with the microdilution and the disk diffusion methods
175 was observed. The differences between MICs and MFCs were never > 2 dilutions
176 (data not shown).

177 Voriconazole significantly prolonged survival and reduced fungal load in kidneys and
178 brain with respect to the control group in those animals infected with isolates having
179 MICs ≤ 0.25 µg/ml. In those mice challenged with strains with MICs from 0.5 to 2
180 µg/ml the results where variable, without any clear relationship between increasing
181 MIC and *in vivo* response to voriconazole ($R^2 = 0.21$; $P = 0.175$) (data not shown).
182 Voriconazole was ineffective in prolonging survival and in reducing the fungal burden
183 in those animals infected with the strain with MIC of 4 µg/ml (Table 1, Figures 1 and
184 2).

185 At day 5 of the experiment, the serum concentration of voriconazole was 8.09 ± 3.05
186 µg/ml. Galactomannan concentration in serum at day 5 of the experiment was
187 significantly lower ($p < 0.05$) in animals treated with voriconazole than in control
188 animals, with the exception of mice challenged with one strain for which the MIC was
189 0.5 µg/ml and those infected with the strain with voriconazole MIC of 4 µg/ml (data
190 not shown).

191

192 Discussion

193

194 In this study, we have selected several *A. fumigatus* strains with different *in vitro*
195 susceptibilities to voriconazole in order to assess if there is any relationship between
196 the *in vitro* activity and its *in vivo* efficacy. Only 5% of the 61 isolates tested showed
197 MICs > ECV. In previous similar studies the values were between 1.4 - 4.1% (8, 21,
198 27). We observed an excellent correlation between the *in vitro* results obtained with
199 microdilution, disk diffusion and MFC. In agreement with other authors, our *in vitro*
200 results suggest that the disk diffusion method could be a good option for determining
201 voriconazole susceptibility (9, 23), due to its simplicity, low cost and high
202 reproducibility. Our MFC data (MFC/MIC \leq 2) confirmed the fungicidal activity of this
203 drug against *A. fumigatus* (13, 14).

204 Mavridou *et al.* (2010) (16) demonstrated a good efficacy of voriconazole at 40 mg/kg
205 in prolonging the survival of non-immunosuppressed mice infected with three *A.*
206 *fumigatus* isolates with voriconazole MICs from 0.12 to 0.25 μ g/ml, but this dosage
207 was ineffective in mice infected with a strain with MIC of 2 μ g/ml. In our study
208 voriconazole also showed efficacy in those animals infected with *A. fumigatus*
209 isolates having MICs \leq 0.25 μ g/ml, but in those with MIC of 0.5 - 2 μ g/ml their efficacy
210 was variable and strain dependent. Nevertheless, it should be noted that our study
211 differs in many important aspects from that of Mavridou *et al.* (2010) (16) such as the
212 voriconazole dosage, the immune status of animals, and the endpoints used to
213 evaluate the *in vivo* efficacy of the treatment, which makes any comparison difficult.
214 In the present study only one dose of voriconazole was evaluated because the use of
215 an additional dose for the same strains would have required more than 40 groups of
216 animals. The dose tested demonstrated efficacy seen in previous similar studies (4,
217 30) and using this dose, the serum levels of that drug were always greater than the
218 MICs for the strains tested. A possible limitation of the present study is the use of a
219 systemic infection model, which is not the most common clinical presentation of *A.*
220 *fumigatus* infection. However, systemic infections are not uncommon, especially in

221 immunocompromised patients, and are often fatal (2, 3). Another potential weakness
222 could be the use of mice to evaluate voriconazole efficacy, bearing in mind that the
223 metabolism and clearance of the drug is very rapid in the mouse. However, the use
224 of grapefruit juice to increase voriconazole serum concentration demonstrated the
225 effectiveness of its oral administration in several experimental murine mycoses (10,
226 26, 30). In contrast, one of the most important aspects of this study was the large
227 number of strains used which, although important, is atypical in this type of study
228 (11). It is also well known, as has been demonstrated in this study, that different
229 isolates of a given species frequently show a different response to the same
230 antifungal agent. Therefore, the use of only one strain to infer antifungal
231 susceptibility of a species can produce erroneous results.

232 Our results demonstrate that *A. fumigatus* strains show important variability in their *in*
233 *vivo* responses to voriconazole, particularly for those isolates with MIC values > 0.25
234 µg/ml, and without any clear relationship between increasing MIC and *in vivo*
235 response to voriconazole. These results agree with those of Baddley *et al* (2009) (1)
236 who investigated the relationship between the *in vitro* susceptibility of 115 *A.*
237 *fumigatus* isolates recovered from patients with invasive aspergillosis who received
238 voriconazole, and the clinical outcome. They observed that MICs ≥ ECV were not
239 statistically associated with increased mortality. Taking into account all the
240 parameters of treatment response used in this study, our results revealed that only a
241 MIC = 4 µg/ml was associated with treatment failure, however only one such strain
242 was evaluated. Nevertheless, only 0.9% of *A. fumigatus* strains showed voriconazole
243 MICs ≥ 4 µg/ml (8).

244 In summary, using this MIC model, voriconazole significantly prolonged survival and
245 reduced fungal load in kidneys and brain with respect to the control group in those
246 animals infected with isolates having MICs ≤ 0.25 µg/ml. In those mice challenged
247 with strains with MICs from 0.5 to 2 µg/ml the results were variable and poorly
248 predictive of *in vivo* response. Voriconazole was ineffective in prolonging survival and

249 in reducing the fungal burden in those animals infected with the strain whose MIC
250 was 4 µg/ml.

251 Further studies testing additional strains with varying voriconazole MICs are
252 necessary to more accurately define the true clinical significance of *in vitro* data.

253

254

255

256

257

258

259

260

261

262

263

264

265

266

267

268

269

270

271

272

273

274

275

276

277

278

279

280

281

282

283

284 **References**

285

286 **1. Baddley, J. W., K. A. Marr, D. R. Andes, T. J. Walsh, C. A. Kauffman, D. P.**
287 **Kontoyiannis, J. I. Ito, S. A. Balajee, P. G. Pappas, S. A. Moser.** 2009. Patterns
288 of susceptibility of *Aspergillus* isolates recovered from patients enrolled in the
289 transplant-associated infection surveillance network. *J. Clin. Microbiol.* **47**: 3271-
290 3275.

291

292 **2. Behnsen, J., A. Hartmann, J. Schmalzer, A. Gehrke, A. A. Brakhage, P. F.**
293 **Zipfel.** 2008. Host complement system fungus *Aspergillus fumigatus* evades the host
294 complement system. *Infect. Immun.* **76**: 820-827

295

296 **3. Brakhage, A. A.** 2006. Systemic fungal infections caused by *Aspergillus* species:
297 epidemiology, infection process and virulence determinants. *Curr. Drug Targets* **6**:
298 875-886.

299

300 **4. Calvo, E., F. J. Pastor, V. Salas, E. Mayayo, J. Guarro.** 2012. Combined therapy
301 of voriconazole and anidulafungin in murine infections by *Aspergillus flavus*.
302 *Mycopathologia* **173**: 251-257.

303

304 **5. Clemons, K. V., G. Grunig, R. A. Sobel, L. F. Mirels, D. M. Rennick, D. A.**
305 **Stevens.** 2000. Role of IL-10 in invasive aspergillosis: increased resistance of IL-10
306 gene knockout mice to lethal systemic aspergillosis. *Clin. Exp. Immunol.* **122**: 186-
307 191.

308

309 **6. Clinical and Laboratory Standards Institute.** 2008. Reference method for broth
310 dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. Approved standard-second
311 edition. Document M38-A2. CLSI, Wayne, Pa.

312

313 **7. Clinical and Laboratory Standards Institute.** 2010. Method for antifungal disk
314 diffusion susceptibility testing of nondermatophyte filamentous fungi. Approved
315 guideline. Document M51-A. CLSI, Wayne, Pa.

316

317 **8. Espinel-Ingroff, A., D. J. Diekema, A. Fothergill, E. Johnson, T. Pelaez, M. A.**
318 **Pfaller, M. G. Rinaldi, E. Cantón, J. Turnidge.** 2010. Wild-type MIC distributions
319 and epidemiological cutoff values for the triazoles and six *Aspergillus* spp. for the
320 CLSI broth microdilution method (M38-A2 document). *J. Clin. Microbiol.* **48**: 3251-
321 3257.

- 322 **9. Espinel- Ingroff. A., E. Cantón.** 2008. Comparison of Neo-sensitabs tablet
323 diffusion assay with CLSI broth microdilution M38-A and disk diffusion methods for
324 testing susceptibility of filamentous fungi with amphotericin B, caspofungin,
325 itraconazole, posaconazole and voriconazole. *J. Clin. Microbiol.* **46**: 1793-1803.
326
- 327 **10. Graybill, J. R., L. K. Najvar, G. M. Gonzalez, S. Hernandez, R. Bocanegra.**
328 2003. Improving the mouse model for studying efficacy of voriconazole. *J.*
329 *Antimicrob. Chemother.* **51**: 1373-1376.
330
- 331 **11. Guarro, J.** 2011. Lessons from animal studies for the treatment of invasive
332 human infections due to uncommon fungi. *J. Antimicrob. Chemother.* **66**: 1447:1466.
333
- 334 **12. Howard, S. J., D. Cerar, J. Anderson, A. Albarrag, M. C. Fisher, A. C.**
335 **Pasqualotto, M. Laverdiere, M. C. Arendrup, D. S. Perlin, D. W. Denning.** 2009.
336 Frequency and evolution of azole resistance in *Aspergillus fumigatus* associated with
337 treatment failure. *Emerg. Infect. Dis.* **15**: 1068-1676.
338
- 339 **13. Krishnan, S., E. K. Manavathu, P. H. Chandrasekar.** 2005. A comparative
340 study of fungicidal activities of voriconazole and amphotericin B against hyphae of
341 *Aspergillus fumigatus*. *J. Antimicrob. Chemother.* **55**: 914-920.
342
- 343 **14. Lass-Flörl, C., S. Perkhofer.** 2008. *In vitro* susceptibility-testing in *Aspergillus*
344 species. *Mycoses* **51**: 437-446.
345
- 346 **15. Luque, J. C., K. V. Clemons, D. A. Stevens.** 2003. Efficacy of micafungin alone
347 or in combination against systemic murine aspergillosis. *Antimicrob. Agents*
348 *Chemother.* **47**: 1452-1455.
349
- 350 **16. Mavridou, E., R. J. Bruggemann, W. J. Melchers, P. E. Verweij, J. W.**
351 **Mouton.** 2010. Impact of *cyp 51A* mutations on the pharmacokinetic and
352 pharmacodynamic properties of voriconazole in a murine model of disseminated
353 aspergillosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**: 4758-4764.
354
- 355 **17. Majithiya, J., A. Sharp, A. Parmar, D. W. Denning, P. A. Warn.** 2009. Efficacy
356 of isavuconazole, voriconazole and fluconazole in temporally neutropenic murine

- 357 model of disseminated *Candida tropicalis* and *Candida krusei*. J. Antimicrob.
358 Chemother. **63**: 161-166.
359
- 360 **18. Ortoneda, M., J. Capilla, F. J. Pastor, C. Serena, J Guarro.** 2004. Interaction of
361 granulocyte colony-stimulating factor and high doses of liposomal amphotericin B in
362 the treatment of systemic murine scedosporiosis. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. **50**:
363 247–251.
364
- 365 **19. Pfaller, M. A.** 2012. Antifungal drug resistance: mechanisms, epidemiology, and
366 consequences for treatment. Am. J. Med. **125**: 3-13.
367
- 368 **20. Pfaller, M. A., D. J. Diekema, M. A., Ghannoum, J. H. Rex, B. D. Alexander, D.**
369 **Andes, S. D. Brown, V. Chaturvedi, A. Espinell-Ingroff, C. L. Fowler, E.M.**
370 **Johnson, C. C. Knapp, M. R. Motyl, L. Ostroski-Zeichner, D. J. Sheehan, T. J.**
371 **Walsh, Clinical and Laboratory Standards Institute Antifungal Testing**
372 **Subcommittee.** 2009. Wild type distribution and epidemiological cutoff values for
373 *Aspergillus fumigatus* and three triazoles as determined by the Clinical and
374 Laboratory Standard Institute broth microdilution methods. J. Clin. Microbiol. **47**:
375 3142-3146.
376
- 377 **21. Pfaller, M. A., R. Boyken, J. Hollis, J. Kroeger, S. Messer, S. Tendolkar, D**
378 **Diekema.** 2011. Use of epidemiological cutoff values to examine 9 year trends in
379 susceptibility of *Aspergillus* species to triazoles. J. Clin. Microbiol. **49**: 586-590.
380
- 381 **22. Rodríguez, M. M., E. Calvo, C. Serena, M. Mariné, F. J. Pastor, J. Guarro.**
382 2009. Effects of double and triple combinations of antifungal drugs in a murine model
383 of disseminated infection by *Scedosporium prolificans*. Antimicrob. Agents
384 Chemother. **53**: 2153-2155.
385
- 386 **23. Serrano, M. C., M. Ramírez, D. Morilla, A. Valverde, M. Chávez, A. Espinel-**
387 **Ingroff, R. Claro, A. Fernández, C. Almeida, E. Martín-Mazuelos.** 2004. A
388 comparative study of the disk diffusion method with the broth microdilution and Etest
389 methods for voriconazole susceptibility testing of *Aspergillus* spp. J. Antimicrob.
390 Chemother. **53**: 739-742.
- 391 **24. Sionov, E., S. Mendlovic, E. Segal.** 2005. Experimental systemic murine
392 aspergillosis: treatment with polyene and caspofungin combination and G-CSF. J.
393 Antimicrob. Chemother. **56**: 594-597.

- 394 **25. Snelders, E., H. A. van der Lee, J. Kuijpers. A. J. Rijs, J. Varga, R. A**
395 **Samson, E. Mellado, A. R.Donders, W. J. Melchers, P. E. Verweij.** 2008.
396 Emergence of azole resistance in *Aspergillus fumigatus* and spread of a single
397 resistance mechanism. PLoS Med. **5**:e219.
398
399 **26. Sugar, A. M., X. P. Liu.** 2000. Effect of grapefruit juice on serum voriconazole
400 concentration in the mouse. Med. Mycol. **38**: 209-212.
401
402 **27. Tashiro, M., K. Izumikawa, A. Minematsu, K. Hirano, N. Iwanaga , S. Ide,**
403 **T. Mihara, N. Hosogaya,, T. Takazono, Y. Morinaga, S. Nakamura, S.**
404 **Kurihara, Y. Imamura, T. Miyazaki, T. Nishino, M. Tsukamoto, H. Kakeya, Y.**
405 **Yamamoto, K . Yanagihara, A . Yasuoka, T Tashiro, S. Kohno.** 2012. Antifungal
406 susceptibilities of *Aspergillus fumigatus* clinical isolates obtained in Nagasaki, Japan.
407 Antimicrob. Agents Chemother. **56**: 584-587.
408
409 **28. Verweij, P. E., S. J. Howard, W. J. Melchers, D. W. Denning.** 2009 Azole-
410 resistance in *Aspergillus*: proposed nomenclature and breakpoints. Drug Resist.
411 Updat. **12**: 141-147.
412
413 **29. Walsh, T. J., E. Anaissie, D. W. Denning, R. Herbrecht, D. Kontoyiannis,K. A.**
414 **Marr, V. A. Morrison, B. H. Segal, W. J. Steinbach, D. A. Stevens, J.A van Burik,**
415 **J. R. Wingard, T. F. Patterson.** 2008. Treatment of aspergillosis: clinical practice
416 guidelines of the infectious diseases society of America. Clin. Infect. Dis. **46**: 327-
417 360.
418
419 **30. Warn, P. A., A. Sharp, J. Mosquera, J. Spickermann, A. Schmitt-Hoffmann,**
420 **M. Heep, D. W. Denning.** 2006. Comparative *in vivo* activity of BAL 4815, the active
421 component of the prodrug BAL8557, in a neutropenic murine model of disseminated
422 *Aspergillus flavus*. J. Antimicrob. Chemother. **58**: 1198-1207
423
424
425
426
427
428

429 Table 1: Mean survival time of mice infected with different strains of *A. fumigatus*
 430

Group infected with the strains (MIC in µg/ml)		Mean survival time in days (range)			
		VRC 25 mg/kg		Control	
FMR 10220	(0.12)	21.5	(7-30) ^{a,b,c}	7.1	(6-9)
FMR 10536	(0.25)	21.8	(7-30) ^{a,b,c}	5.9	(5-7)
FMR 10513	(0.25)	17.5	(6-30) ^{a,b}	6.9	(6-9)
FMR 10528	(0.5)	9.1	(6-17)	5.5	(5-7)
FMR 10505	(0.5)	13	(5-30) ^a	7.1	(5-12)
FMR 7738	(1)	14.2	(6-30) ^a	7.1	(5-15)
FMR 10512	(1)	11.4	(6-30)	8.2	(6-12)
UTHSC 10-3338	(2)	20.3	(13-30) ^{a,b}	5.6	(5-6)
UTHSC 10-246	(2)	17.4	(5-30) ^{a,b}	6.6	(5-12)
UTHSC 10-448	(4)	9.3	(6-30)	7.3	(6-14)

431 ^a $P < 0.05$ versus control; ^b $P < 0.05$ versus FMR 10528; ^c $P < 0.05$ versus UTHSC
 432 10-448.
 433

434

435

436

437

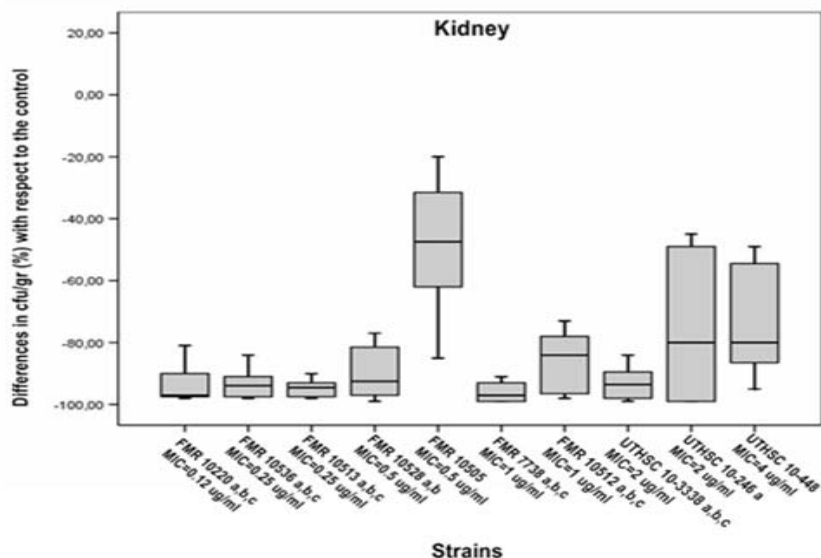
438

439

440

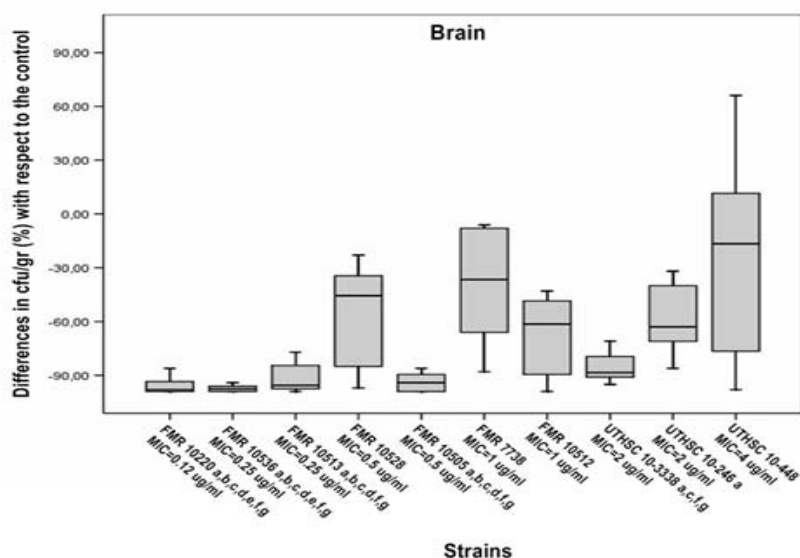
441

442
 443
 444
 445
 446
 447
 448
 449
 450
 451
 452
 453
 454
 455
 456
 457
 458



459 Figure 1. Box-plot of changes in fungal load of mice infected with 2×10^3 CFU of *A.*
 460 *fumigatus* with respect to the respective control in kidneys of mice treated with
 461 voriconazole at 25 mg/kg orally once a day.
 462 a $P < 0.05$ versus control;
 463 b $P < 0.05$ versus FMR 10505;
 464 c $P < 0.05$ versus UTHSC 10-448

465
 466
 467
 468
 469
 470
 471
 472
 473
 474
 475
 476
 477
 478
 479
 480
 481
 482
 483
 484
 485



486 Figure 2. Box-plot of changes in fungal load of mice infected with 2×10^3 CFU of *A.*
 487 *fumigatus* with respect to the respective control in brain of mice treated with
 488 voriconazole at 25 mg/kg orally once a day.
 489 a $P < 0.05$ versus control;
 490 b $P < 0.05$ versus FMR 10528;
 491 c $P < 0.05$ versus FMR 7738;
 492 d $P < 0.05$ versus FMR 10512;
 493 e $P < 0.05$ versus UTHSC 10-3338;
 494 f $P < 0.05$ versus UTHSC 10-246;
 495 g $P < 0.05$ versus UTHSC 10-448.

496

4.6. Eficacia *in vitro* e *in vivo* del posaconazol y de la anfotericina B en una infección diseminada en el ratón causada por *Mucor circinelloides*: pobre eficacia del posaconazol.

***In vitro* and *in vivo* activities of posaconazole and amphotericin B in a murine invasive infection by *Mucor circinelloides*: poor efficacy of posaconazole.**

Salas V, Pastor FJ, Calvo E, Alvarez E, Sutton DA, Mayayo E, Fothergill AW, Rinaldi MG, Guarro J.

Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2012, 56: 2246-2250

In Vitro and *In Vivo* Activities of Posaconazole and Amphotericin B in a Murine Invasive Infection by *Mucor circinelloides*: Poor Efficacy of Posaconazole

Valentina Salas,^a F. Javier Pastor,^a Enrique Calvo,^a Eduardo Alvarez,^a Deanna A. Sutton,^c Emilio Mayayo,^b Anette W. Fothergill,^c Michael G. Rinaldi,^c and Josep Guarro^a

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

The *in vitro* susceptibility of 17 strains of *Mucor circinelloides* to amphotericin B and posaconazole was ascertained by using broth microdilution and disk diffusion methods and by determining the minimal fungicidal concentration (MFC). We evaluated the efficacy of posaconazole at 40 mg/kg of body weight/day and amphotericin B at 0.8 mg/kg/day in a neutropenic murine model of disseminated infection by *M. circinelloides* by using 6 different strains tested previously *in vitro*. In general, most of the posaconazole MICs were within the range of susceptibility or intermediate susceptibility, while the small inhibition zone diameters (IZDs) were indicative of nonsusceptibility for all isolates tested. The MFCs were ≥ 3 dilutions higher than the corresponding MICs. In contrast, amphotericin B showed good activity against all of the strains tested regardless of the method used. The *in vivo* studies demonstrated that amphotericin B was effective in prolonging survival and reducing the fungal load. Posaconazole showed poor *in vivo* efficacy with no correlation with the MIC values. The results suggested that posaconazole should be used with caution in the treatment of infections caused by *Mucor circinelloides* or by strains of *Mucor* not identified to the species level.

Mucoramyces, infections by species of *Mucorales*, are characterized by a rapid clinical progression and high mortality rates. Currently these infections are the third most common invasive mycoses after candidiasis and aspergillosis. *Mucor circinelloides* seems to be the most common species of *Mucor* involved in clinical cases (3). The management of infections by mucoralean fungi requires the rapid diagnosis and early initiation of appropriate antifungal therapy, surgical debridement, and removal of predisposing factors, if possible (23, 26). At present, amphotericin B is the first choice in the treatment of such infections (7), but the mortality rate remains high (11). Posaconazole is a broad-spectrum antifungal drug that has shown good activity *in vitro* against mucoralean fungi (2). Although several *in vitro* studies have shown that this drug is less active against *M. circinelloides* than against other species belonging to the order *Mucorales*, such as *Rhizopus* spp., *Aphysomyces* spp., and *Saksena* spp. (1, 2, 18, 28), there is little experimental and clinical data on the use of posaconazole against *Mucor* infections (17, 29). In this study, we have evaluated the *in vitro* activity of posaconazole and amphotericin B using different methods against a relatively high number of clinical isolates of *M. circinelloides* and their efficacy in a neutropenic murine model of disseminated infection by clinical isolates with different posaconazole MICs.

MATERIALS AND METHODS

Seventeen strains molecularly identified as *Mucor circinelloides* (4) were tested *in vitro* (Table 1). Their susceptibility to posaconazole (PSC) and amphotericin B (AMB) was evaluated using a broth microdilution method, which was carried out according to the CLSI guidelines for filamentous fungi (8), and a disk diffusion method that uses nonsupplemented Mueller-Hinton agar and 6-mm-diameter paper discs containing 5 μ g of posaconazole or 10 μ g of amphotericin B (9, 10). The MICs (μ g/ml) and inhibition zone diameters (IZDs; mm) were read at 24 h. Although the clinical breakpoints for molds have not been developed yet,

the strains were classified by following the suggested epidemiological cut-off values (ECV) for posaconazole, i.e., for susceptible, MICs were ≤ 1 μ g/ml and IZD was ≥ 17 mm. For amphotericin B, the MICs and IZD were indicative of susceptibility when they were ≤ 1 μ g/ml and ≥ 15 mm, respectively (10). The minimum fungicidal concentration (MFC; in μ g/ml) was also determined by subculturing onto potato dextrose agar (PDA) plates 20 μ l of each well that showed 100% inhibition (optically clear well) relative to the last positive well and the growth control. The plates were incubated at 35°C until growth was seen in the control subculture. The MFC was considered the lowest drug concentration at which approximately 99.9% of the original inoculum was killed (15).

For the *in vivo* studies, we chose six of the strains previously tested *in vitro* (8). They were two strains, UTHSC 06-3784 and UTHSC R-3316, with a PSC MIC of 1 μ g/ml; three strains, UTHSC 01-11, UTHSC 06-1370, and UTHSC 04-534, with a posaconazole MIC of 2 μ g/ml; and one strain, UTHSC 05-1085, with a PSC MIC of 4 μ g/ml. The isolates were stored at -80°C and subcultured onto PDA at 25°C prior to testing. On the day of infection, cultures on PDA were suspended in sterile saline and filtered through sterile gauze to remove clumps of spores or hyphae. The resulting suspensions were adjusted to the desired inoculum based on hemocytometer counts and by serial plating on PDA to confirm viability.

Male OF1 mice (Charles River, Criffa S.A., Barcelona, Spain) weighing 30 g were used in this study. Animals were housed under standard conditions. All animal care procedures were supervised and approved by the Universitat Rovira i Virgili Animal Welfare and Ethics Committee. Animals were immunosuppressed 1 day prior to infection by a single intra-

Received 18 October 2011 Returned for modification 12 December 2011

Accepted 23 January 2012

Published ahead of print 30 January 2012

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

Copyright © 2012, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/AAC.05956-11

TABLE 1 *In vitro* activities of PSC and AMB against 17 isolates of *M. circinelloides*^a

Strain	MIC ($\mu\text{g/ml}$)		IZD (mm)		MFC ($\mu\text{g/ml}$)	
	PSC	AMB	PSC	AMB	PSC	AMB
UTHSC 05-707	2	0.5	11	16	>16	0.5
UTHSC 05-1085	4	0.5	ND	15	>16	1
UTHSC 03-2919	1	0.5	11	15	16	1
UTHSC 04-287	1	0.5	11	17	>16	1
UTHSC 05-458	1	0.5	11	16	>16	1
UTHSC 05-2687	1	0.5	ND	16	>16	1
UTHSC R-3316	1	0.25	11	19	>16	0.5
UTHSC 03-1161	2	0.25	ND	23	>16	1
UTHSC 01-11	2	0.25	11	22	>16	1
UTHSC 06-3784	1	0.25	11	18	>16	1
UTHSC 06-1370	2	0.25	12	17	>16	1
UTHSC 05-1078	1	0.5	12	20	>16	1
UTHSC 05-3221	1	0.5	ND	16	>16	1
UTHSC 04-1988	2	0.5	ND	20	>16	1
UTHSC 04-1243	2	1	11	19	>16	1
UTHSC 04-534	2	1	13	16	>16	1
UTHSC 04-2044	2	1	14	16	>16	1
<i>Candida parapsilosis</i> (ATCC 22019)	0.12	0.25	28	24	1	0.5

^a ND, not detected.

peritoneal (i.p.) injection of 200 mg/kg of body weight of cyclophosphamide (Genoxal; Laboratories Funk S.A., Barcelona, Spain), plus a single intravenous (i.v.) injection of 150 mg/kg of 5-fluorouracil (Fluorouracilo; Ferrer Farma S.A., Barcelona, Spain) (21). Mice were challenged with 1×10^6 CFU in 0.2 ml of sterile saline, which was injected via the lateral tail vein. Preliminary experiments testing several strains showed that this inoculum was appropriate for producing an acute infection, with 100% of the animals dying within 12 days after challenge (data not shown).

The drugs assayed were posaconazole, administered at 20 mg/kg of body weight/dose twice a day orally (p.o.) by gavage (22, 24), and amphotericin B at 0.8 mg/kg of body weight/dose once a day i.v. (16, 22). To prevent bacterial infections, all mice received 5 mg/day ceftazidime subcutaneously (25). All treatments began 1 day after infection and lasted for 7 days. The treatment efficacy was evaluated through prolonging survival, tissue burden reduction, and histopathological studies. For survival studies, groups of 10 mice were randomly established for each strain and each treatment and checked daily for 30 days after challenge. Controls received no treatment. For tissue burden studies, groups of 10 mice were also established, the animals being sacrificed on day 4 postinfection to be able to compare the results to those for controls. Kidneys and brain were aseptically removed, and approximately half of each organ was weighed and homogenized in 1 ml of sterile saline. Serial 10-fold dilutions of the homogenates were plated on PDA and incubated for 48 h at 25°C (4). The numbers of CFU/g of tissue were calculated.

For histopathological studies, half of each organ was fixed with 10% buffered formalin. Samples were dehydrated, paraffin embedded, and

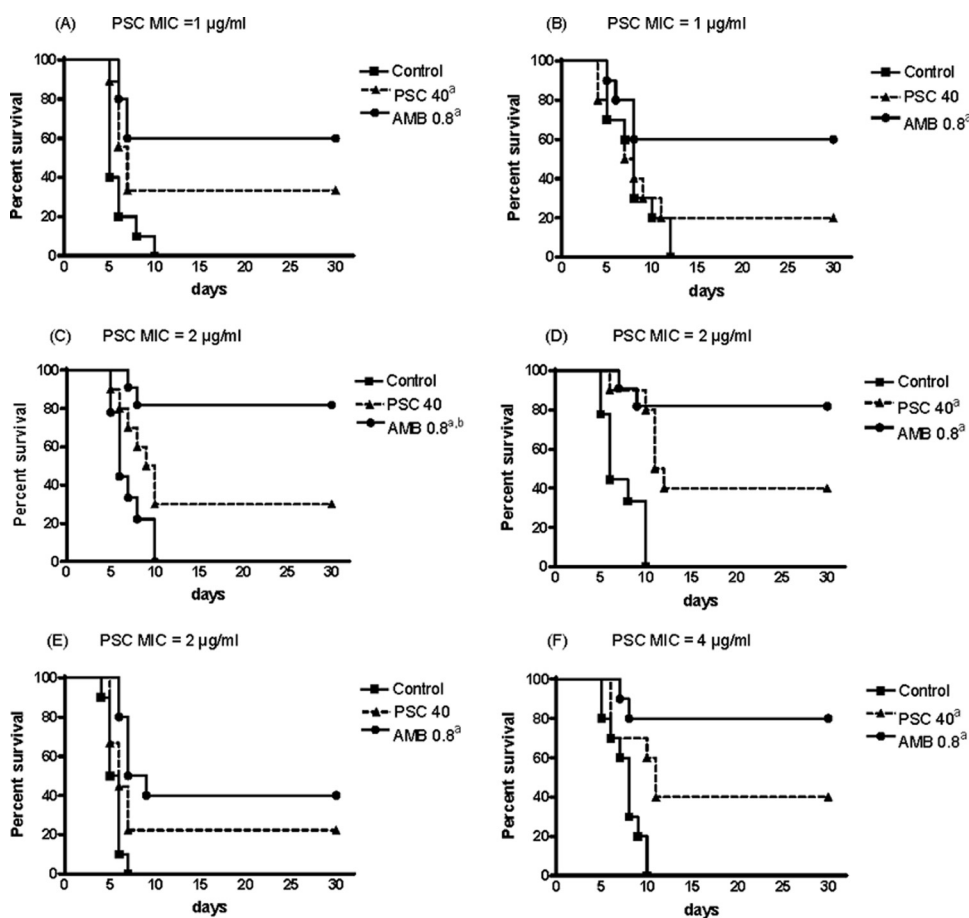


FIG 1 Cumulative mortality of mice infected with *M. circinelloides* UTHSC 06-3784 (A), UTHSC R-3316 (B), UTHSC 01-11 (C), UTHSC 06-1370 (D), UTHSC 04-534 (E), and UTHSC 05-1085 (F) and treated with PSC or AMB. PSC 40, posaconazole administered at 20 mg/kg p.o. twice a day; AMB 0.8, amphotericin B administered at 0.8 mg/kg i.v. once daily. The superscript letters refer to significance values: a, $P < 0.05$ versus the control group; b, $P < 0.05$ versus PSC 40.

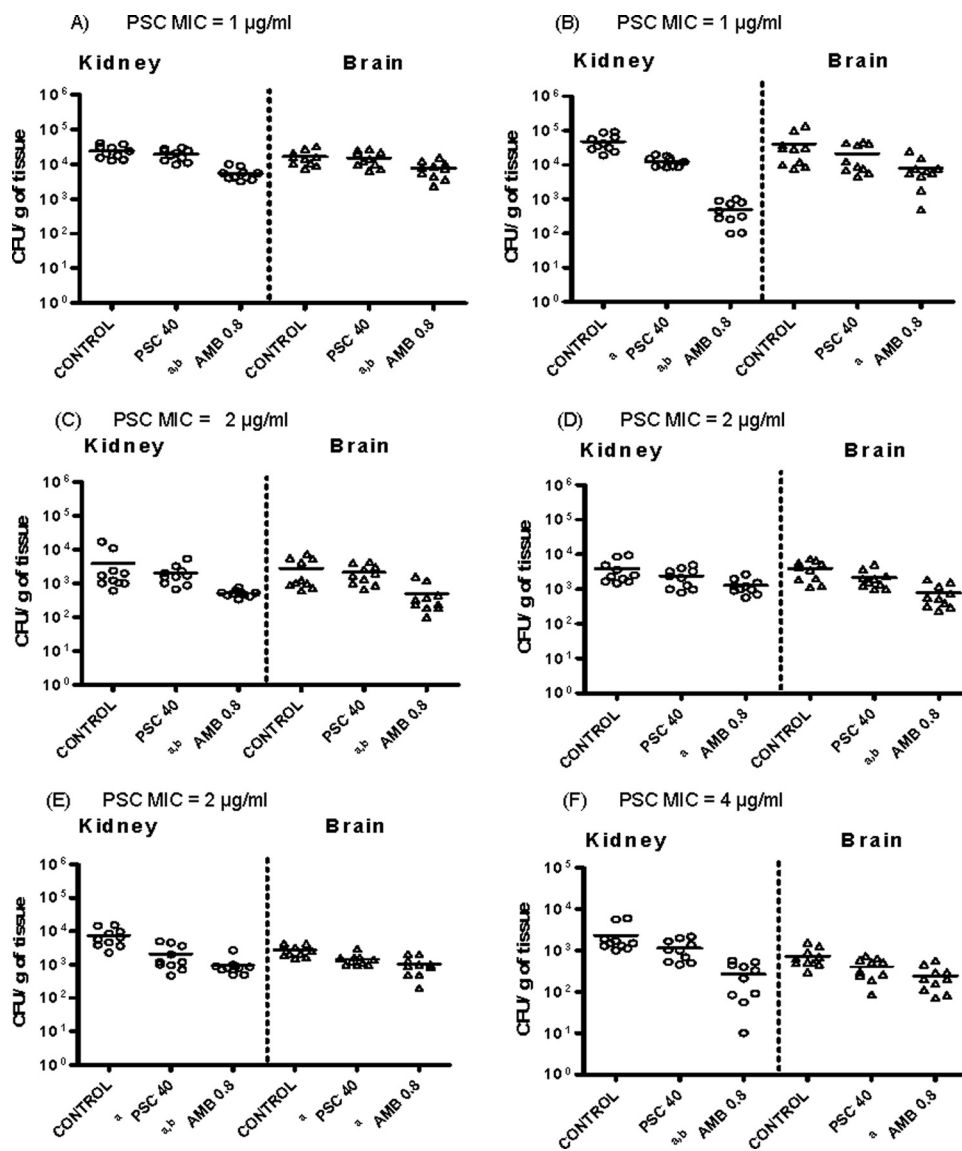


FIG 2 Effects of the antifungal treatment on the fungal load of kidneys and brain of neutropenic mice infected with the following isolates of *M. circinelloides*: UTHSC 06-3784 (A), UTHSC R-3316 (B), UTHSC 01-11 (C), UTHSC 06-1370 (D), UTHSC 04-534 (E), and UTHSC 05-1085 (F). PSC 40, posaconazole administered at 20 mg/kg p.o. twice a day; AMB 0.8, amphotericin B administered at 0.8 mg/kg i.v. once daily. The superscript letters refer to significance values: a, $P < 0.05$ versus the control group; b, $P < 0.05$ versus PSC 40.

sliced into 2-µm sections, which were then stained with hematoxylin and eosin, periodic acid Schiff (PAS), or Grocott methenamine silver and examined in blinded fashion by light microscopy. Additionally, groups of 5 immunosuppressed mice were challenged with the strain UTHSC 05-1085 (posaconazole MIC, 4 µg/ml). They were also treated with the same antifungal drugs, and serum and brain antifungal levels were measured 4 h after drug administration on day 4 of therapy by bioassay (25).

For survival studies, the Kaplan-Meier method and log-rank test were used. Differences were considered statically significant at $P < 0.05$. When multiple comparisons were carried out, the Bonferroni correction was used to avoid an increase in type I error. The results of tissue burden studies were analyzed using the Mann-Whitney U test.

RESULTS

Amphotericin B showed MICs of ≤ 1 µg/ml and IZDs of ≥ 15 mm for all strains tested. For all of the strains tested, the differences between

the MICs and the MFCs of amphotericin B were never >2 dilutions. Posaconazole was less active than amphotericin B, since all of the strains tested showed a MIC range of 1 to 4 µg/ml and an IZD of ≤ 14 mm. On the basis of the zone diameter epidemiological cutoff values for posaconazole (10), our study generally showed no correlation between the results obtained with the microdilution and the disk diffusion methods. The posaconazole MFCs were ≥ 3 dilutions higher than the corresponding MICs (Table 1).

In vivo results are shown in Fig. 1. For all strains tested, amphotericin B significantly prolonged survival with respect to the untreated group and also with respect to posaconazole for one strain (UTHSC 06-1370). Moreover, posaconazole was able to significantly prolong survival with respect to the control mice for three of the strains assayed with different posaconazole MICs (1, 2, and 4 µg/ml).

TABLE 2 Drug levels measured on day 4 (middle of treatment), 4 h after the last dosing in serum and brains

Drug ^a	Drug concn ($\mu\text{g/ml}$; means \pm SD) in:	
	Serum	Brain
PSC 40	7.46 \pm 0.28	6.02 \pm 0.56
AMB 0.8	6.15 \pm 0.89	4.15 \pm 0.52

^a PSC 40, posaconazole administered at 20 mg/kg p.o. twice a day; AMB 0.8, amphotericin B administered at 0.8 mg/kg i.v. once a day.

There were no statistically significant differences in survival rates among mouse groups infected by strains showing different posaconazole MICs. Amphotericin B was effective against all of the strains tested in reducing the fungal load in brain and kidneys with respect to the untreated group and, in some cases, with respect to the group treated with posaconazole. Posaconazole was only able to significantly reduce the fungal load with respect to the control group in kidneys and brain of mice infected with the strain UTHSC 04-534 (posaconazole MIC, 2 $\mu\text{g/ml}$) and in the kidneys of those infected with the strain UTHSC R-3316 (posaconazole MIC, 1 $\mu\text{g/ml}$) (Fig. 2). There was no statistically significant reduction in the fungal load in organs ($P > 0.05$) among mouse groups infected by strains showing different posaconazole MICs.

Bioassay results are shown in Table 2. After the fourth dose, amphotericin B and posaconazole concentrations in serum and brain were above the corresponding MICs for the strain tested.

The histological studies of untreated controls and of mice treated with posaconazole showed abundant fungal invasion in kidneys and brain. Kidney sections showed glomerular and tubular invasion by hyphae with signs of necrosis. There was no inflammatory response observed. Histopathological changes were not related to the posaconazole MICs. No fungal elements were observed in the sections of the organs of mice treated with amphotericin B (Fig. 3).

DISCUSSION

Currently, posaconazole is used as a second-line therapy in patients with infection by mucoralean fungi that are refractory or intolerant to polyenes (11, 17). So far, there is no clinical evidence on the role of posaconazole in infections caused by *M. circinelloides*, and few experimental data have been reported on the efficacy of posaconazole in such infections (17). In the absence of robust clinical data, animal models can play an important role in the assessment of the predictive value of *in vitro* data and testing new therapeutic strategies (17). Therefore, we tried to evaluate the relationship between the *in vitro* susceptibility of several strains of that fungus to posaconazole and their *in vivo* efficacy in an experimental murine model.

Most posaconazole MIC values obtained in the present study were within the range of susceptibility (47%) (10). However, we did not find any correlation between MICs and the IZDs, the low values of the latter being indicative of nonsusceptibility for all isolates tested (9, 10). This is an issue that requires further research, since good agreement between methods has been reported when testing other species of *Mucorales* (14, 20, 24). Likewise, there was also a lack of correlation between MICs and MFCs of posaconazole in this study, since the MFC values were significantly higher than the corresponding MICs. These discrepancies, however, agree with other studies that have tested related fungi

(24, 27). In general, the IZD and MFC values in our study were more predictive of the low efficacy of posaconazole shown *in vivo*.

Although several *in vivo* studies have shown high efficacy of posaconazole against some species of *Mucorales* (5, 12, 22, 24, 29), this drug showed low efficacy against different isolates of *M. circinelloides* in the present study. Our *in vivo* results correlate with the scarce clinical data so far reported that revealed that *M. circinelloides* infections did not respond to treatment with posaconazole (18).

In a previous experimental study using a similar murine model but a different infective inoculum, Sun et al. (29) reported the efficacy of posaconazole at 15 or 30 mg/kg twice a day in prolonging survival and reducing the fungal burden in kidneys of mice infected with a strain of *M. circinelloides* that showed a MIC of 8 $\mu\text{g/ml}$ (29). In the present study, although posaconazole was able to significantly improve the survival of animals infected with three of the six strains tested, it was generally poorly effective in reducing the fungal load in brain and produced variable results in kidneys regardless of the MIC values. The high MFCs together with the poor reduction in the fungal load and the histopathological findings agree with the reported fungistatic activity of posaconazole against some species of *Mucorales* (13). Amphotericin B was more effective than posaconazole in improving the survival and in reducing the fungal load of mice for all strains tested; however, neither 100% survival rates nor fungal organ clearance were achieved.

Although ECVs for mucoralean fungi are not yet available, our results suggest that the use of a posaconazole MIC of 1 $\mu\text{g/ml}$ as a criterion of susceptibility should, at least for *M. circinelloides*, be

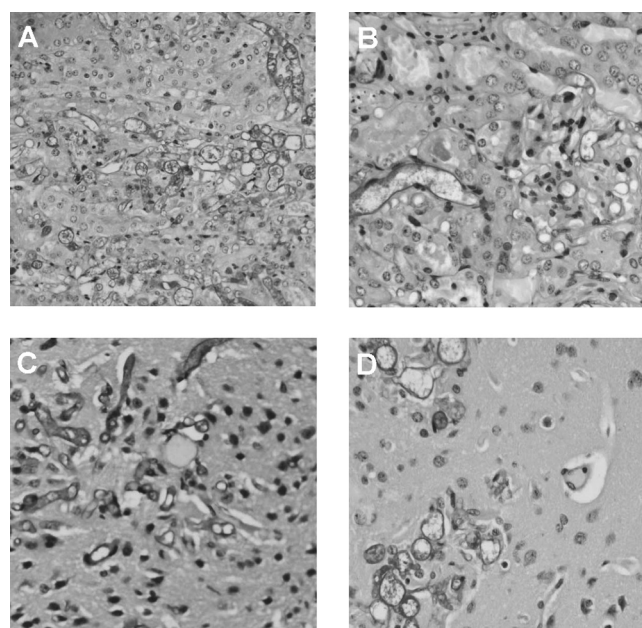


FIG 3 Histopathology of kidney and brain tissues from neutropenic mice infected with *M. circinelloides* strain UTHSC R-3316 and treated with PSC 40. (A) Kidney section of control group (PAS; magnification, $\times 200$); (B) kidney section of mice treated with PSC at 40 mg/kg showing tissue invasion by fungal elements and tissular necrosis (PAS; magnification, $\times 400$); (C) brain section of control group (PAS; magnification, $\times 400$); (D) brain section of mice treated with PSC 40 showing tissue invasion by hyphae but with no necrosis or inflammatory response.

treated with caution, as suggested in general for molds (8, 10). It would be interesting to test strains of *M. circinelloides* with MICs of $<1 \mu\text{g/ml}$, although according the literature, it appears that up to now isolates with such MICs have not been reported (2, 14).

Our results confirm that mucoralean species show important differences in their *in vitro* and *in vivo* responses to antifungal drugs (6, 17, 19), thereby demonstrating that their correct identification is a relevant point in guiding appropriate antifungal therapy. Based on the present data, it seems reasonable to use posaconazole with caution in the treatment of infections by *M. circinelloides* or by strains of *Mucor* not identified to the species level.

REFERENCES

1. Alastruey-Izquierdo A, et al. 2009. Activity of posaconazole and other antifungal agents against *Mucorales* strains identified by sequencing of internal transcribed spacers. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53:1686–1689.
2. Almyroudis NG, Sutton DA, Fothergill AW, Rinaldi MG, Kusne S. 2007. *In vitro* susceptibilities of 217 clinical isolates of zygomycetes to conventional and new antifungal agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51:2587–2590.
3. Alvarez E, et al. 2009. Spectrum of zygomycetes species identified in clinically significant specimens in the United States. *J. Clin. Microbiol.* 47:1650–1656.
4. Alvarez E, et al. 2011. Two new species of *Mucor* from clinical samples. *Med. Mycol.* 49:62–72.
5. Arikan S, Sancak B, Alp S, Hascelik G, McNicholas P. 2008. Comparative *in vitro* activities of posaconazole, voriconazole, itraconazole, and amphotericin B against *Aspergillus* and *Rhizopus*, and synergy testing for *Rhizopus*. *Med. Mycol.* 46:567–573.
6. Balajee SA, et al. 2009. Sequence-based identification of *Aspergillus*, *Fusarium*, and *Mucorales* species in the clinical mycology laboratory: where are we and where should we go from here? *J. Clin. Microbiol.* 47:877–884.
7. Chayakulkeeree M, Ghannoum MA, Perfect JR. 2006. Zygomycosis: the re-emerging fungal infection. *Eur. J. Microbiol. Infect. Dis.* 25:215–229.
8. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2008. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. Approved standard, 2nd ed. Document M38-A2. CLSI, Wayne, PA.
9. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2010. Method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of nondermatophyte filamentous fungi. Approved guideline. Document M51-A. CLSI, Wayne, PA.
10. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2009. Performance standards for antifungal disk diffusion susceptibility testing of filamentous fungi; informational supplement. Document M51-S1 (proposed). CLSI, Wayne, PA.
11. Dannaoui E, García-Hermoso D. 2007. The zygomycetes, p 159–183. *In* Kavanagh K (ed), *New insights in fungal pathogenicity*. Springer Science, Dordrecht, the Netherlands.
12. Dannaoui E, Meis JF, Loebenberg D, Verweij PE. 2003. Activity of posaconazole in treatment of experimental disseminated zygomycosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47:3647–3650.
13. Espinel-Ingroff A. 2003. *In vitro* antifungal activities of anidulafungin and micafungin, licensed agents and the investigational triazole posaconazole as determined by NCCLS methods for 12.052 fungal isolate: review of the literature. *Rev. Iberoam. Micol.* 20:121–136.
14. Espinel-Ingroff A. 2006. Comparison of three commercial assays and a modified disk diffusion assay with two broth microdilution reference assays for testing zygomycetes, *Aspergillus* spp., *Candida* spp., and *Cryptococcus neoformans* with posaconazole and amphotericin B. *J. Clin. Microbiol.* 44:3616–3622.
15. Espinel-Ingroff A, Chaturvedi V, Fothergill A, Rinaldi MG. 2002. Optimal testing conditions for determining MICs and minimum fungicidal concentration of new and established antifungal agents for uncommon moulds: NCCLS collaborative study. *J. Clin. Microbiol.* 40:3776–3781.
16. Graybill JR. 2000. The role of murine models in the development of antifungal therapy for systemic mycoses. *Drug Resist. Updat.* 3:364–383.
17. Guarro J. 2011. Lessons from animal studies for the treatment of invasive human infections due to uncommon fungi. *J. Antimicrob. Chemother.* 66:1447–1466.
18. Khan ZU, Ahmad S, Brazda A, Chandy R. 2009. *Mucor circinelloides* as a cause of invasive maxillofacial zygomycosis: an emerging dimorphic pathogen with reduced susceptibility to posaconazole. *J. Clin. Microbiol.* 47:1244–1248.
19. Larché J, et al. 2005. Diagnosis of cutaneous mucormycosis due to *Rhizopus microsporus* by an innovative PCR-restriction fragment-length polymorphism method. *Clin. Infect. Dis.* 41:1362–1365.
20. Messer SA, et al. 2007. Evaluation of disk diffusion and Etest compared to broth microdilution for antifungal susceptibility testing of posaconazole against clinical isolates of filamentous fungi. *J. Antimicrob. Microbiol.* 45:1322–1324.
21. Ortoneda M, Capilla J, Pastor FJ, Serena C, Guarro J. 2004. Interaction of granulocyte colony-stimulating factor and the high doses of liposomal amphotericin B in the treatment of systemic murine scedosporiosis. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 50:247–251.
22. Pastor FJ, et al. 2010. *In vitro* and *in vivo* antifungal susceptibilities of the Mucoralean fungus *Cunninghamella*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54:4550–4555.
23. Ribes JA, Vanover-Sams CL, Baker DJ. 2000. Zygomycetes in human disease. *Clin. Microbiol. Rev.* 13:236–301.
24. Rodríguez MM, et al. 2010. Correlation between *in vitro* activity of posaconazole and *in vivo* efficacy against *Rhizopus oryzae* infection in mice. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54:1665–1669.
25. Rodríguez MM, et al. 2009. Correlation of *in vitro* activity, serum levels, and *in vivo* efficacy of posaconazole against *Rhizopus microsporus* in a murine disseminated infection. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53:5022–5025.
26. Spellberg B, Jonh E, Jr, Ibrahim A. 2005. Novel perspectives on mucormycosis: pathophysiology, presentation, and management. *Clin. Microbiol. Rev.* 18:556–569.
27. Spreghini E, Orlando F, Giannini D, Barchiesi F. 2010. *In vitro* and *in vivo* activities of posaconazole against zygomycetes with various degrees of susceptibility. *J. Antimicrob. Chemother.* 65:2158–2163.
28. Sun QN, Fothergill AW, McCarthy DJ, Rinaldi MG, Graybill JR. 2002. *In vitro* activities of posaconazole, itraconazole, voriconazole, amphotericin B, and fluconazole against 37 clinical isolates of zygomycetes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46:1581–1582.
29. Sun QN, Najvar LK, Bocanegra R, Loebenberg D, Graybill JR. 2002. *In vivo* activity of posaconazole against *Mucor* spp. in an immunosuppressed-mouse model. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46:2310–2312.

4.7. Eficacia del posaconazol en un modelo murino de infección diseminada por *Apophysomyces variabilis*.

Efficacy of posaconazole in a murine model of disseminated infection caused by *Apophysomyces variabilis*.

Salas V, Pastor FJ, Calvo E, Sutton DA, Chander J, Mayayo E, Alvarez E, Guarro J.

Journal Antimicrobial Chemotherapy. 2012, 67: 1712-1715

Efficacy of posaconazole in a murine model of disseminated infection caused by *Apophysomyces variabilis*

Valentina Salas¹, F. Javier Pastor¹, Enrique Calvo¹, Deanna A. Sutton², Jagdish Chander³, Emilio Mayayo⁴, Eduardo Alvarez¹ and Josep Guarro^{1*}

¹Unitat de Microbiologia, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, IISPV, Universitat Rovira i Virgili, Reus, Spain; ²Fungus Testing Laboratory, University of Texas Health Science Center, San Antonio, TX, USA; ³Department of Microbiology, Government Medical College Hospital, Chandigarh, India; ⁴Unitat de Anatomia Patològica, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, IISPV, Universitat Rovira i Virgili, Reus, Spain

*Corresponding author. Tel: +34-977-759359; Fax: +34-977-759322; E-mail: josep.guarro@urv.cat

Received 2 December 2011; returned 19 January 2012; revised 20 February 2012; accepted 25 February 2012

Objectives: We evaluated the *in vitro* activity of posaconazole and amphotericin B against several clinical strains of the mucoralean fungus *Apophysomyces variabilis*, and their efficacy in a murine model of disseminated infection caused by that fungus.

Methods: The *in vitro* susceptibility of seven strains of *A. variabilis* to posaconazole and amphotericin B was determined by using a broth microdilution method. The *in vivo* efficacy of both drugs, posaconazole at 20 mg/kg twice daily orally by gavage and amphotericin B at 0.8 mg/kg once daily intravenously, was evaluated against six of the strains previously tested *in vitro* using immunocompetent mice.

Results: In general, MICs of both drugs were within the range of susceptibility or intermediate susceptibility. Posaconazole and amphotericin B were able to significantly reduce the percentages of positive cultures in the affected tissues. However, in general, posaconazole significantly improved survival (median, 23 days; range, 7–30 days) compared with untreated controls (median, 6 days; range, 4–7 days) and, in some cases, with respect to the animals treated with amphotericin B (median, 15 days; range, 5–30 days).

Conclusions: Our results demonstrate the efficacy of posaconazole in the treatment of a disseminated murine infection caused by *A. variabilis*. However, further clinical studies are required to ascertain the potential use in human infections caused by this fungus.

Keywords: antifungal, animal models, fungal infections, *A. variabilis*

Introduction

Apophysomyces is a genus of the order Mucorales that typically causes necrotizing fasciitis in humans and primarily infects immunocompetent hosts.^{1,2} Recent physiological, genetic and morphological data have demonstrated that the genus *Apophysomyces* comprises at least four species, i.e. *Apophysomyces elegans*, *Apophysomyces variabilis*, *Apophysomyces ossiformis* and *Apophysomyces trapeziformis*.³ The clinical role of these new species is not yet known, but it seems that the prevalent species in clinical cases is *A. variabilis*,⁴ although *A. trapeziformis* recently infected 13 individuals injured in a tornado in the USA.⁵

Amphotericin B is the recommended drug for treating infections caused by members of Mucorales, but it has failed in an important number of infections.¹ Posaconazole is a good

alternative in the treatment of infections that are refractory or intolerant to polyenes.^{4,6} However, there have been few clinical data on the use of posaconazole in the management of *Apophysomyces* infections.⁷ Given the lack of clinical experience, animal models can be a predictive source of information on the efficacy of new therapeutic strategies.⁴ We tested the *in vitro* and *in vivo* activity of posaconazole and amphotericin B against a set of clinical strains of *A. variabilis* in a murine model of infection caused by this fungus.

Methods

Seven clinical strains of *A. variabilis* molecularly identified³ were used in the *in vitro* study (see Table 1). Their susceptibility to posaconazole and amphotericin B was evaluated using a reference method.⁸ The MIC (in mg/L) was read at 24 h.⁸

For the murine studies we randomly chose six of the strains previously tested *in vitro*.

On the day of infection, cultures on Czapek agar (CZA) were suspended in sterile saline and filtered through sterile gauze to remove clumps of sporangiospores or hyphae. The resulting suspensions were adjusted based on haemocytometer counts and by serial plating on CZA to confirm viability.

Male OF1 mice (Charles River) aged 6 weeks and weighing 30 g were used. All animal care procedures were supervised and approved by the Universitat Rovira i Virgili Animal Welfare and Ethics Committee. Immunocompetent mice were challenged with 1×10^3 cfu in 0.2 mL of

sterile saline and injected via the lateral tail vein. Preliminary experiments testing several strains demonstrated that this inoculum was appropriate for producing an acute infection, with 100% of the animals dying within 7 days (data not shown).

The drugs assayed were posaconazole (Noxafil, Schering-Plough Ltd, Hertfordshire, UK) administered at 20 mg/kg of body weight orally by gavage twice daily and amphotericin B (amphotericin B deoxycholate, Xalabarder Pharmacy, Barcelona, Spain) administered at 0.8 mg/kg of body weight intravenously once daily. The doses were selected on the basis of previous experimental studies in which good efficacy was demonstrated against other species of Mucorales.⁹

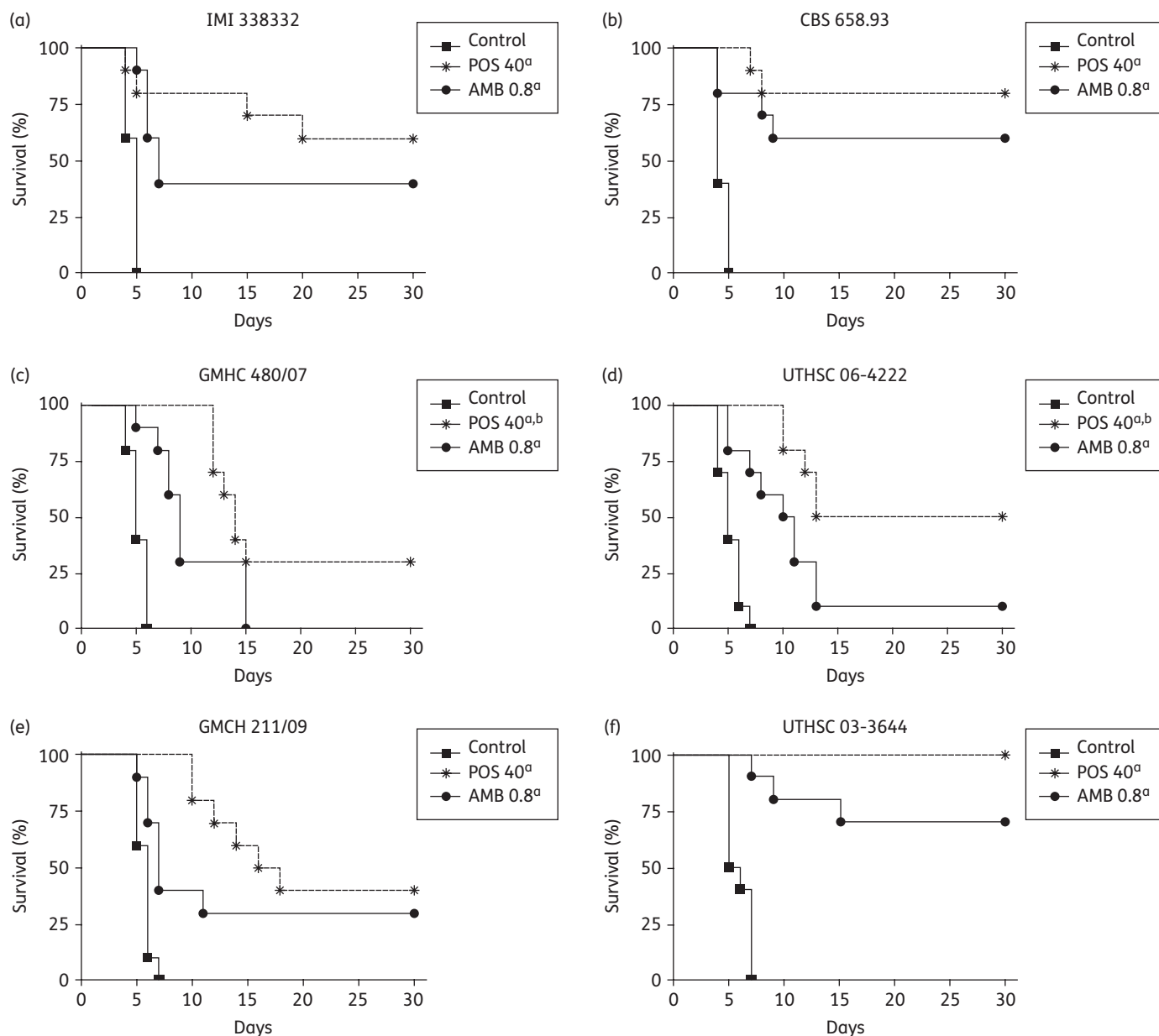


Figure 1. Cumulative mortality of mice infected with *A. variabilis* (a) IMI 338332, (b) CBS 658.93, (c) GMCH 480/07, (d) UTHSC 06-4222, (e) GMCH 211/09 and (f) UTHSC 03-3644. IMI, International Mycological Institute, CABI-Bioscience, Egham, UK; CBS, Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, the Netherlands; GMCH, Government Medical College Hospital, Chandigarh, India; UTHSC, Fungus Testing Laboratory, University of Texas Health Science Center, San Antonio, TX, USA; POS 40, posaconazole administered at 20 mg/kg orally twice daily; AMB 0.8, amphotericin B administered at 0.8 mg/kg intravenously once daily. ^a $P < 0.05$ versus control. ^b $P < 0.05$ versus AMB 0.8.

The efficacy of posaconazole and amphotericin B was evaluated based on the results of survival, tissue burden reduction and histopathological studies. All treatments began 1 day after infection and lasted for 7 days. For survival studies, groups of 10 mice were randomly established for each strain and each treatment, and were checked daily for 30 days after challenge. Control groups received no treatment. For tissue burden studies, groups of 10 mice were also established and the animals were sacrificed on day 4 post-infection in order to compare the results with living controls.

Lungs, kidneys, liver, spleen and brain were aseptically removed, and then approximately half of each organ was cut using a sterile scalpel and five small pieces were put on the surface of CZA medium plates. To ensure the reproducibility of the experiments, samples were cultured in duplicate. The plates were incubated for 24 h at 40°C³ and were observed under a stereoscopic microscope to check for the presence of fungal growth. Statistical significance for the tissue culture study was estimated by the Mann-Whitney *U*-test. The mean survival time was estimated by the Kaplan-Meier method and compared among groups by using the log-rank test.

For the histopathology study, half of each organ was fixed with 10% buffered formalin. Samples were dehydrated, paraffin embedded and sliced into 2 µm sections, which were stained with haematoxylin and eosin, periodic acid-Schiff or Grocott's methenamine silver and examined in a blinded fashion by light microscopy. Additionally, groups of five immunocompetent mice were challenged with the strain GMCH 211/09 and treated with 0.8 mg/kg amphotericin B once daily or 20 mg/kg posaconazole twice daily to determine the levels of these drugs in serum and brain by bioassay 4 h after administering the drug on day 4 of therapy.⁹

Results

Following the suggested working breakpoints against Mucorales,⁸ 86% of the strains tested were susceptible to posaconazole and 29% to amphotericin B (MIC=1 mg/L), while the others showed intermediate susceptibility to both drugs (MIC=2 mg/L). *In vitro* resistance was not observed in any case.

Posaconazole and amphotericin B were able to significantly prolong survival with respect to the control group for all the strains tested. Moreover, posaconazole also significantly prolonged survival compared with amphotericin B for two strains (Figure 1).

The organ cultures of the control animals were always positive with the exception of the lungs, which were the least affected organs. In general, both drugs were effective in reducing the percentages of positive cultures from the affected tissues with respect to the control group, with the exception of the strain GMCH 480/07, for which amphotericin B was only able to reduce the fungal load in the lungs and not in the other organs. In addition, posaconazole reduced the fungal load in the kidneys with respect to amphotericin B for the strain IMI 338332 (Table 1).

At day 4 of treatment, posaconazole and amphotericin B levels in serum (7.15±0.16 and 6.05±0.62 mg/L, respectively) and brain (6.10±0.86 and 4.95±0.71 mg/g, respectively) were above the corresponding MICs for the isolates tested. Here, the limit of detection was found to be 0.125 mg/L for both of the drugs assayed.

The histological studies of controls revealed that the kidneys were the most affected organs. All organs tested showed abundant fungal elements, with infiltration by hyphae in the blood vessels, but fungal invasion was not observed in the lungs. Kidney sections showed glomerular and tubular invasion by hyphae, with signs of tubular necrosis and an inflammatory response. Fungal elements, necrosis and an inflammatory

Table 1. Results of microscopic examination expressed as a percentage of positive cultures

Strains	Treatments	Percentage of positive cultures (five pieces of each tissue×10 mice)				
		kidney	spleen	liver	lung	brain
IMI 338332	none	100	92	96	48	74
	POS 40	22 ^{a,b}	72 ^a	68 ^a	0 ^a	18 ^a
	AMB 0.8	80	52 ^a	50 ^a	18 ^a	20 ^a
CBS 658.93	none	90	90	100	34	58
	POS 40	10 ^a	28 ^a	44 ^a	0 ^a	6 ^a
	AMB 0.8	6 ^a	36 ^a	66 ^a	0 ^a	8 ^a
GMCH 480/07	none	96	92	84	68	78
	POS 40	44 ^a	38 ^a	36 ^a	0 ^a	40
	AMB 0.8	68	66	82	8 ^a	56
UTHSC 06-4222	none	92	84	96	76	80
	POS 40	12 ^a	16 ^a	40 ^a	0 ^a	8 ^a
	AMB 0.8	14 ^a	28 ^a	14 ^a	0 ^a	6 ^a
GMCH 211/09	none	90	90	92	38	82
	POS 40	28 ^a	26 ^a	48 ^a	0 ^a	6 ^a
	AMB 0.8	12 ^a	50 ^a	78	0 ^a	16 ^a
UTHSC 03-3644	none	88	86	88	40	76
	POS 40	6 ^a	30 ^a	40 ^a	0 ^a	12 ^a
	AMB 0.8	12 ^a	38 ^a	74 ^a	0 ^a	10 ^a

IMI, International Mycological Institute, CABI-Bioscience, Egham, UK; CBS, Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, the Netherlands; GMCH, Government Medical College Hospital, Chandigarh, India; UTHSC, Fungus Testing Laboratory, University of Texas Health Science Center, San Antonio, TX, USA; POS 40, posaconazole administered at 20 mg/kg orally twice daily; AMB 0.8, amphotericin B administered at 0.8 mg/kg intravenously once daily.

^a*P*<0.05 versus control.

^b*P*<0.05 versus AMB 0.8.

response were observed in kidney sections of mice treated with amphotericin B. Mice treated with posaconazole showed renal, hepatic and splenic congestion, but there were no signs of necrosis or inflammatory response and few fungal elements, which were only observed in the kidneys.

Discussion

Infections caused by *Apophysomyces* are associated with severe morbidity and high mortality rates.¹ In experimental studies, *Apophysomyces* has proven to be more virulent for mice than other species of Mucorales.¹⁰

To our knowledge, this is the first experimental study that has explored the efficacy of antifungal drugs against a relatively high number of strains of *Apophysomyces*. Previously, Dannaoui *et al.*¹⁰ showed a high efficacy of amphotericin B against one strain of *A. elegans*. In this study, the efficacy of that drug was more modest. However, our study differed in some relevant aspects, such as the treatment schedules, dosages and route of administration of amphotericin B, which makes any comparison difficult. Data on the efficacy of amphotericin B in the treatment of *Apophysomyces* infections are controversial. Of the four clinical cases reported by Chander *et al.*,⁶ only one of the two

treated with amphotericin B showed a successful outcome. In another retrospective study, a favourable outcome was obtained in 9 of the 13 patients treated with amphotericin B, regardless of the MIC values.¹¹ The identity of the species of *Apophysomyces* involved in those infections is unknown, although they were attributed to *A. elegans*. It is likely that they were caused by *A. variabilis*, which seems to be a more prevalent species of the genus.¹ We expect now that as more reliable methods for the identification of the species of *Apophysomyces* are available,³ our understanding of the clinical role of the different species of the genus will improve.

In our study, although the two drugs tested significantly reduced the presence of hyphae in infected tissues, posaconazole was more effective than amphotericin B in improving survival. Up to now, posaconazole has been successfully used in one patient with an *Apophysomyces* infection that was resistant to amphotericin B.⁷

In this study, most of the posaconazole MICs were within the range of susceptibility (1 mg/L) or intermediate susceptibility (2 mg/L), and correlation between the outcome and MICs was not observed. This was probably due to the difference of only one dilution, which is not enough to categorize different degrees of susceptibility.

However, in any case, it would be interesting in future animal studies to refine these results with posaconazole MICs <1 mg/L, if they are available, in order to define as accurately as possible the MICs that better correlate with *in vivo* outcome.

In summary, posaconazole showed good efficacy in our experimental model of disseminated infection and merits further investigation in order to develop effective treatments for human infections caused by *A. variabilis*.

Acknowledgements

We thank the curators of CBS (Utrecht, The Netherlands) and CABI-Bioscience (Egham, UK) culture collections for providing some of the strains used in this study.

Funding

This study was supported by internal funding.

Transparency declarations

None to declare.

References

- 1 Guarro J, Chander J, Alvarez E et al. *Apophysomyces variabilis* infections in humans. *Emerg Infect Dis* 2011; **17**: 134–5.
- 2 Gomes MZ, Lewis RE, Kontoyiannis DP. Mucormycosis caused by unusual mucormycetes, non-*Rhizopus*, -*Mucor*, and -*Lichtheimia* species. *Clin Microbiol Rev* 2011; **24**: 411–45.
- 3 Alvarez E, Stchigel A, Cano J et al. Molecular phylogenetic diversity of the emerging Mucorales fungus *Apophysomyces*: proposal of three new species. *Rev Iberoam Micol* 2010; **27**: 80–9.
- 4 Guarro J. Lessons from animal studies for the treatment of invasive human infections due to uncommon fungi. *J Antimicrob Chemother* 2011; **66**: 1447–66.
- 5 Benedict K, Adenbajo T, Harris J et al. Fatal fungal soft-tissue infections after a tornado—Joplin, Missouri, 2011. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2011; **60**: 992.
- 6 Chander J, Kaur J, Attri A et al. Primary cutaneous zygomycosis from a tertiary care centre in north-west India. *Indian J Med Res* 2010; **131**: 765–70.
- 7 Ferguson TD, Schniederjan SD, Dionne-Odom J et al. Posaconazole treatment for *Apophysomyces elegans* rhino-orbital zygomycosis following trauma for a male with well-controlled diabetes. *J Clin Microbiol* 2007; **45**: 1648–51.
- 8 Clinical and Laboratory Standards Institute. *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi—Second Edition: Approved Standard M38-A2*. CLSI, Wayne, PA, USA, 2008.
- 9 Rodríguez MM, Pastor FJ, Calvo E et al. Correlation of *in vitro* activity, serum levels, and *in vivo* efficacy of posaconazole against *Rhizopus microsporus* in a murine disseminated infection. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; **53**: 5022–5.
- 10 Dannaoui E, Mouton JW, Meis JF et al. Efficacy of antifungal therapy in a nonneutropenic murine model of zygomycosis. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; **46**: 1953–9.
- 11 Chakrabarti A, Shivaprakash MR, Curfs-Breuker I et al. *Apophysomyces elegans*: epidemiology, amplified fragment length polymorphism type, and *in vitro* antifungal susceptibility pattern. *J Clin Microbiol* 2010; **48**: 4580–5.

4.8. Modelo murino experimental de infección diseminada causada por *Saksenaea vasiformis*: éxito del tratamiento con posaconazol.

Experimental murine model of disseminated infection by *Saksenaea vasiformis*: successful treatment with posaconazole.

Salas V, Pastor FJ, Calvo E, Sutton D, García-Hermoso D, Mayayo E, Dromer F, Fothergill A, Alvarez E, Guarro J.

Medical Mycology. 2012, Doi:
10.3109/13693786.2012.673137

Experimental murine model of disseminated infection by *Saksenaea vasiformis*: successful treatment with posaconazole

VALENTINA SALAS*, F. JAVIER PASTOR*, ENRIQUE CALVO*, DEANNA SUTTON†, DEA GARCÍA-HERMOSO#§, EMILIO MAYAYO*‡, FRANÇOISE DROMER#§, ANETTE FOTHERGILL†, EDUARDO ALVAREZ* & JOSEP GUARRO*

*Unitat de Microbiologia and ‡Unitat de Anatomia Patològica Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, IISPV, Universitat Rovira i Virgili, Reus, Spain, †Fungus Testing Laboratory University of Texas Health Science Center, San Antonio, Texas, USA, and #Institut Pasteur, Molecular Mycology Unit, and National Reference Center of Mycoses and Antifungal Agents and §CNRS URA3012, Paris, Cedex 15, France

We have determined the *in vitro* activity of amphotericin B (AMB) and posaconazole (PSC) against *Saksenaea vasiformis* using broth microdilution and disk diffusion methods and determined the minimal fungicidal concentration (MFC). PSC was found to have the greatest *in vitro* activity in all cases and was the most efficacious in prolonging survival and reducing the fungal load in an immunocompetent murine model of disseminated infection caused by four strains of the fungus.

Keywords murine model, posaconazole, *S. vasiformis*

Introduction

Saksenaea vasiformis is an emerging pathogenic fungus belonging to the order *Mucorales*, which is capable of causing severe infections affecting mainly immunocompetent hosts [1–5]. However, it also may be the etiologic agent of infections in immunocompromised patients, most commonly those with leukemia and other haematological conditions, uncontrolled diabetes, and under therapy with corticoids [6,7]. Similar to other mucormycoses (infections caused by members of *Mucorales*), *Saksenaea* infection is characterized by angioinvasion with subsequent tissue necrosis, including cutaneous and subcutaneous involvement, associated commonly with traumatic inoculation. However, rhino-orbito-cerebral and disseminated infections have also been reported [7–9]. Traditionally, *Saksenaea* has been considered a monotypic genus, but a recent molecular study demonstrated that there are three species, i.e., *S. vasiformis*, *S. erythrospora* and *S. oblongispora* [10]. The clinical relevance and incidence of infections caused by the proposed new species remains unknown, although a fatal

case of *S. erythrospora* infection in a male wounded during combat operations in Iraq has been reported recently [11]. In general, the management of mucormycosis requires rapid diagnosis, aggressive surgical debridement, and early initiation of appropriate antifungal therapy; Amphotericin B (AMB) or its lipid formulations being the drugs of choice for treating these infections [12,13]. At present, posaconazole (PSC) is considered a reasonable option for patients with mucormycosis who are intolerant of or whose infections are refractory to polyenes [13].

We have tested the *in vitro* activity of PSC and AMB against *S. vasiformis* using different methods and evaluated their effectiveness against four strains of the fungus in an immunocompetent murine model of disseminated infection.

Material and methods

Eight strains, molecularly identified as *Saksenaea vasiformis* [10], were used in the *in vitro* study. PSC (Schering-Plough, Kenilworth, NJ, USA) and AMB (USP; Rockville, MD, USA) were obtained as pure powders and both were dissolved in dimethyl sulfoxide. The susceptibilities were evaluated at 24 h in duplicate on separate occasions by the determination of the minimum inhibitory concentrations (MICs, in µg/ml), the inhibition zone diameters (IZDs, in mm), and the minimum fungicidal concentrations (MFCs, in µg/ml). MICs were determined by a broth microdilution

Received 15 December 2011; Received in final revised form 9 February 2012; Accepted 3 March 2012

Correspondence: Josep Guarro, Unitat de Microbiologia, Facultat de Medicina, Universitat Rovira i Virgili, Carrer Sant Llorenç, 21. 43201 Reus, Spain. Tel.: 977 759359; Fax: 977 759322. E-mail: josep.guarro@urv.cat

method following the CLSI guidelines for filamentous fungi [14], while IZDs were determined according to the CLSI guidelines for disk-diffusion testing of molds [15]. The MFC ($\mu\text{g/ml}$) was established by subculturing *S. vasiformis* onto Czapek agar plates (CZA) 20 μl of each well that showed complete inhibition (100% inhibition or an optically clear well) relative to the last positive well and the growth control. The plates were incubated at 35°C until there was visible growth in the control subculture. The MFC was considered as the lowest drug concentration at which approximately 99.9% of the original inoculum was inactivated. On the few occasions that the two MIC or MFC values did not coincide, the test was repeated and the modal was considered. The suggested breakpoints for PSC and AMB against molds are; susceptible (S), $\leq 1 \mu\text{g/ml}$; intermediate (I), $2 \mu\text{g/ml}$; and resistant (R), $\geq 4 \mu\text{g/ml}$ [14]. The IZD, expressed as the mean values, were considered indicative of susceptibility to PSC and AMB when they were ≥ 17 and ≥ 15 mm, respectively [16].

We randomly chose four of the strains previously tested *in vitro* for the murine studies, i.e., NRRL 2443, FMR 10131, FMR 10972 and UTHSC R-2974. The isolates were stored at -80°C , and subcultured prior to testing on Czapek agar (CZA) at 35°C [10]. On the day of the infection of the test mice, the contents of the CZA cultures were suspended in sterile saline and filtered through sterile gauze to remove clumps of sporangiospores or hyphae. The resulting suspensions of sporangiospores were adjusted to the desired inoculum based on haemocytometer counts and were serially inoculated onto CZA to confirm viability.

Male OF1 mice (Charles River, Criffa S.A., Barcelona, Spain) weighing 30 g were used in this study. Animals were housed under standard conditions, with all care procedures supervised and approved by the Universitat Rovira i Virgili Animal Welfare and Ethics Committee. Groups of 20 immunocompetent mice were challenged with 8×10^3 CFU (colony forming units) of NRRL 2443, 1×10^4 CFU of FMR 10131 and UTHSC R-2974, or 1×10^3 CFU of FMR 10972 in 0.2 ml of sterile saline, injected via the lateral tail vein. Preliminary experiments demonstrated that these concentrations were the optimal doses to initiate acute infections, with 100% of the animals dying within 8 days (data not shown).

The drugs assayed were PSC (Noxafil, Schering-Plough Ltd, Hertfordshire UK), administered orally by gavage twice a day (BID) at 20 mg/kg of body weight/dose. Each dose was prepared by diluting the oral suspension of PSC with sterile water to the desired concentration. Liposomal amphotericin B (LAMB) (Gilead Sciences S.A., Madrid, Spain) was reconstituted with sterile distilled water and further diluted in sterile 5% dextrose solution to be administered intravenously once a day (QD) at 5 mg/kg of body weight/dose. The doses selected were based on previous

studies that have shown good efficacy in experimental murine infections against other species of filamentous fungi, including Mucorales species [17–20].

The efficacy of each drug was evaluated by the prolongation of survival in comparison to controls, tissue burden reduction and histopathological studies. Treatments began one day after infection, and lasted for 7 days. For survival studies, groups of 10 mice were randomly established for each fungal strain and each treatment and checked daily for 30 days after challenge. Controls received no treatment. For tissue burden studies, groups of 10 mice were also established and the animals sacrificed on day 4 post-infection in order to compare the results with controls.

Lungs, kidneys, liver, spleen and brain were aseptically removed and approximately half of each organ was sliced with a sterile scalpel into five small pieces and transferred to the surface of CZA. To ensure the reproducibility of the experiments, duplicate cultures were prepared. The plates were incubated for 24 h at 35°C [10] and were observed under a stereoscopic microscope to check for the presence of fungal growth. Categorical data was expressed as a percentage of mice infected, and the Fisher's exact test was used for statistical analysis. Mean survival time was estimated by the Kaplan-Meier method and compared among groups by using the log-rank test.

For the histopathology study, half of each organ was fixed with 10% buffered formalin. Samples were then dehydrated, paraffin embedded and sliced into 2 μm sections which were stained with Haematoxylin-Eosin (H-E), Periodic acid Schiff (PAS) or Grocott methenamine silver (GMS) and examined by light microscopy in a blinded fashion.

Results

The results of antifungal *in vitro* susceptibility tests are shown in Table 1. In general, the MICs and IZDs of the test strains to PSC and AMB were indicative of susceptibility.

Table 1 *In vitro* activity of PSC and AMB against eight isolates of *Saksenaia vasiformis*

Strains	MIC ($\mu\text{g/ml}$)		IZD (mm)		MFC ($\mu\text{g/ml}$)	
	PSC	AMB	PSC	AMB	PSC	AMB
FMR 10131	0.12	1	30	18	0.12	1
UTHSC 09-528	0.12	2	31	16	0.12	2
UTHSC 08-379	0.12	1	29	21	0.12	1
UTHSC R-2974	0.06	1	30	22	0.06	1
CNRMAF/ 9-83	0.06	1	30	18	0.06	1
NRRL 2443	0.25	2	26	12	0.25	2
ATCC 28740	0.12	1	27	15	0.12	1
FMR 10972	0.12	1	23	18	0.12	1

MIC, minimal inhibitory concentration ($\mu\text{g/ml}$); IZD, inhibition zones diameters (mm); MFC, minimal fungicidal concentration ($\mu\text{g/ml}$).

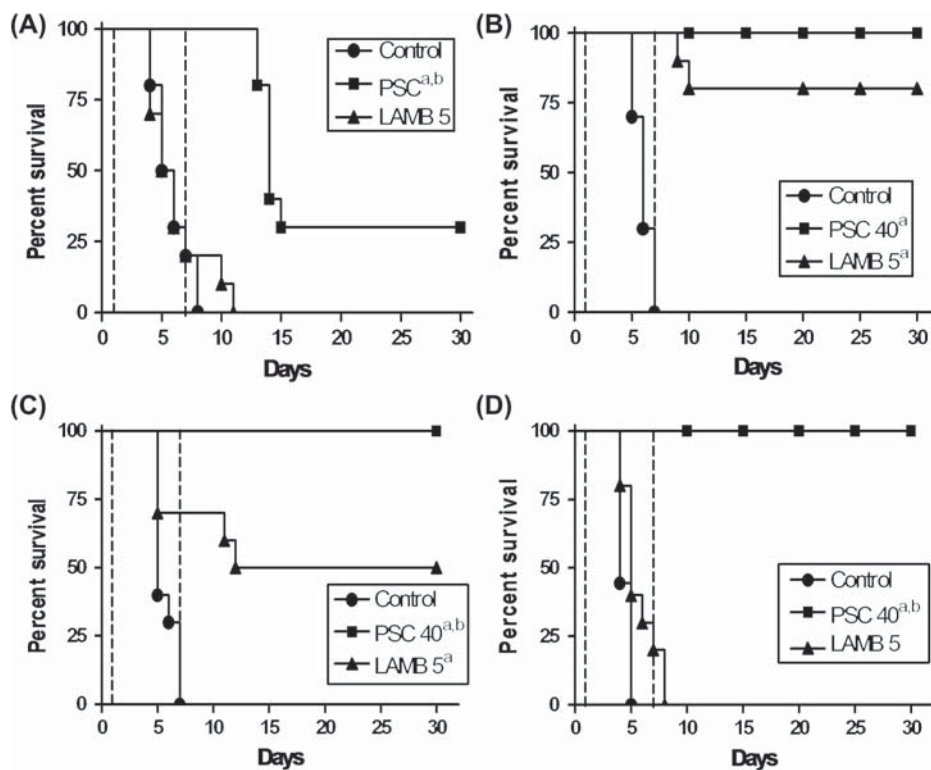


Fig. 1 Cumulative mortality of mice infected with *Saksenea vasiformis* (A) NRRL 2443, (B) FMR 10131, (C) FMR 10972, and (D), UTHSC R-2974. PSC 40, posaconazole administered at 20 mg/kg orally twice a day; LAMB 5, liposomal amphotericin B administered at 5 mg/kg intravenously once a day. ^a*P* < 0.05 versus control, ^b*P* < 0.05 vs. LAMB 5. Start and end of treatment period are indicated by the vertical lines (day 1 and 7, respectively).

For all strains, the MFCs and MICs were similar indicating that both drugs had a fungicidal effect, with the differences between MICs never > 1 dilution.

Results of survival studies are shown in Fig. 1. Generally better results were obtained with PSC than LAMB, which correlated with *in vitro* data. The survival of the mice

infected with isolates with the lowest PSC MICs (0.06–0.12 µg/ml) was 100%, while animals infected by the strain with a PSC MICs of 0.25 µg/ml was 30%. LAMB only prolonged survival with regard to two strains within the control group. There were no significant differences among the median survival rates of the control groups infected by the

Table 2 Effects of PSC and LAMB on the positive fungal cultures of organs of mice infected with *Saksenea vasiformis* represented as the number of mice with infection in the organs.

Strains	Treatments mg/kg	No. of mice with infection in the organs (<i>n</i> = 10 animals per group)				
		Kidney	Spleen	Liver	Lung	Brain
NRRL 2443	None	10/10	10/10	10/10	7/10	9/10
	PSC 40	0/10 ^{a,b}	2/10 ^{a,b}	1/10 ^{a,b}	0/10 ^a	3/10 ^{a,b}
	LAMB 5	10/10	9/10	10/10	2/10 ^a	9/10
FMR 10131	None	10/10	10/10	10/10	4/10	3/10
	PSC 40	0/10 ^a	4/10 ^{a,b}	3/10 ^a	0/10	0/10
	LAMB 5	3/10 ^a	10/10	6/10	0/10	2/10
FMR 10972	None	10/10	10/10	10/10	5/10	7/10
	PSC 40	0/10 ^{a,b}	5/10 ^a	4/10 ^{a,b}	0/10 ^a	0/10 ^{a,b}
	LAMB 5	6/10	8/10	9/10	0/10 ^a	4/10 ^a
UTHSC R-2974	None	10/10	10/10	10/10	9/10	10/10
	PSC 40	0/10 ^{a,b}	4/10 ^{a,b}	3/10 ^{a,b}	0/10 ^{a,b}	5/10 ^a
	LAMB 5	10/10	10/10	10/10	7/10	8/10

PSC 40, posaconazole administered at 20 mg/kg orally twice a day; LAMB 5, liposomal amphotericin B administered at 5 mg/kg intravenously once a day.

^a*P* < 0.05 versus control, ^b*P* < 0.05 vs. LAMB 5.

different isolates tested. Generally, PSC was able to significantly reduce the percentage of mice infected with all fungal strains from which tissue samples yielded positive cultures as compared to the control group. The exception to this finding was lung and brain samples of mice inoculated with strain FMR 10131. Similar results were obtained in some cases in comparison to animals treated with LAMB.

In addition, in those mice treated with PSC, no positive cultures were obtained from kidneys and lungs irrespective of the test organism and from brain samples of animals challenged with the strains FMR 10131 or FMR10972. The efficacy of LAMB was considerably lower and in two strains only reduced fungal growth in one of the five sampled organs (Table 2).

In general, the histological study revealed signs of congestion in all organs of the control animals and of those treated with PSC and LAMB. Abundant fungal elements were observed in all organs of untreated mice, especially in the kidney; the latter that showed glomerular and tubular inva-

sion by hyphae with necrosis and inflammatory response. A few fungal elements and inflammatory responses were observed in the sections of the kidneys of the mice treated with LAMB. No fungal invasion was observed in the sections of the organs of mice treated with PSC (Fig. 2).

Discussion

Infections caused by *Saksenaea* are less frequent than those produced by other members of the Mucorales, although their incidence might be underestimated because this fungus requires special culture techniques to induce sporulation that facilitates its identification [1,6,7,10]. Data on the antifungal susceptibility of this fungus is limited. In previous studies, PSC has been shown to be more active *in vitro* than AMB against *S. vasiformis* [10,21]. In our study, PSC also showed high activity *in vitro* against all strains tested. In addition, we found excellent correlation relative to the MFC *in vitro* results obtained with microdilution and

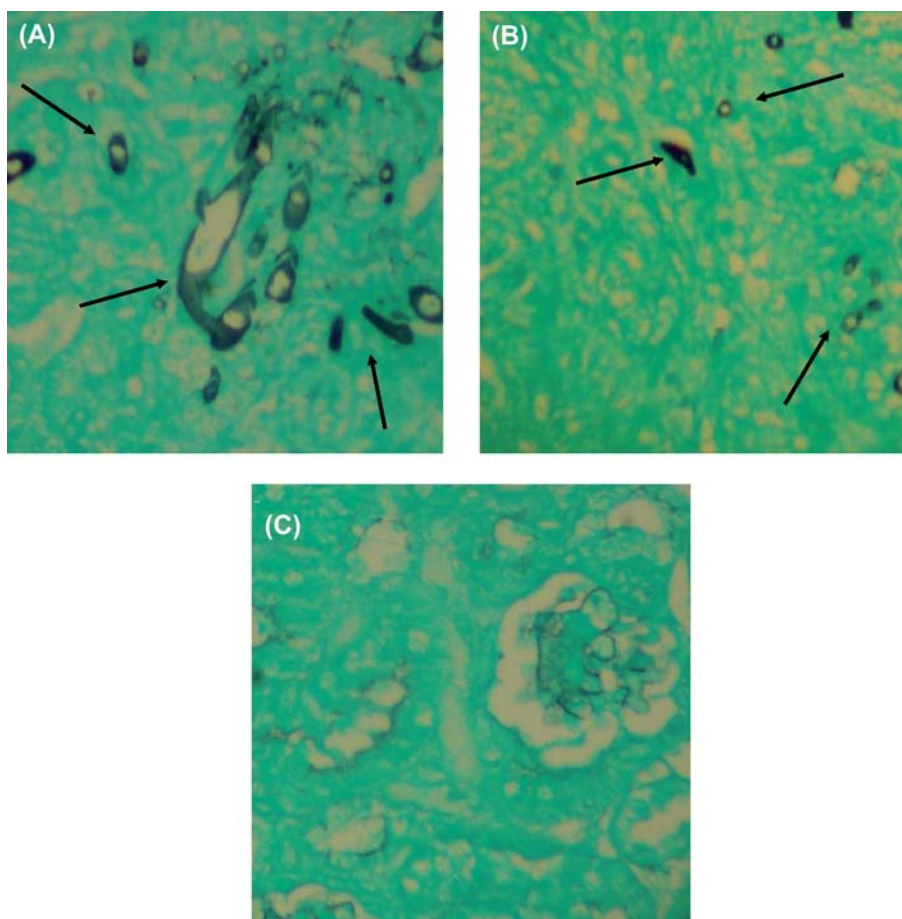


Fig. 2 Histopathology of kidney tissue of immunocompetent mice infected by *Saksenaea vasiformis* (A) kidney section of control mice showing fungal cells (black arrow) (Grocott, magnification $\times 200$). (B) Kidney section of mice treated with LAMB 5 mg/kg showing few fungal elements (black arrow) (Grocott, magnification $\times 200$). (C) Kidney section of mice treated with PSC 20 mg/kg BID showing the absence of fungal elements and the absence of an inflammatory response (Grocott, magnification $\times 200$).

disk diffusion tests. This is in contrast to previous studies with other mucoralean species like *Rhizopus oryzae* and *Mucor circinelloides* in which there was a lack of correlation between PSC MICs and MFCs [22–24].

Despite the use of AMB as the standard therapy for mucormycoses, the death rate in disseminated *Saksena* infections exceeds 70% [6,7]. To our knowledge, this is the first study that has explored the efficacy of antifungal drugs in the treatment of an experimental infection by *S. vasiformis*. In order to assess and compare the efficacy of PSC and LAMB, we used an immunocompetent murine model of disseminated infection by *S. vasiformis*, because a high percentage of these infections affect non-immunocompromised hosts [7]. We were able to provoke disseminated infections that involved the kidneys, liver, spleen, brain, and lung, the latter being the least affected organ. In previous experimental studies employing other genera of Mucorales, similar therapeutic efficacy was obtained with PSC, L-AMB or AMB [20,25,26]. In this investigation, PSC treatment reduced the recovery of fungi from tissue samples of mice infected with all test strains, with no visible fungal growth observed in cultures inoculated with several organs and 100% survival with some strains. In addition, there was no noticeable toxic effect (i.e., diarrhoea, convulsions or weight loss) in those animals treated with PSC. This is in agreement with previous studies that observed a lack of toxicity in mice treated with higher dosages of PSC such as 60, 80 or 100 mg/kg day [25–27].

There is little clinical experience on the use of PSC in the management of *Saksena* infections. This drug has been successfully used as second-line or sequential therapy in two patients with infections caused by that fungus, one of whom was refractory to AMB [4,9].

The present data demonstrates that PSC can be considered an alternative to AMB in the treatment of *Saksena* infections and that low PSC MICs might be predictive of a favorable *in vivo* response.

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

- 1 Ribes JA, Vanover-Sams CL, Baker DJ. Zygomycetes in human disease. *Clin Microbiol Rev* 2000; **13**: 236–301.
- 2 Robeck TR, Dalton M. *Saksena* *vasiformis* and *Apophysomyces elegans* zygomycotic infections in bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*), a killer whale (*Orcinus orca*), and pacific white-sided dolphins (*Lagenorhynchus obliquidens*). *J Zoo Wildl Med* 2002; **33**: 356–366.
- 3 Padmaja JJ, Ramani TV, Kalyani S. Cutaneous zygomycosis: necrotising fasciitis due to *Saksena* *vasiformis*. *Indian J Med Microbiol* 2006; **24**: 58–60.
- 4 Stewardson AJ, Holmes NE, Dellis DH, Howden BP. Cutaneous zygomycosis caused by *Saksena* *vasiformis* following water-related wound in a 24-year-old immunocompetent woman. *Mycoses* 2009; **52**: 547–549.
- 5 Baradkar VP, Kumar S. Cutaneous Zygomycosis due to *Saksena* *vasiformis* in an immunocompetent host. *Indian J Med Microbiol* 2009; **54**: 382–384.
- 6 Vega W, Orellana M, Zaror L, Gené J, Guarro J. *Saksena* *vasiformis* infections: case report and literature review. *Mycopathologia* 2006; **162**: 289–294.
- 7 Gomes MZR, Lewis RE, Kontoyiannis DP. Mucormycosis caused by unusual mucormycetes, non-*Rhizopus*, *Mucor*, and *Lichtheimia* species. *Clin Microb Rev* 2011; **24**: 411–445.
- 8 Pierce PF, Word MB, Roberts GD, et al. *Saksena* *vasiformis* osteomyelitis. *J Clin Microbiol* 1987; **25**: 933–935.
- 9 Trotter DJ, Gonis G, Cottrill E, Coombs C. Disseminated *Saksena* *vasiformis* in an immunocompetent host. *Med J Aust* 2008; **189**: 519–520.
- 10 Alvarez E, García-Hermoso D, Sutton DA, et al. Molecular phylogeny and proposal of two new species of the emerging pathogenic fungus *Saksena*. *J Clin Microbiol* 2010; **48**: 4410–4416.
- 11 Hospenthal DR, Chung KK, Lairet K, et al. *Saksena* *erythrospora* infection following combat trauma. *J Clin Microbiol* 2011; **49**: 3707–3709.
- 12 Spellberg BT, Walsh J, Kontoyiannis DP, Edwards J Jr, Ibrahim AS. Recent advances in the management of mucormycosis: from bench to bedside. *Clin Infect Dis* 2009; **48**: 1743–1751.
- 13 Guarro J. Lessons from animal studies for the treatment of invasive human infections due to uncommon fungi. *J Antimicrob Chemother* 2011; **66**: 1447–1466.
- 14 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi*. Approved Standard, M38-A2, 2nd edn. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008.
- 15 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Nondermatophyte Filamentous Fungi*. Approved guideline, M51-A. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2010.
- 16 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Performance Standards for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Filamentous Fungi*. Informational supplement, M51-S1 (proposed). Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2009.
- 17 Lewis RE, Liao G, Hou J, et al. Comparative analysis of amphotericin B lipid complex and liposomal amphotericin B kinetics of lung accumulation and fungal clearance in a murine model of acute invasive pulmonary aspergillosis. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; **51**: 1253–1258.
- 18 Dannaoui E, Meis JFGM, Loebeberg D, Verweij PE. Activity of posaconazole in treatment of experimental disseminated Zygomycosis. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; **47**: 3647–3650.
- 19 Graybill JR, Hernandez S, Bocanegra R, Najvar LK. Antifungal therapy of murine *Aspergillus terreus* infection. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; **48**: 3515–3519.
- 20 Rodríguez MM, Pastor FJ, Calvo E, et al. Correlation of *in vitro* activity, serum levels, and *in vivo* efficacy of posaconazole against *Rhizopus microsporus* in a murine disseminated infection. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; **53**: 5022–5025.
- 21 Sun QN, Fothergill AW, McCarthy DJ, Rinaldi MG, Graybill JR. *In vitro* activities of posaconazole, itraconazole, voriconazole, amphotericin B, and fluconazole against 37 clinical isolates of zygomycetes. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; **46**: 1581–1582.
- 22 Rodríguez MM, Pastor FJ, Sutton DA, et al. Correlation between *in vitro* activity of posaconazole and *in vivo* efficacy against *Rhizopus*

- oryzae* infection in mice. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; **54**: 1665–1669.
- 23 Spreghini E, Orlando F, Giannini D, Barchiesi F. *In vitro* and *in vivo* activities of posaconazole against zygomycetes with various degrees of susceptibility. *J Antimicrob Chemother* 2010; **65**: 2158–2163.
- 24 Salas V, Pastor F J, Calvo E, *et al.* *In vitro* and *in vivo* activities of posaconazole and amphotericin B in a murine invasive infection by *Mucor circinelloides*: poor efficacy of posaconazole. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; (doi:10.1128/AAC.05956-11).
- 25 Pastor FJ, Ruíz-Cendoya M, Puyol I, *et al.* *In vitro* and *in vivo* antifungal susceptibilities of the Mucoralean fungus *Cunninghamella*. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; **54**: 4550–4555.
- 26 Sun QN, Najvar LK, Bocanegra R, *et al.* *In vivo* activity of posaconazole against *Mucor* spp. in an immunosuppressed-mouse model. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; **46**: 2310–2312.
- 27 Imai JK, Singh G, Clemons KV, Stevens DA. Efficacy of posaconazole in a murine model of central nervous system aspergillosis. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; **48**: 4063–4066.

This paper was first published online on Early Online on 2 April 2012.

5. DISCUSIÓN

5. Discusión

5.1. Candidiasis invasora

La candidiasis es la infección fúngica más frecuente en el ser humano. Las especies patógenas pertenecientes al género *Candida* pueden causar un amplio espectro de cuadros clínicos, siendo la candidiasis invasora una infección oportunista grave asociada a altas tasas de morbilidad y mortalidad, afectando principalmente a pacientes inmunosuprimidos u hospitalizados con serias enfermedades de base (Quindós *et al.*, 2009; Pemán & Salavert, 2012). La tasa de mortalidad global asociada a la candidiasis invasora es aproximadamente del 50% (Pappas *et al.*, 2009). El diagnóstico de la candidiasis invasora es difícil, debido principalmente a la carencia de signos y síntomas específicos de la infección (Pappas *et al.*, 2006; Pontón, 2009). Actualmente el diagnóstico de laboratorio de la candidiasis invasora se basa en tres estrategias complementarias: la observación del hongo en la muestra clínica, su cultivo y la detección de marcadores biológicos séricos, como el (1→3)-β-D- glucano, el manano y el ADN fúngico (Pontón, 2009; Figueras *et al.*, 2011). *Candida albicans* continúa siendo la especie más frecuentemente implicada en candidiasis invasora, no obstante, en los últimos años ha aumentado la incidencia de otras especies como *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. tropicales* y *C. krusei* (Quindós *et al.*, 2009). Actualmente *C. parapsilosis* es la segunda especie causal más frecuente de candidiasis invasora en muchas regiones de Europa y América Latina (Troffa *et al.*, 2008; van Asbeck *et al.*, 2009, Pemán *et al.*, 2012).

5.1.1. *Candida parapsilosis*

Entre la población de mayor riesgo de contraer procesos infecciones producidos por *C. parapsilosis* se incluyen: pacientes de SIDA, pacientes post-quirúrgicos, particularmente aquellos que han sido sometidos a cirugía del tracto gastrointestinal, pacientes que requieren uso prolongado de catéteres intravenosos y pacientes que padecen de neoplasias malignas (Troffa *et al.*, 2008). Actualmente, la Infectious Diseases Society of America recomienda el uso de las formulaciones lipídicas de la anfotericina B, la caspofungina y el voriconazol como fármacos de primera línea para el tratamiento empírico de la candidiasis invasora en pacientes neutropénicos,

mientras que el fluconazol y el itraconazol se consideran como alternativas terapéuticas (Pappas *et al.*, 2009). No obstante, debido a que *C. parapsilosis* exhibe una sensibilidad *in vitro* reducida a las equinocandinas (Trofa *et al.*, 2009; van Asbeck *et al.*, 2009), se recomienda el uso del fluconazol o de las formulaciones lipídicas de la anfotericina B y no el de las equinocandinas como terapia inicial en casos de infecciones provocadas por *C. parapsilosis* (Pappas *et al.*, 2009). Sin embargo, no existen estudios concluyentes que demuestren una asociación entre la menor sensibilidad *in vitro* de *C. parapsilosis* a las equinocandinas y el fracaso terapéutico. Dado que tanto los datos clínicos como los experimentales referentes a este tema son escasos, decidimos investigar la posible relación entre las CMI de la anidulafungina y de la caspofungina y la respuesta *in vivo* en modelos experimentales. Para ello, realizamos estudios *in vitro* con un número significativo de aislados clínicos de *C. parapsilosis* sensu stricto utilizando los métodos de microdilución en caldo, disco difusión y la determinación de la concentración mínima fungicida. Para los estudios *in vivo* utilizamos aislados representantes de diferentes grados de sensibilidad *in vitro*. Se realizaron dos estudios, uno con la anidulafungina y otro con la caspofungina, para evaluar su eficacia en el tratamiento de la infección diseminada en el ratón neutropénico en los que valoramos la capacidad de los fármacos de prolongar la supervivencia, y reducir la carga fúngica en órganos y los niveles séricos de (1 \rightarrow 3)- β -D- glucano y manano. Los resultados *in vitro* de ambos estudios mostraron una elevada correlación entre los resultados obtenidos con los métodos de microdilución y de disco difusión. Las concentraciones mínimas fungicidas de ambos antifúngicos frente a las cepas de *C. parapsilosis* ensayadas fueron desde uno a más de cinco logaritmos superiores a los obtenidos por el método de microdilución. En general, los resultados *in vitro* concuerdan con los observados en estudios anteriores (Cantón *et al.*, 2010; Pfaller *et al.*, 2010; Espinel-Ingroff & Cantón, 2011). En cuanto a los resultados *in vivo*, ambos fármacos mostraron una eficacia dependiente de las CMI de los aislados estudiados. No existen estudios experimentales previos en los que se haya evaluado la eficacia de la anidulafungina frente a infecciones causadas por *C. parapsilosis*, si bien los estudios clínicos han demostrado la eficacia de este antifúngico en el tratamiento de candidiasis invasora causadas por *C. parapsilosis* (Pfaller *et al.*, 2005; Reboli *et al.*, 2007), observándose

generalmente mayores tasas de supervivencia en aquellos pacientes con infecciones causadas por aislados para los que la anidulafungina mostró mayor actividad *in vitro* (Pfaller *et al.*, 2005). En el caso de los estudios correspondientes a la anidulafungina utilizamos 6 aislados (2 aislados con CMI = 0.12 µg/ml, 2 aislados con CMI = 1 µg/ml y 2 aislados con CMI = 2 µg/ml) y tres dosis de anidulafungina (1, 5 y 10 mg/kg). Las dosis más altas de anidulafungina (5 y 10 mg/kg) fueron capaces de prolongar significativamente la supervivencia de todos los grupos de animales, pero sólo pudieron reducir significativamente la carga fúngica en los órganos estudiados en aquellos animales infectados con las cepas con CMI = 0,12 µg/ml. Nuestros resultados correspondientes a la carga fúngica, histopatología, niveles de manano y (1→3)- β-D- glucano concuerdan con un estudio experimental sobre la farmacocinética de la anidulafungina que demostró que la eficacia de este fármaco depende de las CMI, requiriéndose dosis más altas de anidulafungina frente a mayores CMI (Andes *et al.*, 2010).

En el caso de los estudios *in vivo* correspondientes a la caspofungina, utilizamos 8 aislados (rango de CMI desde 0.12 a 1 µg/ml) y en base a la buena eficacia mostrada por la anidulafungina a altas dosis (Salas *et al.*, 2011), decidimos utilizar sólo una dosis relativamente alta de caspofungina (5 mg/kg). En este trabajo, valoramos la eficacia *in vivo* de la caspofungina con los mismos parámetros que en el estudio de la anidulafungina, con la excepción de los estudios de supervivencia. Del mismo modo que ocurrió con la anidulafungina, nuestros resultados revelaron que la caspofungina sólo fue capaz de reducir significativamente la carga fúngica en los tres órganos estudiados, en aquellos animales infectados con los aislados con CMI < 1 µg/ml. En general, la caspofungina sólo redujo significativamente los niveles séricos de (1→3)- β-D-glucano medidos a los siete días de tratamiento. Nuestros resultados difieren de los obtenidos por Barchiesi *et al.*, (2006), quienes utilizando un modelo murino similar al nuestro y tres aislados de *C. parapsilosis* para los cuales las CMI fueron de 0.5, 1 y 4 µg/ml, no observaron relación entre la actividad *in vitro* y la respuesta *in vivo*, siendo la caspofungina a dosis bajas (1 mg/kg) eficaz sólo en aquellos animales infectados con la cepa de CMI = 4 µg/ml. Los datos clínicos evidencian un porcentaje global de respuesta clínica al tratamiento con caspofungina de las infecciones causadas por *C. parapsilosis* de un 75%, no habiéndose observado

en general una relación lineal entre incremento de CMI y fracaso terapéutico (Mora-Duarte *et al.*, 2002; Kartsonis *et al.*, 2005; Pfaller *et al.*, 2011a). Sin embargo, cabe mencionar que los resultados de los estudios recién mencionados no son concluyentes, debido a que se incluyeron muy pocos aislados de *C. parapsilosis* que exhibieran CMIs $> 1 \mu\text{g/ml}$. Al 25% de fallos terapéuticos debe añadirse la posibilidad de desarrollo de candidemia durante el tratamiento con caspofungina, documentada en varias publicaciones (Belmares *et al.*, 2005; Moudgal *et al.*, 2005; Cheung *et al.*, 2006; Gutierrez- Urbón *et al.*, 2011). Nuestros estudios demostraron, que al menos, experimentalmente, existieron importantes diferencias en la respuesta *in vivo*, las cuales tuvieron directa relación con las CMIs, siendo las más bajas predictivas del éxito de la terapia, mientras ambas equinocandinas mostraron pobre eficacia *in vivo* frente aquellos animales infectados con cepas para las que estos antifúngicos mostraron CMIs de 1 o 2 $\mu\text{g/ml}$, aun cuando se encuentran dentro del rango de sensibilidad ($\leq 2 \mu\text{g/ml}$).

Los resultados correspondientes al estudio de la eficacia de la anidulafungina han sido publicados en la revista *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2011; 55: 4985-4989. Los resultados obtenidos de la investigación con la caspofungina se encuentran en preparación para su posterior publicación.

5.2. Aspergilosis invasora

La aspergilosis invasora es la micosis más frecuente causada por hongos filamentosos. En la mayoría de los casos, la especie causante de estas infecciones es *Aspergillus fumigatus*, aunque la incidencia clínica de otras especies como *A. flavus* o *A. terreus*, ha aumentando notablemente en los últimos años (Blum *et al.*, 2008). Actualmente el voriconazol es el fármaco de elección para el tratamiento de la aspergilosis invasora, mientras que el posaconazol, las formulaciones lipídicas de la anfotericina B, la caspofungina y la micafungina se presentan como alternativas en pacientes intolerantes o con procesos resistentes al voriconazol (Walsh *et al.*, 2008). A pesar de las diferentes opciones terapéuticas, la aspergilosis invasora continúa siendo causa de elevada mortalidad en pacientes inmunocomprometidos, hecho que justifica la realización de estudios acerca de la eficacia de nuevos fármacos, así

como la investigación del valor predictivo de las pruebas de sensibilidad *in vitro* en la eficacia del tratamiento *in vivo*.

5.2.1. *Aspergillus fumigatus*

Aspergillus fumigatus es capaz de causar una amplia gama de enfermedades, incluyendo síndromes alérgicos, aspergilomas y aspergilosis invasora (Camps *et al.*, 2012), la cual es una entidad grave asociada a tasas de mortalidad que varían entre un 40 y un 90%. A pesar de que *A. fumigatus* es generalmente sensible *in vitro* al voriconazol, en los últimos años se ha detectado un incremento de aislados de especies de *Aspergillus*, incluyendo *A. fumigatus*, resistentes a los azoles (Verweij *et al.*, 2009; Pfaller, 2012), asociados a una mayor probabilidad de fracaso terapéutico (Camps *et al.*, 2012). La identificación mediante técnicas *in vitro* de las cepas que han adquirido resistencia es difícil, principalmente debido a que en la actualidad no existen puntos de corte basados en la eficacia clínica de estos fármacos. Con el objetivo de detectar estas cepas, se han realizado diversos estudios que han permitido definir los denominados puntos de corte epidemiológicos (PCE), los cuales se basan en las distribuciones de las CMI de los azoles para diferentes especies de *Aspergillus* (Espinel-Ingroff *et al.*, 2010; Pfaller *et al.*, 2011b). Estos puntos se definen como las concentraciones críticas de fármacos que permitirían identificar cepas de tipo salvaje (término que englobaría al menos al 95% de los aislados de la especie) y aquéllas que presentan un probable mecanismo de resistencia a un determinado antifúngico (Pfaller *et al.*, 2009; Espinel-Ingroff *et al.*, 2010). A pesar de que los PCEs no han sido diseñados para predecir la respuesta *in vivo*, son considerados un paso previo importante para el futuro desarrollo y establecimiento de los puntos de corte clínicos (Pfaller *et al.*, 2009, Espinel-Ingroff *et al.*, 2010). Nuestro objetivo fue evaluar *in vivo* la utilidad de las CMI como indicadores de éxito o fracaso terapéutico utilizando un amplio número de cepas de *A. fumigatus* para los que el voriconazol presentaran CMI mayores y menores que los actuales PCE (Espinel-Ingroff *et al.*, 2010). Para ello, utilizamos un modelo murino de infección diseminada que permitió analizar los diferentes aislados de *A. fumigatus* con distintos grados de sensibilidad *in vitro*. Debido a su baja frecuencia, no pudo ser incluido un número significativo de cepas para las que las CMI del voriconazol

fueran mayores a los PCE. Comparamos tres técnicas diferentes para la determinación de la actividad *in vitro* del voriconazol, como son la de microdilución, la de disco difusión y la determinación de las concentraciones mínimas fungicidas, observando un alto grado de correlación entre los resultados obtenidos con las mismas. Los resultados concuerdan con los publicados en estudios previos, en los cuales se sugiere que el método de disco difusión sería una buena alternativa para determinar la sensibilidad *in vitro* del voriconazol en el día a día del laboratorio clínico (Serrano *et al.*, 2004; Espinel-Ingroff & Cantón, 2008). Asimismo, nuestros resultados referentes a las CMFs confirman la actividad fungicida del voriconazol frente a *A. fumigatus* (Krishnan *et al.*, 2005; Lass-Flörl *et al.*, 2008).

Los estudios de supervivencia y recuento fúngico en órganos de animales infectados, demostraron que la eficacia del voriconazol fue mayor en aquellos animales infectados con los aislados para los cuales las CMI's fueron $\leq 0.25 \mu\text{g/ml}$, hecho que concuerda con los resultados experimentales obtenidos por Mavridou *et al.*, (2010a) quienes observaron una mayor eficacia *in vivo* del voriconazol a dosis de 40 mg/kg, en aquellos animales infectados con cepas de *A. fumigatus* que mostraron CMI's $\leq 0.25 \mu\text{g/ml}$, mientras que para los ratones infectados con cepas de MIC = 2 $\mu\text{g/ml}$, sólo el voriconazol a 80 mg/kg mostró eficacia (Mavridou *et al.*, 2010a). Sin embargo, en nuestro estudio, para los animales infectados con las cepas que representaron sensibilidades entre 0.5 y 2 $\mu\text{g/ml}$, el voriconazol tuvo un comportamiento variable. En nuestro estudio este antifúngico no mostró eficacia en aquellos animales infectados con la única cepa de CMI = 4 $\mu\text{g/ml}$. La asociación entre el incremento de las CMI's y la menor eficacia *in vivo* del antifúngico no mostró una relación lineal. Nuestros resultados concuerdan con los de un estudio clínico que analizó la sensibilidad *in vitro* de 115 aislados de *A. fumigatus* y su relación con la respuesta clínica de los pacientes, y en el que se observó que el aumento de los valores de las CMI's no se relacionaron de forma significativa con el aumento de la mortalidad de los pacientes tratados con voriconazol (Baddley *et al.*, 2009). Nuestro estudio pone de manifiesto que las correlaciones entre sensibilidad y respuesta clínica sólo podrían establecerse para aquellas cepas con valores de CMI's extremas, siendo los valores intermedios de las CMI poco predictivos del éxito de la terapia con voriconazol.

Los resultados de este estudio han sido recogidos en un artículo que ha sido enviado a la revista *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* y actualmente se encuentra en proceso de revisión para su publicación.

5.2.2. *Aspergillus terreus*

A. terreus, es una de la especies más frecuentemente implicada en casos de aspergilosis invasora, con gran tendencia a la diseminación (Pastor & Guarro, 2007), y con una alta tasa de mortalidad (Baddley *et al.*, 2003). Además se ha demostrado que aproximadamente el 60% de las cepas de *A. terreus* presentan una resistencia intrínseca, tanto *in vitro* como *in vivo* a la anfotericina B (Walsh *et al.*, 2008; Mensa *et al.*, 2009).

A pesar de que el voriconazol exhibe una actividad *in vitro* y una eficacia *in vivo* superior a la de la anfotericina B (Steinbach *et al.*, 2004a; Pastor & Guarro, 2007), datos clínicos retrospectivos demuestran una tasa de supervivencia del 64.7% de los pacientes tratados con voriconazol (Steinbach *et al.*, 2004b), y al igual que lo que ocurre con *A. fumigatus*, varios son los estudios que han demostrado la emergencia de aislados de *A. terreus* que muestran resistencia *in vitro* al voriconazol (Verweij *et al.*, 2009). Sin embargo, la menor eficacia *in vivo* del voriconazol y su asociación al incremento de las CMI's no ha sido demostrado en infecciones causadas por *A. terreus*. En cuanto al posaconazol, existen escasos datos clínicos y experimentales acerca de su uso en el tratamiento de infecciones causadas por dicho hongo (Walsh *et al.*, 2003; Graybill *et al.*, 2004). En base a lo expuesto, consideramos interesante llevar a cabo estudios experimentales para evaluar la eficacia tanto *in vitro* como *in vivo* del posaconazol y del voriconazol frente a *A. terreus*, usando en el caso de este último un alto número de aislados con diferentes grados de sensibilidad *in vitro* para poder evaluar la utilidad de las CMI's como indicadores de éxito o fracaso terapéutico.

En el estudio de la eficacia del posaconazol se ensayó la actividad *in vitro* de este antifúngico frente a 21 aislados de *A. terreus*, comparando la técnica de microdilución en caldo con la de disco difusión. En todos los casos el posaconazol mostró una buena actividad, corroborando los datos obtenidos por otros autores (Pfaller *et al.*, 2008; Lass-Flörl *et al.*, 2009). A su vez, dada la elevada correlación

Discusión

obtenida con los resultados obtenidos a partir del método de disco difusión, se sugirió el potencial de esta técnica para la determinación de la actividad *in vitro* del posaconazol frente a *A. terreus*. Se realizaron estudios *in vivo* para evaluar la eficacia del posaconazol en el tratamiento de la infección diseminada por *A. terreus* en el ratón neutropénico, usando 6 aislados del hongo. En el modelo experimental pudimos confirmar la buena eficacia dosis dependiente del posaconazol. Nuestros resultados corroboran la buena respuesta *in vivo* observada en dos estudios experimentales previos en los cuales sólo se ensayó una dosis de este antifúngico frente a una única cepa (Walsh *et al.*, 2003; Graybill *et al.*, 2003). En nuestro estudio se observó una alta correlación entre los resultados *in vivo*, los niveles séricos de antifúngico y de galactomanano y la dosis de antifúngico empleado, y se confirmó que la medición de galactomanano es un buen marcador de la eficacia y pronóstico de la terapia antifúngica (Petraitiene *et al.*, 2001; Marr *et al.*, 2004; Sionov *et al.*, 2006). Los resultados de este estudio se publicaron en la revista *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2011; 55: 676-679.

Nuestro estudio referente a la eficacia *in vivo* del voriconazol frente a *A. terreus*, es el primer estudio experimental en que se investiga la posible correlación entre las CMI's para el voriconazol y la respuesta *in vivo* frente a este hongo. Para llevar a cabo nuestro propósito hemos utilizado un modelo de infección diseminada en el ratón neutropénico, usando nueve aislados con diferentes grados de sensibilidad, incluyendo valores de CMI superiores al PCE.

A pesar que el voriconazol logró prolongar significativamente la supervivencia en todos los grupos de animales, este hecho fue más evidente en aquellos animales infectados por aislados para los que este antifúngico mostró la mayor actividad *in vitro* (0.12 µg/ml) en los cuales obtuvimos tasas de supervivencia del 100%. Estos resultados están en concordancia con previos estudios experimentales realizados con *A. fumigatus* (Mavridou *et al.*, 2010a; Mavridou *et al.*, 2010b) en los cuales se demostró que esta droga fue más eficaz en aquellos animales infectados con cepas para las cuales las CMI's fueron ≤ 0.25 µg/ml. Asimismo, la reducción significativa de la carga fúngica sólo pudo observarse en aquellos animales infectados con aislados para las que las CMI's fueron inferiores a 1 µg/ml. Los niveles séricos de antifúngico siempre fueron superiores a las CMI's para las cepas estudiadas. El

voriconazol fue capaz de disminuir significativamente las concentraciones séricas de galactomanano en todos los animales. Los resultados de este estudio demostraron una relación directa entre la eficacia *in vivo* y las CMI del voriconazol, lo cual sugiere la utilidad del estudio de la sensibilidad *in vitro* antes de instaurar la correcta antifúngica, a pesar que sólo para un 3% de los aislados clínicos de *A. terreus* se observan valores de CMI del voriconazol superiores a 1 µg/ml.

Estos resultados han sido recogidos en un artículo que ha sido enviado a la revista Antimicrobial Agents and Chemotherapy y actualmente se encuentra en proceso de revisión para su publicación.

5.3. Mucoramicosis invasora

Consideradas pocos años atrás como infecciones poco frecuentes, actualmente la incidencia de la mucoramicosis ha aumentado notablemente, siendo considerada hoy en día como la tercera micosis invasora en orden de frecuencia, tras la candidiasis y la aspergillosis. Las mucoramicosis son infecciones fúngicas de curso rápido, agresivo y frecuentemente fatal, que afectan principalmente a pacientes inmunosuprimidos (Spellberg *et al.*, 2005; Rogers, 2008). Sin embargo, se ha observado un aumento de la frecuencia de este tipo de infecciones en individuos inmunocompetentes (Salavert & Pemán, 2009; Gomes *et al.*, 2011). En los últimos años la taxonomía de los hongos causantes de mucoramicosis ha experimentado cambios importantes, debidos en gran parte al rápido desarrollo de las técnicas moleculares que han permitido conocer las relaciones filogenéticas entre estos hongos (Guarro, 2012). Hoy en día, la división Zygomycota se considera obsoleta ya que se ha demostrado que no constituyen un grupo monofilético (White *et al.*, 2006; Hibbet *et al.*, 2007). Las especies patógenas se incluyen mayoritariamente dentro del orden Mucorales, constituyendo un grupo heterogéneo de hongos con diferentes niveles de sensibilidad *in vitro* a los antifúngicos (Dannaoui *et al.*, 2003; Alastruey-Izquierdo *et al.*, 2009). Los principales causantes de mucoramicosis, son las especies pertenecientes a los géneros *Rhizopus*, *Mucor*, y *Rhizomucor*, aunque la incidencia de mucoramicosis causadas por especies pertenecientes a los géneros *Apophysomyces* y *Saksenaea* ha aumentado notablemente en los últimos años (Alvarez *et al.*, 2009). El tratamiento de las infecciones causadas por miembros de los Mucorales se basa en

cuatro aspectos fundamentales: el diagnóstico precoz, la eliminación de los factores de riesgo predisponentes, el desbridamiento quirúrgico y la instauración de una terapia antifúngica apropiada (Ribes *et al.*, 2000; Spellberg *et al.*, 2005; Guarro 2011). A pesar del tratamiento quirúrgico agresivo y de la terapia antifúngica la tasa de mortalidad asociada a la mucoramicosis continúa siendo superior al 40%, llegando a ser del 65% en pacientes hematológicos y del 90% en receptores de trasplantes de células progenitoras hematopoyéticas (Greenberg *et al.*, 2006; Torres-Narbona *et al.*, 2007; Spellberg *et al.*, 2009). Desde el punto de vista de la terapia antifúngica, la mucoramicosis ha sido considerada durante mucho tiempo como una entidad cuyo tratamiento se ha realizado independiente de la especie causal. No obstante, actualmente existen suficientes evidencias que demuestran las diferencias que los Mucorales presentan en su respuesta tanto *in vitro* como *in vivo* a las antibióticos antifúngicos (Larché *et al.*, 2005; Balajee *et al.*, 2009; Guarro, 2011). Tradicionalmente la anfotericina B convencional (AMB) ha sido el fármaco de elección para el tratamiento de las mucoramicosis invasoras, aunque su uso se ve limitado por su toxicidad. Actualmente su formulación liposomal, significativamente menos tóxica aunque de un elevado coste económico, se ha consolidado como el antifúngico de elección para el tratamiento de estas infecciones (van Burick *et al.*, 2006, Torres-Narbona *et al.*, 2007; Rogers, 2008; Salavert & Pemán, 2009). En general, los azoles no son activos sobre estos hongos, con la excepción del posaconazol el cual presenta una buena actividad *in vitro* frente a un amplio rango de especies de Mucorales (Sun *et al.*, 2002; Dannaoui *et al.*, 2003; Espinel-Ingroff, 2003; Sabattelli *et al.*, 2006; Almyroudis *et al.*, 2007; Alastruey-Izquierdo *et al.*, 2009; Rodríguez *et al.* 2009; Rodríguez *et al.*, 2010; Spreghini *et al.*, 2010). El posaconazol ha sido usado con éxito en algunos casos clínicos de mucoramicosis (Greengberg *et al.*, 2006; van Burik *et al.*, 2006; Ferguson *et al.*, 2007; Stewardson *et al.* 2009; Trotter *et al.*, 2008; Laza-Stanca *et al.*, 2012). Hasta la fecha, este fármaco se considera como tratamiento de rescate, ya que no existe aún una fuerte evidencia clínica que respalde su utilización como agente de elección en el tratamiento de las mucoramicosis. La carencia de datos clínicos suficientes justifica la realización de estudios experimentales para el estudio del potencial terapéutico del posaconazol en el tratamiento de estas micosis (Enoch *et al.*, 2011).

Rhizopus oryzae es el principal agente causante de mucoramicosis (Alvarez *et al.*, 2009), siendo también la especie más estudiada (Ibrahim *et al.*, 2005; Ma *et al.*, 2009; Rodríguez *et al.*, 2009, Rodríguez *et al.*, 2010). No obstante, el notable incremento de mucoramicosis causadas por especies como *Mucor circinelloides*, *Apophysomyces variabilis* y *Saksenaea vasiformis*, (Guarro, 2011), junto a los escasos datos clínicos y experimentales que permitan establecer su adecuado tratamiento antifúngico, hace imprescindible la realización de estudios experimentales encaminados a la investigación de terapias efectivas para el tratamiento de estas micosis.

5.3.1. *Mucor circinelloides*

Dentro del género *Mucor*, *Mucor circinelloides* es la especie de mayor incidencia en clínica (Alvarez *et al.*, 2009; Guarro, 2012). Sin embargo, no son muchos los casos descritos en la literatura, hecho probablemente debido a que en muchos casos clínicos de mucoramicosis publicados no consta la identificación del agente causal a nivel de especie, lo que dificulta conocer la incidencia real de *M. circinelloides*. La mucoramicosis causada por *M. circinelloides* se asocia principalmente a pacientes inmunosuprimidos, siendo las enfermedades subyacentes más comunes las neoplasias hematológicas malignas, diabetes mellitus y los tratamientos prolongados con corticoides (Iwen *et al.*, 2007; Khan *et al.*, 2009). *M. circinelloides* se asocia a una amplia variedad de presentaciones clínicas, siendo las más comunes las afectaciones cutáneas, subcutáneas, pulmonares y la mucoramicosis invasora (Fingeroth *et al.*, 1994; Iwen *et al.*, 2007; Khan *et al.*, 2009).

A pesar de que el posaconazol presenta una buena actividad *in vitro* frente a muchas especies de Mucorales, *M. circinelloides* es usualmente menos sensible a este antifúngico que otras especies del género (Sun *et al.*, 2002; Almyroudis *et al.*, 2007; Alastruey- Izquierdo *et al.*, 2009; Khan *et al.*, 2009). Actualmente no existen datos clínicos sobre el uso del posaconazol en el tratamiento de infecciones causadas por *M. circinelloides*, existiendo únicamente un estudio a nivel experimental, en el cual el posaconazol no presentó una buena actividad *in vitro*, pero fue eficaz *in vivo* frente a una única cepa de *M. circinelloides* (Sun *et al.*, 2002). Por ello nos propusimos comparar la actividad tanto *in vitro* como *in vivo* del posaconazol con la de la anfotericina B. Para estudiar la respuesta *in vitro* al posaconazol y a la anfotericina B,

ser realizaron estudios con 17 cepas de *M. circinelloides* utilizando el método de microdilución en caldo, el de disco difusión y la determinación de la concentración mínima fungicida. Para llevar a cabo el estudio *in vivo*, decidimos comparar la eficacia del posaconazol y de la anfotericina B frente a seis cepas de *M. circinelloides* con diferentes grados de sensibilidad *in vitro* al posaconazol en un modelo de ratón neutropénico.

En concordancia con los resultados obtenidos en otros estudios, la anfotericina B demostró ser más activa *in vitro* que el posaconazol (Alastruey- Izquierdo *et al.*, 2009; Almyroudis *et al.*, 2007; Khan *et al.*, 2009; Sun *et al.*, 2002) frente a todas las cepas ensayadas mediante los 3 métodos utilizados. La mayoría de las CMI para el posaconazol se situaron entre los puntos de corte sugeridos como indicativos de sensibilidad y de sensibilidad intermedia, sin embargo, con el método de disco difusión los diámetros de las zonas de inhibición coincidieron con los puntos de corte sugeridos como indicativos de resistencia (CLSI M38- A2; M51-P). Este hecho es destacable, ya que en general, los resultados obtenidos frente a otras especies de Mucorales con los métodos de microdilución y disco difusión han presentado una buena correlación (Rodríguez *et al.*, 2010). En todos los casos obtuvimos valores elevados de la mínima concentración fungicida, hecho ya observado anteriormente en estudios realizados con otros Mucorales (Rodríguez *et al.*, 2010; Spreghini *et al.*, 2010). En nuestro modelo *in vivo*, la anfotericina B resultó ser la terapia más efectiva tanto en prolongación de la supervivencia como en reducción de carga fúngica en riñones y en cerebro, superando incluso en algunos casos los resultados obtenidos con el posaconazol. El posaconazol sólo fue capaz de prolongar significativamente la supervivencia de aquellos animales infectados con 3 de las 6 cepas estudiadas y en general mostró una pobre eficacia en la reducción de la carga fúngica de ambos órganos ensayados. No observamos una correlación entre los resultados de sensibilidad *in vitro* y la eficacia *in vivo*, siendo la escasa eficacia del posaconazol independiente de las CMIs de las cepas ensayadas. Estos resultados difieren de los publicados por Sun *et al.*, (2002), quienes compararon la eficacia de la anfotericina B, el posaconazol y el itraconazol frente a una cepa de *M. circinelloides* para la cual la CMI para el posaconazol fue de 8 µg/ml. Los autores observaron una buena eficacia *in vivo* del posaconazol, que fue capaz de prolongar significativamente la

supervivencia de los animales infectados y de disminuir la carga fúngica en los órganos estudiados, no encontrando diferencias significativas con la eficacia de la anfotericina B (Sun *et al.*, 2002). Sin embargo, nuestro estudio difiere en muchos aspectos del trabajo de Sun *et al.*, (2002), tales como el número de cepas ensayadas, el inóculo empleado en la infección y las dosis de posaconazol empleadas.

A pesar de que el posaconazol ha sido utilizado con éxito en clínica y en estudios experimentales en infecciones causadas por especies pertenecientes a otros géneros de Mucorales (Greengberg *et al.*, 2006; van Burik *et al.*, 2006; Ferguson *et al.*, 2007; Trotter *et al.*, 2008; Stewardson *et al.* 2009; Rodríguez *et al.*, 2010; Pastor *et al.*, 2010; Laza-Stanca *et al.*, 2012), los resultados de nuestro estudio confirman que los Mucorales presentan importantes diferencias a nivel de especie en sus respuestas *in vitro* e *in vivo* a los antifúngicos, por lo cual es necesaria la correcta identificación de los aislados para establecer un apropiado tratamiento antifúngico.

Los resultados obtenidos en este estudio fueron publicado en la revista *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2012; 56: 2246-2250.

5.3.2. *Apophysomyces variabilis* y *Saksenaea vasiformis*

La taxonomía de los géneros *Apophysomyces* y *Saksenaea* ha sufrido recientes modificaciones. Tradicionalmente ambos han sido considerados géneros monotípicos, sin embargo, en base a estudios moleculares, fisiológicos y morfológicos, se ha demostrado que ambos son complejos de especies (Alvarez *et al.*, 2010; Alvarez *et al.*, 2010). A pesar de que las infecciones por *Apophysomyces* y *Saksenaea* son menos frecuentes que las causadas por otros miembros de los Mucorales, los hongos pertenecientes a estos géneros son capaces de ocasionar infecciones muy agresivas, con una elevada tasa de mortalidad y caracterizadas por una rápida angioinvasión y posterior necrosis de los tejidos. Ambos géneros afectan principalmente a huéspedes inmunocompetentes causando una gran variedad de presentaciones clínicas, siendo la fascitis necrotizante la más frecuente. No obstante, otras presentaciones como la rino-orbito cerebral, renal, intra-abdominal y la diseminada, también han sido descritas (Vega *et al.*, 2006; Gomes *et al.*, 2011). Estas infecciones afectan también a pacientes inmunocomprometidos, especialmente afectados de leucemia, diabetes mellitus o sometidos a tratamientos prolongados con

corticoides (Gomes *et al.*, 2011). La vía de infección más común para ambas mucoramicosis es la inoculación traumática (Stewardson *et al.*, 2009; Gomes *et al.*, 2011). La verdadera incidencia de las infecciones causadas por ambos géneros es aun desconocida, y podría estar subestimada debido a que estos hongos requieren técnicas especiales de cultivo para inducir una correcta esporulación que facilite su identificación (Ribes *et al.*, 2000; Alvarez *et al.*, 2010; Gomes *et al.*, 2011). Por otra parte, la difícil conservación de los aislados procedentes de la mayoría de los casos de mucoramicosis no ha permitido efectuar una correcta identificación molecular retrospectiva de los agentes causales (Guarro *et al.*, 2011).

Dentro del género *Apophysomyces*, *A. variabilis* parece ser la especie de mayor incidencia clínica (Alvarez *et al.*, 2010; Guarro, 2011), con tasas de mortalidad que exceden el 80% (Gomes *et al.*, 2011). No obstante, recientemente se han descrito en EE.UU 13 casos de infección causada por *A. trapeziformis* en pacientes afectados por traumatismos causados por un tornado, de los cuales fallecieron cinco (Green & Karras 2011; Guarro, 2012). En el caso de *Saksenaea* parece ser que la especie de mayor incidencia clínica es *S. vasiformis*. Aunque la especie de reciente descripción *S. erythrospora* (Alvarez *et al.*, 2010) ha sido identificada como agente causal de infección en un paciente herido por la explosión de una bomba en la guerra de Irak, con consecuencias fatales (Hospenthal *et al.*, 2011).

Diversos estudios clínicos han demostrado una moderada eficacia de la anfotericina B en el tratamiento de infecciones causadas por *Apophysomyces* spp y por *Saksenaea* spp. (Vega *et al.*, 2006; Chackrabarti *et al.*, 2010; Chander *et al.*, 2010; Gomes *et al.*, 2011). Para ambos géneros, la experiencia clínica con el posaconazol se limita a un caso causado por *Apophysomyces* spp. y dos causados por *Saksenaea* spp. en los cuales este antifúngico ha sido utilizado con éxito (Ferguson *et al.*, 2007; Trotter *et al.*, 2008; Stewardson *et al.*, 2009). No existen estudios experimentales previos sobre la eficacia de tratamientos antifúngicos en infecciones causadas por *A. variabilis* o por *S. vasiformis*. Con el fin de aportar más datos acerca del tratamiento antifúngico más adecuado, decidimos evaluar y comparar la eficacia *in vitro* e *in vivo* de la anfotericina B y del posaconazol frente a un número relativamente alto de aislados de *A. variabilis* y de *S. vasiformis*.

El único antecedente acerca del tratamiento experimental de la infección diseminada en el ratón causada por *Apophysomyces*, lo constituye un estudio en el que se evaluó la eficacia de la anfotericina B y el itraconazol frente a una única cepa identificada como *A. elegans* (Dannaoui *et al.*, 2002). En dicho estudio se observó la mayor eficacia de la anfotericina B, tanto en prolongar la supervivencia, como en reducir la carga fúngica de los animales infectados (Dannaoui *et al.*, 2002). Dada la ausencia de datos experimentales, decidimos evaluar la eficacia *in vivo* del posaconazol y de la anfotericina B frente a 6 cepas de *A. variabilis*. Debido a la labilidad que presentan las hifas de *Apophysomyces* spp. y *Saksenaea* spp. evaluamos la carga fúngica utilizando, una modificación de la metodología establecida por Dannaoui *et al.*, (2002). En nuestro modelo observamos un elevado tropismo por riñón, bazo y cerebro, similar al apreciado previamente por Dannaoui *et al.* (2002) con *A. elegans*. Tanto el posaconazol como la anfotericina B fueron capaces de reducir significativamente la presencia de hifas en los órganos estudiados. En nuestro estudio, la terapia con posaconazol fue más efectiva que la anfotericina B en prolongar la supervivencia de los animales. Nuestros resultados concuerdan con datos obtenidos por otros estudios experimentales en los cuales el posaconazol ha demostrado ser tan eficaz *in vivo* como la anfotericina B frente a otros géneros de Mucorales (Rodríguez *et al.*, 2009; Pastor *et al.*, 2010).

Los resultados obtenidos en este estudio fueron publicados en la revista Journal of Antimicrobial Chemotherapy 2012; 67: 1712-1715.

En el caso de *S. vasiformis* decidimos evaluar la actividad *in vitro* del posaconazol y la anfotericina B frente a 8 aislados de *S. vasiformis* y la eficacia *in vivo* del posaconazol y de la formulación liposomal de la anfotericina B utilizando 4 aislados seleccionados del estudio *in vitro*. Coincidiendo con los resultados obtenidos por otros autores el posaconazol demostró ser más activo *in vitro* que la anfotericina B frente a *S. vasiformis* (Sun *et al.*, 2002; Alvarez *et al.*, 2010). En nuestro estudio, la buena actividad *in vitro* del posaconazol se vio reflejada en los resultados obtenidos con las técnicas de microdilución, disco difusión y concentración mínima fungicida, con una alta correlación entre ellos. Este hecho difiere de lo observado en estudios previos llevados a cabo con otros géneros de Mucorales en los que los valores de las concentraciones mínimas fungicidas para el posaconazol fueron mayores a 3

Discusión

diluciones a las concentraciones mínimas inhibitorias (Rodríguez *et al.*, 2010, Spreghini *et al.*, 2010; Salas *et al.*, 2012).

En los estudios *in vivo*, pudimos observar que los órganos mas afectados fueron los riñones en primer lugar, seguidos por el hígado, bazo, cerebro y los pulmones, siendo estos últimos los que presentaron menor afectación. En concordancia con los resultados *in vitro* el posaconazol fue más eficaz que la anfotericina B liposomal en el tratamiento de los ratones infectados por las diferentes cepas de *S. vasiformis*, siendo capaz de reducir significativamente la presencia de hifas en los órganos estudiados, llegando incluso a negativizar el crecimiento fúngico en varios de los órganos estudiados. Además el posaconazol fue capaz de prolongar la supervivencia de los animales con respecto a los controles y por lo general, también con respecto a los ratones tratados con anfotericina B liposomal. Nuestros resultados concuerdan con los datos clínicos de mucoramicosis invasora causada por *Saksenaee* spp., en los que se evidencia la ineficacia del tratamiento con la anfotericina B en más del 70% de los casos (Gomes *et al.* 2011).

Los resultados obtenidos fueron publicados en la revista Medical Mycology 2012; DOI: 10.3109/13693786.2012.673137.

6. CONCLUSIONES

6. Conclusiones

6.1. Se ha evaluado la actividad *in vitro* de la anidulafungina y de la caspofungina frente a diversos aislados de *Candida parapsilosis* sensu stricto y se ha desarrollado un modelo de infección diseminada por *Candida parapsilosis* para evaluar su eficacia *in vivo*.

- Para ambos agentes antifúngicos se observó una buena actividad antifúngica frente a todas las cepas estudiadas.
- La actividad *in vitro* se correlacionó con la eficacia *in vivo* de ambas equinocandinas, las cuales fueron más efectivas en el tratamiento de las infecciones causadas por aquellas cepas de *C. parapsilosis* para las cuales las CMI's fueron bajas.

6.2. Se ha estudiado la actividad *in vitro* del posaconazol frente a 21 cepas de *Aspergillus terreus*, así como su eficacia *in vivo* frente a esta especie en un modelo de aspergilosis diseminada en el ratón inmunocomprometido.

- El posaconazol ha mostrado una buena actividad *in vitro* e *in vivo* frente *A. terreus*. Estos resultados sugieren el potencial uso del posaconazol como primera opción terapéutica para el tratamiento en infecciones causadas por *A. terreus*.
- Confirmamos que la medición de antígeno galactomanano en suero es un buen marcador de la eficacia y del pronóstico de la terapia antifúngica con posaconazol en infecciones diseminadas causadas por *A. terreus*.

6.3. Se ha investigado la eficacia del voriconazol y su correlación con los valores de CMI en un modelo de infección diseminada en el ratón inmunodeprimido causada por *A. terreus*.

- El voriconazol fue eficaz en el tratamiento de las infecciones causadas por cepas de *A. terreus* para las que las CMI's fueron inferiores a 1 µg/ml,

Conclusiones

sugiriéndose que dichos valores de CMI podrían ser predictivos de una buena eficacia *in vivo* en las infecciones causadas por *A. terreus*.

6.4. Hemos estudiado la actividad *in vitro* del voriconazol frente a *Aspergillus fumigatus* y hemos desarrollado un modelo de infección diseminada causada por dicha especie en el ratón inmunosuprimido para evaluar su eficacia *in vivo*.

- La actividad *in vitro* se correlacionó con la buena eficacia *in vivo* en los animales inoculados con aislados de *A. fumigatus* para las cuales las CMIs fueron ≤ 0.25 $\mu\text{g/ml}$. Para los aislados para los cuales las CMIs del voriconazol fueron > 0.25 $\mu\text{g/ml}$ los resultados *in vivo* fueron variables, sin una clara relación entre el incremento de las CMIs y la respuesta a la terapia.

6.5. Hemos investigado la actividad *in vitro* de la anfotericina B y del posaconazol frente a *Mucor circinelloides* y se ha valorado la eficacia de ambos antifúngicos en un modelo de mucoramicosis invasora en el ratón neutropénico.

- La anfotericina B ha demostrado una mayor actividad *in vitro* que el posaconazol frente a todas las cepas de *M. circinelloides* ensayadas.
- La mayor actividad *in vitro* de la anfotericina B se vio reflejada también en los estudios *in vivo*.
- La pobre eficacia *in vivo* del posaconazol sugiere que este fármaco debe ser utilizado con precaución en el tratamiento de infecciones causadas por *M. circinelloides*.

6.6. Se ha valorado la actividad *in vitro* del posaconazol y de la anfotericina B frente a diferentes cepas de *Apophysomyces variabilis*. Hemos desarrollado un modelo de mucoramicosis diseminada en el ratón inmunocompetente, en el que hemos estudiado y comparado la eficacia *in vivo* del posaconazol y de la anfotericina B.

- Tanto el posaconazol como la anfotericina B mostraron una buena actividad *in vitro* frente a *A. variabilis*.

- Ambos fármacos fueron efectivos en disminuir significativamente la presencia de crecimiento fúngico en los órganos estudiados, si bien el posaconazol fue más eficaz en prolongar la supervivencia de los animales infectados con dicho hongo. La buena eficacia del posaconazol sugiere su potencial utilidad como alternativa a la anfotericina B y sus formulaciones lipídicas en el tratamiento de las infecciones causadas por *A. variabilis*.

6.7. Se ha evaluado la actividad *in vitro* del posaconazol y de la anfotericina B frente a diversos aislados cepas de *Saksenaea vasiformis*. En un modelo de mucoramicosis diseminada en el ratón inmunocompetente hemos estudiado y comparado la eficacia *in vivo* del posaconazol y de la anfotericina B liposomal.

- El posaconazol ha demostrado una mayor actividad *in vitro* que la anfotericina B frente a todas las cepas de *S. vasiformis* ensayadas.
- Se ha observado una buena correlación entre los resultados obtenidos mediante las tres técnicas *in vitro* empleadas para ambos antifúngicos estudiados.
- El posaconazol fue el tratamiento más efectivo en el tratamiento de la infección experimental en el ratón causada por *S. vasiformis*. En base a estos resultados, el posaconazol podría constituir una alternativa eficaz a las formulaciones lipídicas de la anfotericina B en el tratamiento de la mucoramicosis causada por *S. vasiformis*.

7. BIBLIOGRAFÍA

6. Bibliografía

Abarca ML. Taxonomy and identification of the species involved in nosocomial aspergillosis. *Rev Iberoam Micol* 2000; 17: 79-84.

Alastruey-Izquierdo A, Castelli MV, Cuesta I, Monzon A, Cuenca-Estrella M, Rodríguez-Tudela JL. Activity of posaconazole and other antifungal agents against Mucorales strains identified by sequencing of internal transcribed spacers. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53 :1686-1689.

Alcazar-Fuoli L, Mellado E, Alastruey-Izquierdo A, Cuenca-Estrella M, Rodríguez-Tudela JL. *Aspergillus* section Fumigati: antifungal susceptibility patterns and sequence-based identification. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52: 1244-1251.

Almyroudis NG, Sutton DA, Fothergill AW, Rinaldi MG, Kusne S. *In vitro* susceptibilities of 217 clinical isolates of zygomycetes to conventional and new antifungal agents. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51: 2587-2590.

Alvarez E, Cano J, Stchigel AM, Sutton DA, Fothergill AW, Salas V, Rinaldi MG, Guarro J. Two new species of *Mucor* from clinical samples. *Med Mycol* 2011; 49: 62-72.

Alvarez E, Garcia-Hermoso D, Sutton DA, Cano JF, Stchigel AM, Hoinard D, Fothergill AW, Rinaldi MG, Dromer F, Guarro J. Molecular phylogeny and proposal of two new species of the emerging pathogenic fungus *Saksenaea*. *J Clin Microbiol* 2010; 48: 4410-4416.

Alvarez E, Stchigel AM, Cano J, Sutton DA, Fothergill AW, Chander J, Salas V, Rinaldi MG, Guarro J. Molecular phylogenetic diversity of the emerging mucoralean fungus *Apophysomyces*: proposal of three new species. *Rev Iberoam Micol* 2010; 27: 80-89.

Alvarez E, Sutton DA, Cano J, Fothergill AW, Stchigel A, Rinaldi MG, Guarro J. Spectrum of zygomycete species identified in clinically significant specimens in the United States. *J Clin Microbiol* 2009; 47: 1650-1656.

Andes D, Diekema DJ, Pfaller MA, Bohrmuller J, Marchillo K, Lepak A. *In vivo* comparison of the pharmacodynamic targets for echinocandins drug against *Candida* species. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54: 2497-2506.

Baddley JW, Marr KA, Andes DR, Walsh TJ, Kauffman CA, Kontoyiannis DP, Ito JI, Balajee SA, Pappas PG, Moser SA. Patterns of susceptibility of *Aspergillus* isolates recovered from patients enrolled in the transplant-associated infection surveillance network. *J Clin Microbiol* 2009; 47: 3271-3275.

Baddley JW, Pappas PG, Smith AC, Moser SA. Epidemiology of *Aspergillus terreus* at a university hospital. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 5525-5529.

Bal AM. Importance of identification of zygomycetes in the era of newer antifungal agents. *Transp Infect Dis* 2006; 8: 122-123.

Balajee SA. *Aspergillus terreus* complex. *Med Mycol* 2009; 1: 42-46.

Balajee SA, Borman AM, Brandt ME, Cano J, Cuenca-Estrella M, Dannaoui E, Guarro J, Haase G, Kibbler CC, Meyer W, O'Donnell K, Petti CA, Rodriguez-Tudela JL, Sutton D, Velegraki A, Wickes BL. Sequence-based identification of *Aspergillus*, *Fusarium*, and mucorales species in the clinical mycology laboratory: where are we and where should we go from here? *J Clin Microbiol* 2009; 47: 877-884.

Barchiesi F, Spreghini E, Tomassetti S, Della Vittoria A, Arzeni D, Manso E, Scalise G. Effects of caspofungin against *Candida guilliermondii* and *Candida parapsilosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50: 2719-2727.

Barry AL, Pfaller MA, Brown SD, Espinel-Ingroff A, Ghannoum MA, Knapp C, Rennie RP, Rex JH, Rinaldi MG. Quality control limits for broth microdilution susceptibility tests of ten antifungal agents. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 3457-3459.

Bedini A, Venturelli C, Mussini C, Guaraldi G, Codeluppi M, Borghi V, Rumpianesi F, Barchiesi F, Esposito R. Epidemiology of candidemia and antifungal susceptibility patterns in an Italian tertiary-care hospital. *Clin Microbiol Infect* 2006; 12: 75-1280.

Belmares J, Colaizzi L, Parada JP, Johnson S. Caspofungin treatment failure in a patient with invasive candidiasis and concomitant rifampicin treatment. *Int J Antimicrob Agents* 2005; 26: 264-265.

Boekhout T, Gueidan C, de Hoog S, Samson R, Varga J, Walther G. Fungal taxonomy: new developments in medically important fungi. *Curr Fungal Infect Rep* 2009; 3:170-178.

Blum G, Perkhofer S, Grif K, Mayr A, Kropshofer G, Nachbaur D, Kafka-Ritsch R, Dierich MP, Lass-Flörl C. A 1-year *Aspergillus terreus* surveillance study at the University Hospital of Innsbruck: molecular typing of environmental and clinical isolates. *Clin Microbiol Infect* 2008; 12: 1146-1151.

Calhoun DL, Roberts GD, Galgiani JN, Bennett JE, Feingold DS, Jorgensen J, Kobayashi GS, Shadomy S. Results of a survey of antifungal susceptibility tests in the United States and the interlaboratory comparison of broth dilution testing of flucytosine and amphotericin B. *J Clin Microbiol* 1986; 23: 298-231.

Camps SM, van der Linden JW, Li Y, Kuijper EJ, van Dissel JT, Verweij PE, Melchers WJ. Rapid induction of multiple resistance mechanism in *Aspergillus fumigatus* during azole therapy: a case study and review of the literature. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; 56: 10-16.

Cantón E, Espinel-Ingroff A, Pemán J, del Castillo L. *In vitro* fungicidal activities of echinocandins against *Candida metapsilosis*, *C. orthopsilosis*, and *C. parapsilosis* evaluated by time-kill studies. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54: 2194-2197.

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 M 44-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.

Carrillo-Muñoz AJ, Pemán J, Gobernado M. New antifungals drugs. Present and future. *Rev Esp Quimioter* 1999; 12:181-204.

Casadevall A, Pirofski LA. Adjunctive immune therapy for fungal infections. *Clin Infect Dis* 2001; 33: 1048-1056.

Chander J, Kaur J, Attri A, Mohan H. Primary cutaneous zygomycosis from tertiary care centre in north-west India. *Indian J Med Res* 2010; 131: 765-770.

Chakrabarti A, Shivaprakash MR, Curfs-Breuker I, Baghela A, Klaassen CH, Meis JF. *Apophysomyces elegans*: epidemiology, amplified fragment length polymorphism type, and *in vitro* antifungal susceptibility pattern. *J Clin Microbiol* 2010; 48: 4580-5.

Chandrasekar P. Invasive mold infections: recent advances in management approaches. *Leuk Lymphoma* 2009; 50: 703-715.

Cheung C, Guo Y, Gialanella P, Feldmesser M. Development of candidemia on caspofungin therapy: a case report. *Infection* 2006; 34: 345-348.

Clancy CJ, Wingard JR, Hong-Nguyen N. Subcutaneous phaeohyphomycosis in transplant recipients: review of the literature and demonstration of *in vitro* synergy between antifungal agents. *Med Mycol*; 38: 169-175.

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, 2008.

Clinical and Laboratory Standards Institute. Method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of nondermatophyte filamentous fungi. Approved guideline. Document M51-A. CLSI, Wayne, Pa, USA, 2010.

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, 2008.

Clinical and Laboratory Standards Institute. Method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of yeasts; approved guideline. Document M44-A2. CLSI, Wayne, Pa, USA, 2008.

Clinical and Laboratory Standards Institute. Method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of filamentous fungi; proposed guideline. Document M51-P. Wayne, Pa, USA, 2009.

Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antifungal disk diffusion susceptibility testing of filamentous fungi; informational supplement. Document M51-S1 (proposed). C.L.S.I, Wayne, Pa. USA, 2009.

Cortés JA, Russi A. Equinocandinas. Rev Chilena Infectol 2011; 28: 529-536.

Craver CW, Tarallo M, Roberts CS, Blanchette CM, Ernst FR. Cost and resource utilization associated with fluconazole as first-line therapy for invasive candidiasis: a retrospective data base analysis. Clin Ther 2010; 32: 2467-2477.

Cuenca-Estrella M, Rodríguez-Tudela JL. The current role of the referent procedures by CLSI and EUCAST in the detection of resistance to antifungal agents *in vitro*. Expert Rev Anti Infect Ther 2010; 8: 267-276.

Bibliografía

Dannaoui E, Meis JF, Loebenberg D, Verweij PE. Activity of posaconazole in treatment of experimental disseminated zygomycosis. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47: 3647-3650.

Dannaoui E, Mouton JW, Meis J F, Verweij PE, Eurofung Network. Efficacy of antifungal therapy in a nonneutropenic murine model of zygomycosis. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 1953-1959.

Dagenais TR, Keller NP. Pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* in invasive aspergillosis. *Clin Microbiol Rev* 2009; 22: 447-465.

del Palacio A, Alhambra A, Cuétara MS, Pontón J. Early diagnosis of invasive infections caused by *Aspergillus* and other emerging mycelial fungi. *Rev Iberoam Micol* 2007; 24: 187-197.

de Hoog GS, Guarro J, Gené J, Figueras MJ. Atlas of clinical fungi. 2nd ed. Centraalbureau voor Schimmelcultures, The Netherlands and University Rovira i Virgili, Reus, Spain. 2000.

Denning DW, Venkateswarlu K, Oakley KL, Anderson MJ, Manning NJ, Stevens DA, Warnock DW, and Kelly SL. Itraconazole resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41: 1364-1368.

de Wet N, Llanos-Cuentas A, Suleiman J, Baraldi E, Krantz EF, Della Negra M, Diekmann-Berndt H. A randomized, double-blind, parallel-group, dose-response study of micafungin compared with fluconazole for the treatment of esophageal candidiasis in HIV positive patients. *Clin Infect Dis* 2004; 39: 842-849.

Doern GV, Tubert TA, Chopin K, Rinaldi MG. Effect of medium composition on results of macrobroth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. *J Clin Microbiol* 1986, 24: 507-511.

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.

El-Ridy MS, Abdelbary A, Essam T, El-Salam RM, Kassem AA. Niosomes as a potential drug delivery system for increasing the efficacy and safety of nystatin. *Drug Dev Ind Pharm.* 2011; 37: 1491-508.

Enoch DA, Aliyu SH, Sule O, Lewis SJ, Karas JA. Posaconazole for the treatment of mucormycosis. *Int J Antimicrob Agents* 2011; 38: 465-473.

Espinel-Ingroff A. La estandarización de las pruebas de sensibilidad a los antifúngicos y métodos alternativos. *Rev Esp Quimioter* 1994; 7: 20-31.

Espinel-Ingroff A. *In vitro* antifungal activities of anidulafungin and micafungin, licensed agents and the investigational triazole posaconazole as determined by NCCLS methods for 12.052 fungal isolate: review of the literature. *Rev Iberoam Micol* 2003; 20: 121-136.

Espinel-Ingroff A, Bartlett M, Bowden R, Chin NX, Cooper Jr, Fothergill A, McGinnis MR, Menezes P, Messer SA, Nelson PW, Odds FC, Pasarell L, Peter J, Pfaller MA, Rex JH, Rinaldi MG, Shankland GS, Walsh TJ, Weitzman I. Multicenter evaluation of proposed standardization of antifungal susceptibility testing for filamentous fungi. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 139-143.

Espinel-Ingroff A, Bartlett M, Chaturvedi V, Ghannoum M, Hazen KC, Pfaller MA, Rinaldi M, Walsh TJ. Optimal susceptibility testing conditions for detection of azole resistance in *Aspergillus* spp. NCCLS collaborative evaluation. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 1828-1835.

Espinel-Ingroff A, Cantón E. Comparison of Neo-sensitabs tablet diffusion assay with CLSI broth microdilution M 38-A and disk diffusion methods for testing susceptibility of filamentous fungi with amphotericin B, caspofungin, itraconazole, posaconazole and voriconazole. *J Clin Microbiol* 2008; 46: 1793-1803.

Espinel-Ingroff A, Cantón E. *In vitro* activity of echinocandins against non-*Candida albicans*: is echinocandin antifungal activity the same? *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2011; 2: 3-9

Espinel-Ingroff A, Chaturvedi V, Fothergill A, Rinaldi MG. Optimal testing conditions for determining MICs and minimum fungicidal concentrations of new and established antifungal agents for uncommon molds: NCCLS collaborative study. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 3776-3781.

Espinel-Ingroff A, Dawson K, Pfaller M, Anaissie E, Breslin B, Dixon D, Fothergill A, Paetznick V, Peter J, Rinaldi M. Comparative and collaborative evaluation of standardization of antifungal susceptibility testing for filamentous fungi. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39: 314-319.

Espinel-Ingroff A, Diekema DJ, Fothergill A, Johnson E, Pelaez T, Pfaller MA, Rinaldi MG, Canton E, Turnidge J. Wild-type MIC distribution and epidemiological cutoff values for the triazoles and six *Aspergillus* spp. for the CLSI broth microdilution method (M38-A2). *J Clin Microbiol* 2010; 48: 3251-3257.

Espinel-Ingroff A, Kerkering TM. Spectrophotometric method of inoculum preparation for the *in vitro* susceptibility testing of filamentous fungi. *J Clin Microbiol* 1991; 29: 393-394.

Espinel-Ingroff A, Shadomy S. *In vitro* and *in vivo* evaluation of antifungal agents. *Eur J Clin. Microbiol Infect Dis* 1989; 8: 352-361.

European Medicines Agency. Noxafil. EPAR annex 1. Summary of product characteristics. European Medicines Agency, London, United Kingdom. http://www.emea.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/000610/human_med_000937.jsp

Ferguson TD, Schniederjan SD, Dionne-Odom J, Brandt ME, Rinaldi MG, Nolte FS, Langston A, Zimmer SM. Posaconazole treatment for *Apophysomyces elegans* rhino-orbital zygomycosis following trauma for a male with well-controlled diabetes. *J Clin Microbiol* 2007; 45: 1648-51.

Figueras C, Díaz de Heredia C, García JJ, Navarro ML, Ruíz-Contreras, Rossich R, Rumbao J, Frick MA, Roselló E. Recomendaciones de la Sociedad Española de Infectología Pediátrica sobre diagnóstico y tratamiento de la candidiasis invasiva. *An Pediatr (Barc)* 2011; 74: 337e1-337e17.

Fingerroth JD, Roth RS, Talcott JA, Rinaldi MG. Zygomycosis due to *Mucor circinelloides* in a neutropenic patient receiving chemotherapy for acute myelogenous leukemia. *Clin Infect Dis* 1994; 19: 135-137.

Garcia-Vidal C, Carratalà J. Pathogenesis of invasive fungal infections. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2012; 30: 151-158.

Gené J, Guarro J. Etiología de las zigomicosis. En: del Palacio A, Pontón J, Guarro J, Quindós G (eds.). Guía de bolsillo de las zigomicosis invasoras. 1ª ed. Revista Iberoamericana de Micología-Asociación Española de Micología, Bilbao, España. 2008; pp.9-18.

Goa KL, Barradell LB. Fluconazole. An update on its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic use in major superficial and systemic mycoses in immunocompromised patients. *Drugs* 1995; 50:658-590.

Gomes MZ, Lewis RE, Kontoyiannis DP. Mucormycosis caused by unusual mucormycetes, non-*Rhizopus*, *Mucor*, and *Lichtheimia* species 2011; 24: 411:445.

Graybill JR. The role of murine models in the development of antifungal therapy for systemic mycoses. *Drug resist. Updat* 2000; 3: 364-383.

Graybill JR, Hernandez S, Bocanegra R, Najvar LK. Antifungal therapy of murine *Aspergillus terreus* infection. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 3715-3719.

Graybill JR, Najvar LK, Gonzalez GM, Hernandez S, Bocanegra R. Improving the mouse model for studying the efficacy of voriconazole. *J Antimicrob Chemother* 2003; 51: 1371-1376.

Green JP, Karras DJ. Update on emerging infections: news from the Centers for Disease Control and Prevention. Notes from the field: fatal fungal soft-tissue infections after a tornado-Joplin, Missouri, 2011. *Ann Emerg Med.* 2012; 59: 53-55.

Greenberg RN, Mullane K, van Burik JA, Raad I, Abzug MJ, Anstead G, Herbrecht R, Langston A, Marr KA, Schiller G, Schuster M, Wingard JR, Gonzalez CE, Revankar SG, Corcoran G, Kryscio RJ, Hare R. Posaconazole as salvage therapy for zygomycosis. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50: 126-133.

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. Taxonomy and biology of fungi causing human infection. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2012; 30: 33-9.

Guarro J, Chander J, Alvarez E, Stchigel AM, Robin K, Dalal U, Rani H, Punia RS, Cano JF. *Apophysomyces variabilis* in humans. *Emerg Infect Dis* 2011; 17: 134-135.

Gutiérrez Urbón JM, Galeiras Vázquez R, Velasco Fernández D, Alvarez Rocha L. Development of *Candida parapsilosis* candidemia during caspofungin therapy. *Farm Hosp* 2011; 35: 282-285.

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.

Hospenthal DR, Chung KK, Lairet K, Thompson EH, Guarro J, Renz EM, Sutton D A. *Saksenaea erythrospora* infection following combat trauma. *J Clin Microbiol*. 2011; 49: 3707-3709.

Hsieh SM, Hung CC, Chen MY, Hsueh PR, Chang SC. Efficacy and adverse effects of higher dose amphotericin B monotherapy for cryptococcal meningitis in patients with advanced HIV infection. *J Microbiol Immunol Infect* 1998; 31:233-239.

Ibrahim AS, Bowman JC, Avanesian V, Brown K, Spellberg B, Edwards JE Jr, Douglas CM. Caspofungin inhibits *Rhizopus oryzae* 1,3-beta-D-glucan synthase, lower burden in brain measured by quantitative PCR, and improves survival at a low but not a high dose Turing murine disseminated zygomycosis. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 721-727.

Iwen PC, Sigler L, Noel RK, Freifeld AG. *Mucor circinelloides* was identified by molecular methods as a cause of primary cutaneous zygomycosis. *J Clin Microbiol* 2007; 45: 636-640.

Kartsonis N, Killar J, Mixson L, Hoe CM, Sable C, Bartizal K, Motyl M. Caspofungin susceptibility testing of isolates from patients with esophageal candidiasis or invasive candidiasis: relationship of MIC to treatment outcome. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 3616-3623.

Khan ZU, Ahmad S, Brazda A, Chandy R. *Mucor circinelloides* as a cause of invasive maxillofacial zygomycosis: an emerging dimorphic pathogen with reduced susceptibility to posaconazole. *J Clin Microbiol* 2009; 47: 1244-1248.

Kerridge D, Vanden-Bossche H. Drug discovery: a biochemist approach. En: Ryley JF. (ed.). *Handbook of experimental pharmacology. Chemotherapy of fungal diseases.* Springer Verlag, Berlin, Alemania. 1990; pp. 77-109.

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

Kontoyiannis DP, Lewis RE. How I treat mucormycosis. *Blood* 2011; 4: 1216-1224.

Kontoyiannis DP, Lewis RE, Lortholary O, Spellberg B, Petrikos G, Roillides E, Ibrahim A, Walsh TJ. Future directions in mucormycosis research. *Clin Infect Dis* 2012; 54: 79-85.

Krause DS, Reinhardt J, Vazquez JA, Reboli A, Goldstein BP, Wible M, Henkel T; Anidulafungin Invasive Candidiasis Study Group. Phase 2, randomized, dose-ranging study evaluating the safety and efficacy of anidulafungin in invasive candidiasis and candidemia. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 2021-2024.

Krishnan S, Manavathu EK, Chandrasekar PH. A comparative study of fungicidal activities of voriconazole and amphotericin B against hyphae of *Aspergillus fumigatus*. *J Antimicrob Chemother* 2005; 55: 914-920.

Kullberg BJ, Sobel JD, Ruhnke M, Pappas PG, Viscoli C, Rex JH, Cleary JD, Rubinstein E, Church LW, Brown JM, Schlamm HT, Oborska IT, Hilton F, Hodges MR. Voriconazole versus a regimen of amphotericin B followed by fluconazole for candidaemia in non-neutropenic patients: a randomised non-inferiority trial. *Lancet* 2005; 366: 1435-1442.

Larché J, Machouart M, Burton K, Collomb J, Biava MF, Gérard A, Fortier B. Diagnosis of cutaneous mucormycosis due to *Rhizopus microsporus* by an innovative PCR-restriction fragment-length polymorphism method. *Clin Infect Dis* 2005; 41: 1362-1365.

Lass-Flörl C, Alastruey-Izquierdo A, Cuenca-Estrella M, Perkhofer S, Rodríguez-Tudela JL. *In vitro* activities of various antifungal drugs against *Aspergillus terreus*: global assessment using the methodology of the European committee on antimicrobial susceptibility testing. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53: 794-795.

Lass-Flörl C, Perkhofer S. *In vitro* susceptibility-testing in *Aspergillus* species. *Mycoses* 2008; 51: 437-446.

Latgé JP. The pathobiology of *Aspergillus fumigatus*. *Trends Microbiol* 2001; 9: 382-389.

Laza-Stanca V, Reid L, Watson JD, Williamson EC. Successful treatment of cutaneous zygomycosis with extensive surgical debridement and oral posaconazole in an immunocompetent patient. *J Plas Reconstr Aesthet Surg* 2012; doi:10.1016/j.bjps.2012.02.009.

Ma LJ, Ibrahim AS, Skory C, Grabherr MG, Burger G, Butler M, Elias M, Idnurm A, Lang BF, Sone T, Abe A, Calvo SE, Corrochano LM, Engels R, Fu J, Hansberg W, Kim JM, Kodira CD, Koehrsen MJ, Liu B, Miranda-Saavedra D, O'Leary S, Ortiz-Castellanos L, Poulter R, Rodriguez-Romero J, Ruiz-Herrera J, Shen YQ, Zeng Q, Galagan J, Birren BW, Cuomo

CA, Wickes BL. Genomic analysis of the basad fungus *Rhizopus oryzae* reveals a whole-genole duplication. PLoS Genet 2009; 5: e1000549.

Marr KA, Balajee SA, McLaughlin L, Tabouret M, Bentsen C, Walsh TJ. Detection of galactomannan antigenemia by enzyme immunoassay for the diagnosis of invasive aspergillosis: variables that affect performance. J Infect Dis 2004; 190: 641-649.

Mauceri AA, Cullen SI, Vandevelde AG, Johnson JE 3rd. Flucytosine. An effective oral treatment for chromomycosis. Arch Dermatol 1974; 109: 873-876.

Mavridou E, Brüggemann RJ, Melchers WJ, Verweij PE, Mouton JW. Impact of cyp 51A mutations on the pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of voriconazole in a murine model of disseminated aspergillosis. Antimicrob Agents Chemother 2010; 54: 4758-4764.a

Mavridou E, Brüggemann RJ, Melchers WJ, Mouton JW, Verweij PE. Efficacy of posaconazole against three clinical *Aspergillus fumigatus* isolates with mutations in the *cyp51A* gene. Antimicrob Agents Chemother 2010; 54: 4758-64.b

Mayr A, Lass-Flörl C. Epidemiology and antifungal resistance in invasive aspergillosis according to primary disease: review of the literature. Eur J Med Res 2011; 28: 153.157.

McGinnis MR, Rinaldi MG. Antifungal drugs: mechanisms of action, drug resistance, susceptibility testing, and assays of activity in biologic fluids. En: Lorian V. (ed.). Antibiotic in Laboratory Medicine. 3rd ed. The Williams & Wilkins Co., Baltimore, USA. 1991; pp. 176–211.

Mensa J, De La Cámara R, Carreras E, Cuenca Estrella M, García Rodríguez JA, Gobernado M, Picazo J, Aguado JM, Sanz MA. Treatment of fangal infections in patients with hematologic neoplasia. Med Clin (Barc) 2009; 11: 507-521.

Misra PC, Srivastava KJ, Lata K. *Apophysomyces*, a new genus of the Mucorales. Mycotaxon 1979; 8: 377–382.

Mora-Duarte J, Betts R, Rotstein C, Colombo AL, Thompson-Moya L, Smietana J, Lupinacci R, Sable C, Kartsonis N, Perfect J. Caspofungin Invasive Candidiasis Study Group. Comparison of caspofungin and amphotericin B for invasive candidiasis. N Engl J Med 2002; 19: 2020-2029.

Moudgal V, Little T, Boikov D, Vazquez JA. Multiechinocandins and multiazole-resistant *Candida parapsilosis* isolates serially obtained during therapy for prosthetic valve endocarditis. Antimicrob Agents Chemother 2005; 49: 767-769.

National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard- second edition M27-A2. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa, USA, 2002.

National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. Approved standard M38-A. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa, USA, 2002.

Ng AW, Wasan KM, Lopez-Berestein G. Development of liposomal polyene antibiotics: an historical perspective. J Pharm Pharm Sci 2003; 6: 67-83.

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.

Pagano L, Caira M, Candoni A, Offidani M, Fianchi L, Martino B, Pastore D, Picardi M, Bonini A, Chierichini A, Fanci R, Caramatti C, Invernizzi R, Mattei D, Mitra ME, Melillo L, Aversa F, Van Lint MT, Falcucci

P, Valentini CG, Girmenia C, Nosari A. The epidemiology of fungal infections in patients with hematologic malignancies: the SEIFEM-2004 study. *Haematologica* 2006; 91: 1068-1075.

Pappas PG. Invasive candidiasis. *Infect Dis Clin North Am* 2006; 20: 485-506.

Pappas, P. G., C. A. Kauffman, D. Andes, D. K. Benjamin Jr., T. F. Calandra, J. E. Edwards Jr., S. G. Filler, J. F. Fisher, B. Kullberg, L. Ostrosky-Zeichner, A. C. Reboli, J. H. Rex, T. J. Walsh, J. D. Sobel. Clinical practice guidelines for the management of candidiasis: 2009 update by the infections diseases society of America. *Clin Infect Dis* 2009; 48: 503-535.

Pastor FJ, Guarro J. The role of voriconazole in the treatment of emerging mycoses. *Rev Iberoam Micol* 2007; 24: 228-232.

Pastor FJ, Ruíz-Cendoya M, Pujol I, Mayayo E, Sutton DA, Guarro J. *In vitro* and *in vivo* antifungal susceptibilities of the Mucoralean fungus *Cunninghamella*. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54: 4550-4555.

Pemán J, Cantón E, Quindós G, Eraso E, Alcoba J, Guinea J, Merino P, Ruiz-Pérez-de-Pipaon MT, Pérez-del-Molino L, Linares-Sicilia MJ, Marco F, García J, Roselló EM, Gómez-G-de-la-Pedrosa E, Borrell N, Porras A, Yagüe G; FUNGEMYCA Study Group. Epidemiology, species distribution and *in vitro* antifungal susceptibility of fungaemia in a Spanish multicentre prospective survey. *J Antimicrob Chemother* 2012; 67: 1181-1187.

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.

Petraitiene R, Petraitis V, Groll AH, Sein T, Piscitelli S, Candelario M, Field-Ridley A, Avila N, Bacher J, Walsh T. Antifungal activity and pharmacokinetics of posaconazole (SCH 56592) in treatment and prevention of experimental invasive pulmonary aspergillosis: correlation with galactomannan antigenemia. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 857-869.

Petrikkos G, Skiada A, Lortholary O, Roilides E, Walsh TJ, Kontoyiannis DP. Epidemiology and clinical manifestation of mucormycosis. *Clin Infect Dis* 2012; 54: 23-34. **Pazos C.** Diagnóstico de las micosis invasoras. Detección de antígeno galactomanano. *Rev Esp Quimioterap* 2004; 17: 79-82.

Pfaller MA, Boyken L, Hollis RJ, Kroeger J, Messer SA, Tendolkar S, Jones RN, Turnidge J, Diekema DJ. Wild type MIC distribution and epidemiological cutoff values for the echinocandins and *Candida* spp. *J Clin Microbiol* 2010; 48: 52-56.

Pfaller M A, Diekema D J, Andes D, Arendrup M C, Brown S D, Lockhart S R, Motyl M, Perlin D S, and The CLSI Subcommittee for Antifungal Testing. Clinical breakpoints for the echinocandins and *Candida* revisited: integration of molecular, clinical, and microbiological data to arrive at species-specific interpretative criteria. *Drug Resist Updat* 2011; 14: 164-176.

Pfaller MA, Diekema DJ, Boyken L, Messer SA, Tendolkar S, Hollis RJ, Goldstein BP. Effectiveness of anidulafungin in eradicating *Candida* species in invasive candidiasis. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 4795-4797.

Pfaller MA, Diekema DJ, Ghannoum MA, Rex JH, Alexander BD, Andes D, Brown SD, Chaturvedi V, Espinel-Ingroff A, Fowler CL, Johnson EM, Knapp CC, Motyl MR, Ostrosky-Zeichner L, Sheehan DJ, Walsh TJ; Clinical and Laboratory Standards Institute Antifungal Testing Subcommittee. Wild-type MIC distribution and epidemiological cutoff values for *Aspergillus fumigatus* and three triazole as determined by the Clinical and Laboratory

Standars Institute broth microdilution methods. J Clin Microbiol 2009; 47: 3142-3146.

Pfaller MA, Messer SA, Boyken L, Rice C, Tendolkar S, Hollis RJ, Diekema DJ. *In vitro* survey of triazole cross-resistance among more than 700 clinical isolates of *Aspergillus* species. J Clin Microbiol 2008; 46: 2568-2572.

Pfaller MA, Moet GJ, Messer SA, Jones RN, Castanheira M. *Candida* bloodstream infections: comparison of species distributions and antifungal resistance patterns in community-onset and nosocomial isolates in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 2008-2009. Antimicrob. Agents Chemother 2011; 55: 561-566.

Pfaller MA, Rinaldi MG. *In vitro* testing of susceptibility of fluconazole. En: Powderly WB, Vant Wout JW. (eds.). The antifungal agents. Fluconazole. Marius Press. Lancashire, UK. 1992.

Pontón J. Utilidad de los marcadores biológicos en el diagnóstico de la candidiasis invasora. Rev Iberoam Micol 2009; 26: 8-14.

Pontón J, Moragues MD, Gené J, Guarro J, Quindós G. Hongos y actinomicetos alérgicos. Revista Iberoamericana de Micología. Bilbao, España. 2002; pp. 1-46.

Pujol I, Guarro J, Sala J, Riba MD. Effects of incubation temperature, inoculum size, and time of reading on broth microdilution susceptibility test results for amphotericin B against *Fusarium* Antimicrob Agents Chemother. 1997; 41:808-811.

Quindós G, Zaragoza R, Carreras E. Candidiasis. En: Pontón J, Quindós G (eds.). Micosis invasoras en los pacientes oncohematológicos. 1ª ed. Revista Iberoamericana de Micología-Asociación Española de Micología, Bilbao, España. 2009; pp. 29-45.

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.

Raz-Pasteur A, Ullmann Y, Berdicevsky I. The pathogenesis of *Candida* infections in a human skin model: scanning electron microscope. ISRN Dermatol 2011; 150642.

Reboli AC, Rotstein C, Pappas PG, Chapman SW, Kett DH, Kumar D, Betts R, Wible M, Goldstein BP, Schranz J, Krause DS, Walsh TJ. Anidulafungin versus fluconazole for invasive candidiasis. N Engl J Med 2007; 356: 2472-2482.

Revankar SG, Graybill JR. Antifungal therapy. En: Anaissie EJ, McGinnis MR, Pfaller MA (eds.). Clinical Mycology. Elsevier Science, USA. 2003; pp. 157-192

Rex JH, Pfaller MA, Galgiani JN, Bartlett MS, Espinel-Ingroff A, Ghannoum MA, Lancaster M, Odds FC, Rinaldi MG, Walsh TJ, Barry AL. Development of interpretative breakpoints for antifungals susceptibility testing: conceptual framework and analysis of *in vitro-in vivo* correlation data for fluconazole, itraconazole, and *Candida* infections. Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing of the National Committee for Clinical and Laboratory Standards. Clin Infect Dis 1997; 24: 235-247.

Rex JH, Pfaller MA, Rinaldi MG, Polak A, Galgiani JN. Antifungal susceptibility testing. Clin Microbiol Rev 1993; 6: 367-381.

Ribes JA, Vanover-Sams CL, Baker DJ. Zygomycetes in human disease. Clin Microbiol Rev 2000; 13: 236-301.

Roden MM, Zaoutis TE, Buchanan WL, Knudsen TA, Sarkisova TA, Schaufele RL, Sein M, Sein T, Chiou CC, Chu JH, Kontoyiannis DP, Walsh TJ. Epidemiology and outcome of zygomycosis: a review of 929 reported cases. Clin Infect Dis 2005; 41: 634-653.

Rodríguez-Tudela JL, Alcazar-Fuoli L, Mellado E, Alastruey-Izquierdo A, Monzon A, Cuenca-Estrella M. Epidemiological cutoffs and cross-resistance to azole drugs in *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52: 2468-2472.

Rodríguez MM, Pastor FJ, Calvo E, Salas V, Sutton DA, Guarro J. Correlation of *in vitro* activity, serum levels, and *in vivo* efficacy of posaconazole against *Rhizopus microsporus* in a murine disseminated infection. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53: 5022-5025.

Rodríguez MM, Pastor FJ, Sutton DA, Calvo E, Fothergill AW, Salas V, Rinaldi MG, Guarro J. Correlation between *in vitro* activity of posaconazole and *in vivo* efficacy against *Rhizopus oryzae* infection in mice. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54: 1665-1669.

Rogers TR. Treatment of zygomycosis: current and new options. *J Antimicrob Chemother* 2008; 61: 35-40.

Rubio M, Gil J, Benito R, Ramírez I, Navarro M. Micosis más frecuentes en nuestro medio. En Pemán J, Martín E, Rubio M (eds.). Guía práctica de identificación y diagnóstico en micología clínica. Revista Iberoamericana de Micología. Bilbao, España. 2001; pp. 1-15.

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

Sabatelli F, Patel R, Mann PA, Mendrick CA, Norris CC, 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 molds and yeasts. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50: 2009-2015.

Saegeman V, Maertens J, Meersseman W, Spriet I, Verbeken E, Lagrou K. Increasing incidence of mucormycosis in University Hospital, Belgium. *Emerg Infect Dis* 2010; 16: 1456-1458.

Salas V, Pastor FJ, Calvo E, Alvarez E, Sutton DA, Mayayo E, Fothergill AW, Rinaldi MG, Guarro J. *In vitro* and *in vivo* activities of posaconazole and amphotericin B in a murine invasive infection by *Mucor circinelloides*: poor efficacy of posaconazole. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; 56: 2246-2250.

Salas V, Pastor FJ, Calvo E, Mayayo E, Quindós G, Carrillo AJ, Guarro J. Anidulafungin in treatment of experimental invasive infection by *Candida parapsilosis*: *in vitro* activity, (1→3)-beta-D-glucan and mannan serum levels, histopathological findings, and *in vivo* efficacy. *Antimicrob Agent Chemother* 2011; 55: 4985-4989.

Salavert M, Pemán J. 2009. Zigomicosis. En: Pontón J, Quindós G (eds.). *Micosis invasoras en los pacientes oncohematológicos*. 1ª ed. Revista Iberoamericana de Micología-Asociación Española de Micología, Bilbao, España. 2009; pp. 65-67.

Serrano M C, Ramírez M, Morilla D, Valverde A, Chávez M, Espinel-Ingroff A, Claro R, Fernández A, Almeida C, Martín-Mazuelos E. A comparative study of the disk diffusion method with the broth microdilution and E-test methods for voriconazole susceptibility testing of *Aspergillus* spp. *J Antimicrob Chemother* 2004; 53: 739-742.

Shadomy S, Shadomy HJ. Comparative *in vitro* antifungal susceptibility studies with 30 serotype A and B isolates of *Candida albicans*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1991; 14:21-22.

Sharma NL, Mahajan V, Sharma RC, Sharma A. Subcutaneous phaeohyphomycosis in India a case report and review. *Int J Dermatol* 2002; 41: 16-20.

Shenoy BD, Jeewon R, Hyde KD. Impact of DNA sequence data in the taxonomy of anamorphic fungi. *Fungal Diversity* 2007; 26: 1-54.

Sionov B, Mendlovic S, Segal E. Efficacy of amphotericin B or amphotericin B-intralipid in combination with caspofungin against experimental aspergillosis. *J Infect* 2006; 53: 131-139.

Spellberg B, Edwards JE. Type 1/Type 2 immunity in infectious diseases. *Clin Infect Dis* 2001; 32: 76-102.

Spellberg B, Edwards JE Jr, Ibrahim AS. Novel perspectives on mucormycosis: pathophysiology, presentation, and management. *Clin Microbiol Rev* 2005; 18: 556-569.

Spellberg BJ, Filler SG, Edwards JE Jr. Current treatment strategies for disseminated candidiasis. *Clin Infect Dis* 2006; 15: 244-251.

Spellberg B, Walsh TJ, Kontoyiannis DP, Edwards J Jr, Ibrahim AS. Recent advances in the management of mucormycosis: from bench to bedside. *Clin Infect Dis* 2009; 48: 1743-1751.

Spreghini E, Orlando F, Giannini D, Barchiesi F. *In vitro* and *in vivo* activities of posaconazole against zygomycetes with various degrees of susceptibility. *J Antimicrob Chemother* 2010; 65: 2158–2163.

Steinbach WJ, Benjamin Jr DK, Kontoyiannis DP, Perfect JR, Lutsar I, Marr KA, Lionakis MS, Torres HA, Jafri H, Walsh TJ. Infections due to *Aspergillus terreus*: a multicenter retrospective analysis of 83 cases. *Clin Infect Dis* 2004; 39: 192-198.a

Steinbach WJ, Perfect JR. Newer antifungal therapy for emerging fungal pathogens. *Int J Infect Dis* 2003; 7: 5-20.

Steinbach WJ, Perfect JR, Schell WA, Walsh TJ, Benjamin DK Jr. *In vitro* analyses, animal models, and 60 clinical cases of invasive *Aspergillus terreus* infection. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 3217-3225.b

Stewardson AJ, Holmes NE, Dellis DH, Howden BP. Cutaneous zygomycosis caused by *Saksenaea vasiformis* following water-related wound in a 24-year-old immunocompetent woman. *Mycoses* 2009; 52: 547-549.

Sun QN, Fothergill AW, McCarthy DJ, Rinaldi MG, Graybill JR. *In vitro* activities of posaconazole, itraconazole, voriconazole, amphotericin B, and fluconazole against 37 clinical isolates of zygomycetes. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 1581-1582.

Sun QN, Najvar LK, Bocanegra R, Loebenberg D, Graybill JR. *In vivo* activity of posaconazole against *Mucor* spp in an immunosuppressed-mouse model. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46:2310-2312.

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.

Torres-Rodríguez JM, López-Joldra O. Epidemiology of nail infection due to keratinophilic fungi. *Rev Iberoam Micol* 2000; 17:122-135.

Trofa D, Gácsér A, Nosanchuk J D. *Candida parapsilosis*, an emerging fungal pathogen. *Clin Microbiol Rev* 2008; 21: 606-625

Trotter DJ, Gonis G, Cottrill E, Coombs C. Disseminated *Saksenaea vasiformis* in an immunocompetent host. *Med J Aust* 2008; 189: 519-520.

van Asbeck EC, Clemons KV, Stevens DA. *Candida parapsilosis*: a review of its epidemiology, pathogenesis, clinical aspects, typing and antimicrobial susceptibility. *Crit Rev Microbiol* 2009; 35: 283-309.

van Burik JA, Hare RS, Solomon HF, Corrado ML, Kontoyiannis DP. Posaconazole is effective as salvage therapy in zygomycosis: a retrospective summary of 91 cases. *Clin Infect Dis* 2006; 42: 61-65.

Vega W, Orellana M, Zaror L, Gené J, Guarro J. *Saksenaea vasiformis* infections: case report and literature review. *Mycopathologia* 2006; 162: 289-294.

Verweij PE, Howard SJ, Melchers WJ, Denning DW. Azole-resistance in *Aspergillus*: proposed nomenclature and breakpoints. *Drug Resist Updat* 2009; 12: 141-147.

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.

Walsh TJ, Petraitis V, Petraitiene R, Field-Ridley A, Sutton D, Ghannoum M, Sein T, Schaufele R, Peter J, Bacher J, Armstrong D, Espinell-Ingroff A, Rinaldi MG, Lyman CA. Experimental pulmonary aspergillosis due to *Aspergillus terreus*: pathogenesis and treatment of an emerging fungal pathogen resistant to amphotericin B. *J Infect Dis* 2003; 188: 305-331.

White MM, James TY, O'Donnell K, Cafaro MJ, Tanabe Y, Sugiyama J. Phylogeny of the Zygomycota based on nuclear ribosomal sequence data. *Mycologia* 2006; 98: 872-884.

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